



## AKUT AKCİĞER HASARI MODELİNDE HİSPİDULİNİN HEPATOPROTEKTİF ROLÜNÜN KARACİĞER BİYOMOLEKÜLER KOMPOZİSYONU DEĞİŞİMLERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nihal ŞİMSEK ÖZEK<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Atatürk University, Faculty of Science, Department of Biology, 25240, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup>Atatürk University, East Anatolia High Technology Application and Research Center (DAYTAM), 25240, Erzurum, Türkiye

**Özet:** Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), ciddi hipoksemi, pulmoner ödem, pulmoner hücrel infiltrasyon ve yaygın alveoler hasar ile karakterize edilen ani solunum yetmezliğinin bir çeşit semptom kompleksidir. ARDS olan kritik hastalar, karaciğer fonksiyonunun bozulması açısından yüksek risk altındadır çünkü karaciğer, mediatörleri düzenleyen ve enflamatuar bozukluklar sırasında organ etkileşimlerini modüle eden önemli bir organdır. Bu nedenle ARDSli hastalarda karaciğeri koruyacak hepatoprotektif özellikte yeni ajanların belirlenmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, oleik asit kaynaklı akut akciğer hasarı sıçan modelinde Hispidulin'in potansiyel hepatoprotektif aktivitesi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi ve denetimsiz örüntü tanıma yöntemleri kullanılarak biyokimyasal kompozisyon değişiklikleri açısından belirlenmiştir. Çalışmada erkek Sprague Dawley cinsi sıçanlardan I. Kontrol, II. ARDS, III. ARDS + Hispidulin olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Kontrol grubu hariç diğer iki gruba 50µL Oleik asit intravenöz olarak verilmiştir. Grup III'teki hayvanlara Oleik asit enjeksiyonlarından bir saat önce 80 mg/kg intraperitoneal Hispidulin uygulanmıştır. Gruplar arasındaki bağıntıları ve biyomoleküler değişimleri belirlemek için elde edilen spektrumlara temel bileşen analizi (TBA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) uygulandı. PCA skor ve HCA dendrogram grafiklerine göre, ARDS grubu %100 doğruluk, özgüllük ve duyarlılık değeri ile diğer iki gruptan ayrı bir yerde konumlanmıştır. PCA analizinde elde edilen yüklem grafikleri özellikle ARDS kaynaklı karaciğer protein, lipit, kollajen ve nükleit asit içeriğinde değişimlerin olduğunu, hispidulin önuygulamasının bu değişimlerin oluşmasını engellediğini, akut akciğer hasarında hepatoprotektif potansiyeli olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** ATR-FTIR spektroskopisi, Hispidulin, ARDS, Temel bileşen analizi, Hiyerarşik kümeleme analizi, Biyomoleküler kompozisyon


### Evaluation of Hepatoprotective Role of Hispidulin in Terms of Liver Biomolecular Composition Changes in Acute Lung Injury Model

**Abstract:** Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a symptom complex of sudden respiratory failure characterized by severe hypoxemia, pulmonary edema, pulmonary cellular infiltration, and diffuse alveolar damage. Critically ill patients with ARDS are at high risk for impaired liver function because the liver is a vital organ that regulates mediators and modulates organ interactions during inflammatory disorders. Therefore, there is a need to identify new hepatoprotective agents to protect the liver in patients with ARDS. In the present study, the potential hepatoprotective activity of Hispidulin in the oleic acid-induced ARDS rat model was determined regarding biochemical composition changes using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and unsupervised pattern recognition methods. In this study, three groups of male Sprague Dawley rats were formed as I. Control, II. ARDS, III. ARDS + Hispidulin. Except for the control group, the other two groups received 50µL Oleic acid intravenously. Group III animals were administered Hispidulin 80 mg/kg intraperitoneally one hour before Oleic acid injections. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were applied to IR spectra to determine the relationships and biomolecular changes between the groups. According to the PCA score and HCA dendrogram graphs, the ARDS group was well discriminated from the other two groups with 100% accuracy, sensitivity and specificity. The PCA loading plot showed the changes in liver protein, lipid, collagen, and nucleic acid contents, mainly due to ARDS; hispidulin preadministration prevented these changes, indicating the hepatoprotective potential of hispidulin in acute lung injury.

