

# SİGARA DUMANININ NEDEN OLDUĞU AKCİĞER İNFLAMASYONUNA KARŞI ALFA-LİNOLENİK ASİTİN KORUYUCU ROLÜ

## PROTECTIVE EFFECT OF ALPHA-LINOLENIC ACID AGAINST LUNG INFLAMMATION INDUCED BY CIGARETTE SMOKE

Halil Mahir Kaplan<sup>1</sup>, Figen Doran<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, ADANA

<sup>2</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, ADANA

### ÖZET

**Amaç:** Yapılan çalışmalar keten yağında bolca bulunan ve omega 3 yağ asitlerinden biri olan alfa-linolenik asitin antioksidan ve anti inflamatuvar etkinliğini göstermiştir. Sigara dumanı birçok zararlı bileşeni içerdiğinden akciğerlerde hasara neden olmaktadır. Bu nedenle alfa-linolenik asitin sigara dumanı maruziyetine bağlı akciğer hasarına karşı koruyucu etkinliği olup olmayacağını planladık.

**Gereç ve Yöntem:** Bu amaçla farelere 2 ay boyunca sigara dumanı ve 200 mg/kg alfa-linolenik asit verildi. ve akciğerlerindeki siklooksijenaz-2, fosfolipaz A2 ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimleri ELISA yöntemiyle analiz edildi.

**Bulgular:** Farelere gentamisin uygulaması akciğerlerde siklooksijenaz-2(COX-2), fosfolipaz A2 ve iNOS enzimlerinin ekspresyonlarını arttırdı. Sigara dumanına maruz bırakılan farelere alfa-linolenik asit verilmesi bu enzimlerdeki artışı geri çevirdi.

**Sonuç:** Çalışmamız sigaranın neden olduğu akciğer hasarına karşı alfa-linolenik asit kullanılmasının yararlı olacağını göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Sigara dumanı, akciğer, alfa-linolenik asit, siklooksijenaz-2, fosfolipaz A2, ve iNOS

### ABSTRACT

**Aim:** Alpha-linolenic acid which is been found in leensed oil abundantly is a omega-3 faty acid and its anti-inflammatory and antioxidant effects are shown in various studies. Cigarette smoke contains various toxic and causes lung damage. Due to this reason, we planned a study to examine the protective effects of alpha-linolenic acid against smoke exposure induced lung damage in mice.

**Material and Methods:** For this purpose, mice exposed to smoke during 2 month and 200 mg/kg alpha-linolenic acid per a day and cyclooxygenase-2, phospholipase A2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzymes in their lungs are analyzed by using ELISA method.

**Results:** Smoke exposure increased the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), phospholipase A2 and iNOS enzymes. Alpha-linolenic acid administration to mice that are exposed to smoke previously decreased the rate of increase of the phospholipase A2, cyclooxygenase-2 and iNOS.

**Conclusion:** Our study shows that the smoke exposure causes lung damage and the use of alpha-linolenic acid can be helpful against this toxic effect.

**Key words:** Smoke, lung, alpha-linolenic acid, cyclooxygenase-2, phospholipase A2 and inducible nitric oxide synthase.

Gönderme tarihi / Received: 01.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 17.11.2016

İletişim: Halil Mahir KAPLAN Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 01330 Adana, Türkiye.

Tel: 05535946323 E-posta: [hmahirkaplan@hotmail.com](mailto:hmahirkaplan@hotmail.com)

## GİRİŞ

Sigara kullanımı günümüzün önemli sağlık problemlerindedir. Sigara dumanı maruziyeti başta akciğerler ve kardiyovasküler sistem gibi vücutta birçok organı olumsuz yönde etkilemekte ve ilgili organlarda hasar ve fonksiyon bozukluklarına neden olabilmektedir. Sigara kullanımı kardiyovasküler hastalıklara yönelik büyük bir risktir. Epidemiyolojik çalışmalar, sigara kullanımının tromboz, ateroskleroz gelişimi, miyokard infarktu, vasküler graft başarısızlığı ve koroner arter hastalıklarından ölüme sebebiyet vermesi ile birlikte hipertansiyon ve endotelial disfonksiyonun önemli nedenlerinden olduğunu göstermiştir (1-4).