**Keywords:** ATR-FTIR spectroscopy, Hispidulin, ARDS, Principal component analysis, Hierarchical cluster analysis, Biomolecular composition

\*Sorumlu yazar (Corresponding author): Atatürk University, Faculty of Science, Department of Biology, 25240, Erzurum, Türkiye

E mail: nsozek@yahoo.com (N. ŞİMSEK ÖZEK)

Nihal ŞİMSEK ÖZEK  <https://orcid.org/0000-0002-7326-5670>

Gönderi: 13 Temmuz 2023

Kabul: 04 Eylül 2023

Yayınlanma: 15 Ekim 2023

Received: July 13, 2023

Accepted: September 04, 2023

Published: October 15, 2023

Cite as: Şimsek Özek N. 2023. Evaluation of hepatoprotective role of hispidulin in terms of liver biomolecular composition changes in acute lung injury model. BSJ Eng Sci, 6(4): 394-400.



## 1. Giriş

Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), ciddi hipoksemi, pulmoner ödem, pulmoner hücrel infiltrasyon ve yaygın alveoler hasar ile karakterize edilen ani solunum yetmezliğinin bir çeşit semptom kompleksidir (Meyer ve ark., 2021). ARDS, toksik gazlar, çoklu travma, sepsis, grip virüsü enfeksiyonu, pankreatit ve gastrik muhtevanın aspirasyonu gibi çeşitli etmenler nedeniyle oluşabilmektedir (Anan ve ark., 2018). Bu etmenlerin yanı sıra, şiddetli Akut Solunum Sendromu-Coronavirus-2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu koronavirüs 2019 (COVID-19) formuna sahip hastalarda da ARDS tablosu hızla gelişmektedir (Kaya ve Kaya, 2020; Kamyshnyi ve ark., 2020). Günümüzde COVID-19'a yakalanan hastaların %96,7'sinde önde gelen ölüm nedeninin ARDS olduğu rapor edilmiştir (Aydın ve Çöl, 2020; Nardo ve ark., 2021). Küresel bakımdan ise ARDS, yoğun bakım ünitesi kabullerinin %10'unu ve mekanik ventilasyonların %23'ünü oluşturmaktadır ve yılda yaklaşık 3 milyon kişinin hayatını tehdit etmektedir (Bellani ve ark., 2016; Papazian ve ark., 2019).

ARDS, organlarda ve organ sistemlerinde önemli yapısal ve hücrel değişikliklere neden olabilir. Organlar içerisinde karaciğer hasarı, en yaygın görülen ARDS komplikasyonudur (Herrero ve ark., 2020). COVID-19 hastalarında da karaciğerin akciğerlerden sonra en çok hasar gören ikinci organ olduğu görülmektedir (Hu ve ark., 2020; Li ve Fan 2020). ARDS'li hastalarda pulmoner immünoisitler tarafından üretilen IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sinyal molekülleri, sistemik dolaşıma katılmak üzere akciğerleri terk ederek karaciğerde akut faz yanıtına sebep olmaktadır (Guillot ve Tacke 2019). ARDS, hipoksemi, sistemik inflamatuvar yanıt aktivasyonu ve kardiyovasküler değişimlere neden olarak karaciğer fonksiyonunu bozabilmekte (Yang ve ark., 2019) ve şiddetli ARDS vakaları, sarılık, asit, karaciğer ensefalopatisi ve hipoagülasyon ile karakterize edilen karaciğer yetmezliği ile sonuçlanabilmektedir (Cai ve ark., 2015). Karaciğer, mediatörleri düzenleyen ve enflamatuvar bozukluklar sırasında organ etkileşimlerini modüle eden önemli bir organdır. Dolayısıyla karaciğer fonksiyonu, akut solunum sıkıntısı sendromunun patogenezi ve çözümünde kritik bir tanı olarak tanınmakta ve bu hastaların prognozunu önemli ölçüde etkilemektedir (Redko ve ark., 2021).