Sigara kullanımı plazmadaki kombine nitrit, nitrat ve antioksidan yoğunluğunu düşürür (5). Sigara dumanı maruziyeti endotel hücrelerindeki L-arjinin-NO sentaz yolağını etkileyerek NO üretimini azaltır. Ayrıca oksidatif stresi artırdığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Buna ilave olarak L-arjinin transportunu ve nitrik oksid sentaz ekspresyonunu ve aktivitesini azaltır (6). Uzun süreli sigara dumanı maruziyeti fare karotid arterinin yapısını dönüşümsüz olarak bozar ve elastikiyetini azaltır (7). Sigara kullanımı kronik obstrüktif akciğer hastalığı riskini artırır. A vitamini azalmasına neden olarak akciğer parankim hücrelerinin yıkımına ve elastikiyetinin azalmasına bağlı bir hastalık olan amfizemin gelişimine neden olur (8). Sigara kullanımı serbest oksijen radikallerinin artmasına neden olarak oksidatif stresi artırır. Artan oksidatif stres NO inaktivasyonu yaparak endotelial disfonksiyona katkıda bulunur ve normal koroner damarların kan akımının azalmasına neden olur (9).

Keten yağında yüksek oranda bulunan alfa-linolenik asit kalp ve kardiyovasküler sistem için koruyucu bir besindir (10, 11). Araşidonat yapısına katılan dokozaheksaenoik asit (DHA) ve pentanoik asit (EPA)'in ön maddesidir (12). Alfa-linolenik asit diyeti ile beslenen spontan hipertansif sıçanlarda kan basıncının düştüğü gösterilmiştir (13). Ayrıca alfa-linolenik asit diyeti yüksek, orta ve normal tansiyonlu japonların sistolik ve diyastolik kan basınçlarını düşürdüğü bildirilmiştir (14). Alfa linolenik asid'in antioksidan etkinliği vardır. Oksidatif stresi azaltması inflamasyonun önlenmesine de katkı sağlar(15). Alfa-linolenik asit lipoprotein sakkarit (LPS)'in neden olduğu inflamasyonu da azaltır. Alfa-linolenik asit ayrıca nükleer faktör kappa-B (NF-kB) translokasyonunu ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK)'ın fosforilasyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon iNOS, COX-2, TNF-alfa gibi inflamatuvar faktörlerinin ekspresyonlarını azaltır (16).

Ayrıca omega-3 yağ asitleri prostaglandinlerin sentezinde görev alır (17). Kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltır (18-20). Bağışıklık sistemini de düzenlediği gösterilmiştir (21). Prostaglandinler vücut sıcaklığı, inflamasyon, ağrı, dolaşım sistemi, boşaltım sistemi ve sindirim sisteminin düzenlenmesinden sorumludurlar. Bununla birlikte kan pıhtılaşması ve bazı hormonların sentezlenmesi için de önem arz etmektedirler (22).

Sigara dumanının birçok toksik etkisi varken çalışmamızda kullandığımız alfa-linolenik asid'in bu toksik etkiler üzerinde koruyucu olup olmayacağı merak uyandırmaktadır. Bu amaçla fareleri sigara dumanına maruz bırakıp alfa-linolenik asid'in akciğerler üzerinde koruyucu özelliğini araştırmayı planladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Fareler kontrol, duman uygulanan ve duman ile birlikte alfa-linolenik asit uygulanan olarak üç gruba ayrıldı. Alfa-linolenik asit 200mg/kg dozunda 8 hafta boyunca günde 1 kez uygulandı. Duman uygulanacak fareler 100 cm uzunluğunda 60 cm genişliğinde 80 cm yüksekliğinde karşılıklı 2 kenarın birinde duman giriş bölgesi diğerinde ise hava çıkış bölgesi olan fleksiglas odanın içine konuldu. Duman giriş bölgesine yanma düzeneği monte edilip düzeneğe bağlı olan sigara (2 adet) yakılarak düzeneğin içerisindeki vakum pompası vasıtasıyla duman giriş bölgesinden hava çıkış bölgesine duman akımı oluşturularak farelerin dumanı solumaları sağlandı. Her sigaradan 10 dakika boyunca odanın içerisine duman sağlandı. Bu süre sonunda 10 dakika odanın dumansız kalması sağlandı. Bu döngü 20 adet sigaranın bitimine kadar uygulandı. Bu uygulamaya 8 hafta boyunca haftada 5 gün devam edildi. Dumansız kontrol grubuna da aynı deneysel koşullar sağlandı. Fleksiglas odanın içine duman yerine hava aspirasyonu sağlandı. Yukarıda açıklanan protokolün sonunda fareler servikal dislokasyon ile öldürüldü. Farelerin toraksı açılarak akciğerleri çıkarıldı. Çıkarılan doku kantitatif tayin deneylerinde kullanılmak üzere -20°C'de dondurularak eppendorf içinde saklandı.

### Kantitatif Tayin Deneyleri

#### Doku Homojenizasyonu

Eppendorf içinde -20°C dondurulmuş dokuların üzerine gram başına 3ml RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer, 30µl PMSF (fenylmetanesulfonylfluoride), 30µl sodyum vanadat, 30µl proteaz inhibitörü eklendi ve ultrasonic parçalama cihazıyla buz üzerinde

dokuların parçalanarak homojenatlar elde edildi. Homojenatlar 10.000 RPM'de 10 dakika santrifüj edilip üstte ayrılan kısımlar (süpernatantlar) alındı, alttaki çökeltiler (pelletler) atıldı.

#### Protein Miktar Tayini

Homojenize edilmiş dokuların protein miktar tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Sığır serum albumini (1µg/ml) kullanılarak 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10 (µg/ml) konsantrasyonlarda standart hazırlanıp her bir örnekten 10 µl alınarak distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Standart ve örneklerin üzerine 1ml Bradford solüsyonu eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 595 nanometre dalga boyunda absorbans miktarları manuel olarak ölçüldü. Prism programında çizilen standart eğriye göre protein miktar tayini µg/µl cinsinden yapıldı.

#### ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Testi

Siklooksijenaz-2, fosfolipaz A2, ve iNOS enzimlerinin ekspresyon ve aktiviteleri ELISA testi ile incelenecektir.

Grafiklerin çizimi ve istatistiksel analiz için bilgisayar ortamında Graph-Pad Prism (CA, USA) programı kullanıldı. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc testi olarak Bonferroni kullanıldı. 0.05'den küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### ELİSA Fosfolipaz A2 Enzim Miktar Tayini

Sigara dumanı maruziyeti akciğerlerdeki Fosfolipaz A2 enziminin artışına neden olurken kantaron ekstresi uygulamasının bu artışı geri çevirmiştir (şekil 1).

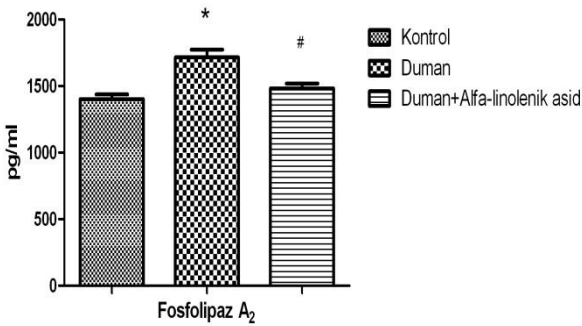
### ELİSA Siklooksijenaz-2 Enzim Miktar Tayini

Sigara dumanı maruziyeti akciğerlerdeki siklooksijenaz-2 enziminin artışına neden olurken kantaron ekstresi uygulaması bu artışı anlamlı olarak azalttı (şekil 2).

### ELİSA iNOS Enzim Miktar Tayini

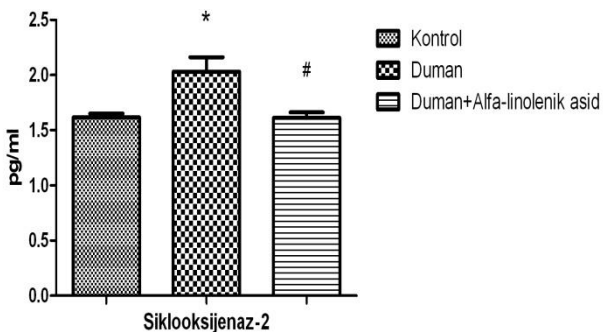
Sigara dumanı maruziyeti akciğerlerdeki iNOS enziminin artışına neden olurken kantaron ekstresi uygulaması bu artışı anlamlı olarak azalttı (şekil 3).