Bitkiler ve bitkisel kaynaklı ürünler, uzun süredir hem geleneksel hem de modern klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hispidulin, bitkilerde bulunan güçlü antioksidan, anti-inflamatuvar, antikanser ve anti-trombotik dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip doğal bir flavonoiddir (Liu ve ark., 2020). Şimdiye kadar yapılan yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda hispidulinin karaciğer üzerine olumlu etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Wu ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019; Lee ve ark., 2022). ARDS'nin patogenezi karaciğer-akciğer etkileşiminin ve özellikle hispidulinin hepatoprotektif etkisinin değerlendirilmesinde biyomoleküler içerik açısından

değişimlere yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. ARDS kaynaklı karaciğer bozukluğunu engellemek için özellikle uzun vadeli bir COVID-19 pandemisi göz önüne alındığında hepatoprotektif aktivitenin değerlendirilmesine dayalı yeni araştırmaların yapılması gereklidir. Bu nedenle, söz konusu çalışmada sıçanlarda oleik asitle oluşturulan akut akciğer hasarı modelinde, hispidulinin koruyucu potansiyelinin doku lipit, protein ve nükleik asit kompozisyonundaki değişimler açısından belirlenmesi amaçlanmıştır. Söz konusu değişimleri belirlemek ve değişimlere dayalı gruplar arasındaki bağlantıları ortaya koymak için Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi tekniği ile birlikte gözetimsiz örüntü tanımlama teknikleri kullanılmıştır. FTIR spektroskopisi kemometrik analizlerle birlikte hücre ve doku olmak üzere çalışılan tüm materyallerde içeriksel değişimleri kullanıcıdan bağımsız, kısa süreli, düşük maliyetli, doğru ve güvenilir bir şekilde ortaya koyan tekrarlanabilirliği yüksek bir metod olduğu için çeşitli disiplinlerde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Türker-Kaya ve ark., 2020; Elibol ve ark., 2022; Yonar ve ark., 2022).

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Deneysel Hayvanları ve ARDS Modelinin Oluşturulması

Bu çalışma için Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM)'den erkek Sprague Dawley sıçanlar (300-350 g) temin edildi. Sıçanlar deneysel prosedüre başlamadan önce standart koşullarda muhafaza edildi (20-22 °C sıcaklık, %40-50 nem, 12 saat ışık/gün döngüsü).

Hayvanların olası acı çekmelerini en aza indirmek için her türlü çaba gösterildi ve çalışma, ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yayınlanan Labnortuar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzuna göre yapıldı. Tüm hayvanlar, her grupta 6 hayvan olmak üzere rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı:

Grup I (6 hayvan) —Kontrol (Sağlıklı Grup)

Grup II (6 hayvan) —Oleik asit (ARDS)

Grup III (9 hayvan) —Oleik asit + Hispidulin (ARDS+HİS)

Grup II ve III sıçanlarına %1 lik BSA içinde hazırlanmış 50 mcl oleik asit kuyruk venlerinden uygulandı, Grup II sıçanlarına uygulamadan bir saat önce 80 mg/kg hispidulin intraperitoneal olarak verildi. 24 saat sonra akut akciğer hasarı en yüksek seviyeye ulaşınca sıçanlar yüksek doz ketamin anestezisiyle birlikte intrakardiyak yöntemle kan alınarak ötenazi edildi ve deney sonlandırıldı. Daha sonra karaciğer doku örneklerinden bir kısmı biyokimyasal testler ve FTIR analizi için steril plastik petrilere alınıp -80 °C'de saklandı.

### 2.2. Karaciğer Dokularından FTIR Spektrumunun Toplanması

Karaciğer dokularının spektrumları, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında 4  $\text{cm}^{-1}$  spektral çözünürlük ve 32 tarama ile ATR modlu (Bruker Vertex 70 FTIR spektrometre,

Ettlingen, Almanya) FTIR spektroskopisi kullanılarak toplandı. Atmosferik su buharı ve CO<sub>2</sub>'nin katkısını önlemek için arka plan spektrumu toplandı ve doku spektrumlarından otomatik olarak çıkarıldı. Her örnekten 3er kez spektrum elde edildi ve her alınan spektrumların ortalaması alındı. Her bir grup için 6 adet spektrum toplanmış oldu. Spektral verilerin toplanması ve sinyali işleminde OPUS 7.5 yazılımı (Bruker Optics, GmbH) kullanıldı.

### 2.3. FTIR Spektrumlarının Kemometrik Analizi

Kemometrik analiz öncesi spektrumlara, gürültüyü elimine etmek amacıyla Savitzky Golay düzleştirme (düzleştirme noktası:9), sonrasında baseline düzleştirme (concave-rubber band baseline correction) yapıldı. İşlenmiş spektrumlara 3670-900 cm<sup>-1</sup> spektral bölgede çoklu değişkenli gözetimsiz (unsupervised) kemometrik analiz yöntemlerinden temel bileşen analizi (principle component analysis-PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (hierarchical cluster analysis-HCA) uygulandı. Kemometrik analizler Unscrambler X 10.3 (CAMO Software AS., Oslo, Norveç) yazılımı kullanılarak yapıldı. PCA sonuçları skor ve yükleme grafiği olarak, HCA ise Ward algoritmasından elde edilen dendrogram grafiği olarak verildi. HCA dendrogram grafiğinden Tablo 1'de verilen gruplar göz önüne alınarak, formüller yardımıyla doğruluk, özgüllük ve duyarlılık hesaplandı. Yükleme grafiğinde elde edilen spektral bantların her bir temel bileşendeki yüzde varyasyon katkı değerleri belirtildi.