### Şekil 1. Sigara dumanı maruziyeti akciğerlerdeki fosfolipaz A2 enzimine etkisi (n=6).



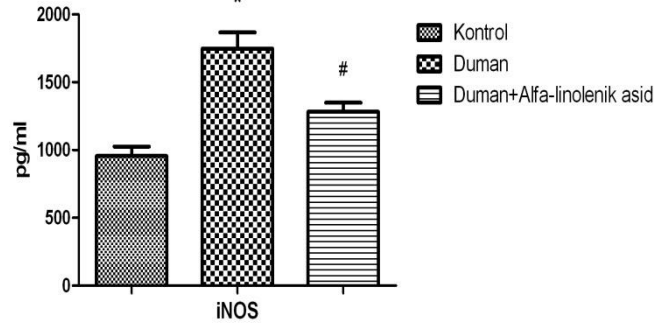
İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (\* : Kontrolle göre P<0.05. #: Duman kontrolle göre P<0.05).

### Şekil 2. Sigara dumanı maruziyeti akciğerlerdeki siklooksijenaz-2 enzimine etkisi (n=6).



İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (\* : Kontrolle göre P<0.05. #: Duman kontrolle göre P<0.05).

### Şekil 3. Sigara dumanı maruziyeti akciğerlerdeki iNOS enzimine etkisi (n=6).



İstatistiksel analiz: ANOVA. Post hoc: Bonferroni. (\* : Kontrolle göre P<0.05. #: Duman kontrolle göre P<0.05).

### TARTIŞMA

Çalışmamızda inflamatuvar yanıtta biyolojik mediyatör olarak görev yapan indüklenebilir nitrik oksit sentaz, fosfolipaz A2 ve siklooksijenaz-2 enzimlerini değerlendirdik.

Sigara dumanının, inflamasyon mekanizmalarında önemli rolleri olan siklooksijenaz-2 ve fosfolipaz A2 enzimini arttırdığı diğer çalışmalarda gösterilmiştir (23-24). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde sigara dumanı siklooksijenaz-2, Fosfolipaz A2 ve iNOS enzimlerinin miktarında artışa neden olurken antiinflamatuvar özelliği gösterilen alfa-linolenik asit bu artışları anlamlı olarak azalttı. Yapılan bir çalışmada sigara dumanının NADPH oksidaz enziminin aktivitesini indükleyerek hücre içi süperoksit radikallerinin üretimini arttırdığı ve bu artışın da sitozolik fosfolipaz A2 enzim düzeyini yükselttiği gösterilmiştir. Bu artışın proinflamatuvar gen transkripsiyonunu aktifleyen MAPKs yolağı, NF-kB, ve AP-1 faktörlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir (25). Yapılan bir başka çalışmada da benzer şekilde sigara dumanının siklooksijenaz-2 enzimini arttırdığı ortaya konmuştur. Bu artışın PKC/c-Src/EGFR ve PDGFR/PI3K/Akt PDGFR/PI3K/Akt

sinyalizasyon yollarının aktive edilmesiyle artan NF-kB ve p300 inflamatuvar transkripsiyon faktörlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir (23). Fosfolipaz A2 inflamasyon mekanizmasında en üst basamakta yer almaktadır ve membran fosfolipidlerinden siklooksijenaz-2 enziminin substratı olan araşidonik asit sentezine neden olmaktadır. Alfa-linolenik asit ile bu basamağın inhibisyonu, inflamasyonu başlangıç aşamada inhibe edeceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar sigara dumanı oksidatif stres kaynaklı iNOS aktivitesinin artmasına bağlı peroxynitrite (ONOO-) üretimini artırdığını göstermiştir (26). Ayrıca iNOS aktivitesinin ve peroxynitritin COX-2 aktivitesinin artışına neden olduğu gösterilmiştir. Alfa-linolenik asit antioksidan özelliğinden dolayı oksidatif stresi azaltması iNOS ve COX-2 enzimlerinde azalmaya neden olmuş olabilir.

Sigara dumanı siklooksijenaz-2, Fosfolipaz A2 ve iNOS enzimlerinin miktarında artışa neden olarak sitokinlerin, kemokinlerin ve adhesyon moleküllerinin sentezlenmesiyle monosit ve makrofajların migrasyonlarının artmasına bağlı akciğer harına neden olacaktır. Çalışmamız alfa-linolenik asit ile bu enzimlerin inhibisyonuna neden olarak monosit ve makrofajların migrasyonlarını engelleyip akciğer hasarına karşı koruyucu olacağını göstermiştir.

Sonuç olarak sigara kullanımıyla birlikte alfa-linolenik asit diyetinin sigaranın neden olduğu olumsuz etkileri azaltmaya yardımcı olabileceğini göstermiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından TF2014BAP5 no.lu proje ile desteklenmiştir

## REFERANSLAR

1. Barua RS, Ambrose JA, Reynolds LJE, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC, Heavy and light cigarette smokers have similar dysfunction of endothelial vasoregulatory activity. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;1758–63
2. Tell GS, Polak JF, Ward BJ, Kittner SJ, Savage PJ, Robbins J. Relation of smoking with carotid artery wall thickness and stenosis in older adults. *The Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group. Circulation*. 1994;90:2905–08.
3. Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH. Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals. *Circulation*. 1992;86:1664–69.
4. Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001;158:257–67.
5. Tsuchiya M., Asada A., Kasahara E., Sato EF, Shindo M., Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* 2002;105: 1155-57
6. Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension*. 2006;48(2):278-85.
7. Guo X, Oldham MJ, Kleinman MT, Phalen RF, Kassab GS. Effect of cigarette smoking on nitric oxide, structural, and mechanical properties of mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(5):2354-61.
8. Li T, Molteni A, Latkovich P, Castellani W, Baybutt RC. Vitamin A depletion induced by cigarette smoke is associated with the development of emphysema in rats. *J Nutr*. 2003;133(8):2629-34.
9. Tanriverdi H, Evrengul H, Kuru O, Tanriverdi S, Selec D, Enli Y, et al. Cigarette smoking induced oxidative stress may impair endothelial function and coronary blood flow in angiographically normal coronary arteries. *Circ J*. 2006;70(5):593-99.
10. Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 2002;112:298–04.
11. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, et al. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon diet heart study. *Circulation* 1999;99:779–85.
12. Gerster H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid

- (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68:159–73.
13. Ogawa A, Suzuki Y, Aoyama T, Takeuchi H. Dietary alpha-linolenic acid inhibits angiotensin-converting enzyme activity and mRNA expression levels in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Oleo Sci.* 2009;58(7):355-60.
  14. Takeuchi H, Sakurai C, Noda R, Sekine S, Murano Y, Wanaka K et al. Antihypertensive effect and safety of dietary alpha-linolenic acid in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *J Oleo Sci.* 2007;56(7):347-60.
  15. Alessandri C, Pignatelli P, Loffredo L, Lenti L, Del Ben M, Carnevale R, Perrone A, Ferro D, Angelico F, Violi F. Alpha-linolenic acid-rich wheat germ oil decreases oxidative stress and CD40 ligand in patients with mild hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(11):2577-78.
  16. Ren J, Chung SH. Anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Agric Food Chem.* 2007;55(13):5073-80.
  17. Norum, K.R., Drevon,C.A.. Dietary omega-3 fatty acids and cardiovascular diseases. *Arteriosclerosis*, 1986; 6: 352-55.
  18. Bayazit, A. A. Doymamış yağ asitlerinin beslenme ve sağlık açısından önemi. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 2003; 3: 28-31.
  19. Farrell, D.J. The hearty egg. *Poultry Digest*, 1992;7: 20-22.
  20. Farrell, D.J. Une's designer egg. *Poult. Int.* 1993;32: 62-66.
  21. Lewis N.M., Seburg, S., Flanagan, N.L. 2000. Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poult. Sci.* 1993;79: 971-74.
  22. Leaf, A.,Weber, P.C. Cardiovascular effects of  $\omega$ -3 fatty acids. *The New Engl. J.Of Med.* 1988; 318:549-57.
  23. Cheng SE, Luo SF, Jou MJ, Lin CC, Kou YR, Lee IT, Hsieh HL, Yang CM. Cigarette smoke extract induces cytosolic phospholipase A2 expression via NADPH oxidase, MAPKs, AP-1, and NF-kappaB in human tracheal smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2009 1;46(7):948-60
  24. Yang CM, Lee IT, Lin CC, Yang YL, Luo SF, Kou YR, Hsiao LD. Cigarette smoke extract induces COX-2 expression via aPKCalpha/c-Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt/NF-kappaB pathway and p300 in tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297(5):L892-02.
  25. Tithof PK, Richards SM, Elgayyar MA, Menn FM, Vulava VM, McKay L, et al. Activation of group IVC phospholipase A(2) by polycyclic aromatic hydrocarbons induces apoptosis of human coronary artery endothelial cells. *Arch Toxicol.* 2011 Jun;85(6):623-34.
  26. Ozbek E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. *International Journal of Nephrology.* 2012;2012:465897. doi: 10.1155/2012/465897.