**Tablo 1.** Duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerlerinin hesaplanması

Gruplar	HCA Dendrogram Sonucu	
	Pozitif	Negatif
ARDS	A	B
Kontrol, ARDS+Hispidulin	C	D

Duyarlılık= (Ax100) / (A+B), Özgüllük= (Dx100) / (C+D),  
Doğruluk = [(A+D) X100] / (A+D+B+C).

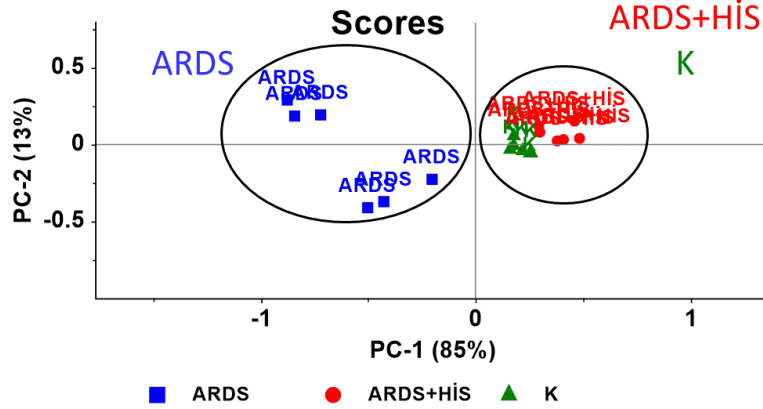
### 3. Bulgular ve Tartışma

Karaciğer, metabolik homeostazın düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir organ olduğu için karaciğer fonksiyonunun bozulması, enerji arzının kesilmesi nedeniyle diğer organları da etkilemektedir (Rui, 2014). Ayrıca karaciğer, toksin ve ilaç metabolizmasında, sistemik inflamatuvar yanıt düzenlenmesinde ve immün korumada görevlidir. Hepatobilier sistem, sistemik dolaşımdaki proinflamatuvar sitokinleri, vazoaktif mediatörleri ve eikozanoidleri etkisiz hale getirdiği ve detoksifiye ettiği için akciğerleri ve diğer organları hasardan koruyan bir organdır (Guillot ve Tacke 2019). Dolayısıyla karaciğerin normal çalışması, akciğerlerin korunması veya akciğerlerin geçirdiği herhangi bir hasar sonrasında iyileşmesi için gereklidir (Herrero ve ark., 2020). Diğer taraftan karaciğer ve akciğerler arasındaki bağlantının dengesizliği, ARDS'nin ilerlemesinde ve çoklu organ yetmezliğinin ortaya çıkmasında önemli bir

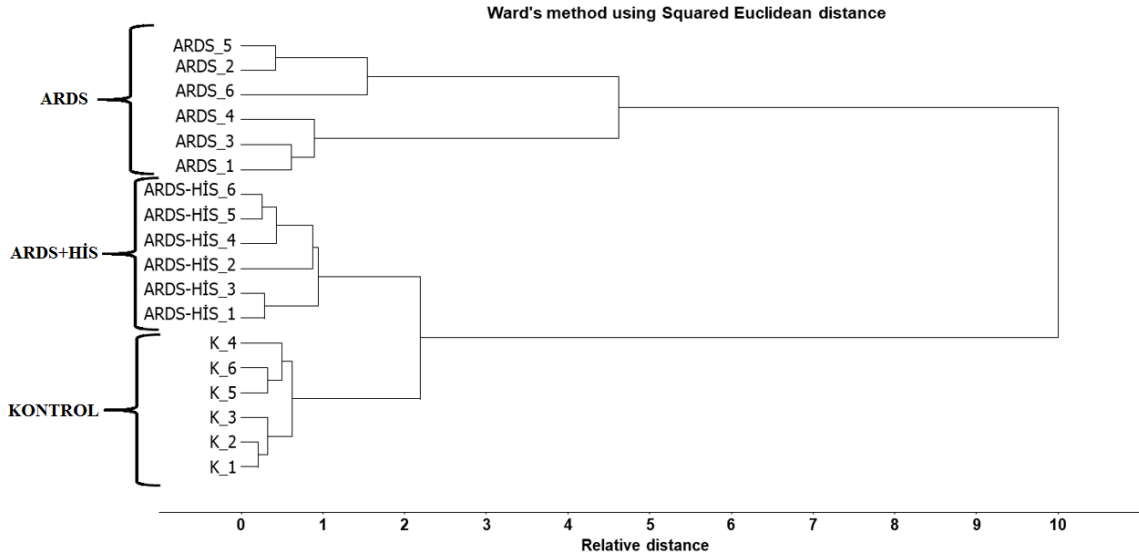
faktördür (Hilliard ve ark., 2015). Bu çalışmada ARDS kaynaklı karaciğer doku biyomoleküllerinde içeriksel değişimlerini belirlemek amacıyla FTIR spektroskopi metodu kullanılmıştır. Çünkü örneklere ait FTIR spektrumu örneğe karakteristik parmak izi niteliğinde biyomoleküllere ait fonksiyonel grup titreşimlerinden kaynaklanan spektral bantlar içermektedir (Severcan ve Haris, 2012). Bu bantlardan kalitatif ve kantitatif spektral analizler yapılarak biyomoleküler kompozisyon değişimlerini belirlemek mümkündür. Ancak IR spektrumunda toplanan spektral bant aralığı dalga sayısı ve absorpsiyon değerleri açısından dikkate alındığında, tek bir örneğe ait spektrumda dahi binlerce veri bulunmaktadır. Spektral verinin bant alanı, bant genişliği ile bant dalgasayısı gibi kantitatif spektral analizler manuel olarak yapıldığından uzun zaman almaktadır. Son yıllarda spektroskopi temelli yapılan çalışmalarda spektral analizlerde hem analiz süresini kısaltmak, hem de doğru ve etkin bir analiz yapmak için çok değişkenli analiz yöntemi olan kemometrik analiz metodları yaygın olarak kullanılmaktadır (Craig ve ark., 2013; Sauzier ve ark., 2021). Bu metodlar çok değişkenli spektral varyasyonlara dayalı olarak gruplar arasındaki farklılıkların ortaya konulmasını ve örnek içindeki spesifik analit miktarının belirlenmesini sağlar. Gruplar arasındaki ilişkileri, kümeleşmeleri belirlemek için herhangi bir ön bilgi gerektirmeyen gözetimsiz kemometrik analiz yöntemlerinden Temel Bileşen Analizi (PCA) ile Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) yaygın olarak kullanılmaktadır (Severcan ve Haris 2012; Abbas ve ark., 2018; Sauzier ve ark., 2021). Son yıllarda, diyabetten kansere kadar birçok farklı hastalığın teşhisinde, bitki özütü veya farklı bileşiklerin koruyucu ve/veya tedavi edici özelliklerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda FTIR spektroskopisi ile birlikte bu analiz metodlarının etkin olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (Severcan ve Haris 2012; Gok ve ark., 2016; Gurbanov ve ark., 2016; Abbas ve ark., 2018; Faelelbom ve ark., 2022). Bu nedenlerden ötürü, K, ARDS ve HİS+ARDS gruplarında gruplar arasındaki bağlantıları belirlemek amacıyla karaciğer spektrumlarına PCA analizi uygulanmıştır. Bu bağlantılar PCA'dan elde edilen skor ve yükleme grafiklerinin değerlendirilmesi ile ortaya konulmaktadır (Roggo ve ark., 2007; Gurbanov ve ark., 2018). Şekil 1'de her üç gruba ait PCA skor grafiği verilmektedir. Skor grafiği verilerine göre ARDS group diğer iki gruptan ayrı bir yerde konumlanmaktadır. K ve HİS+ARDS gruplarında ise yer alan örnekler aynı bölgede yer almaktadır. Skor grafiklerinde ise gruplar arasında yer alan spektral varyasyonlar temel bileşenler (Principal Component, PC), % olarak ifade edilmektedir. En çok varyasyon PC1, diğer varyasyonların en yükseği ise PC2 ile ifade edilmektedir (Gurbanov ve ark., 2018; Dizaji ve ark., 2021). Her üç gruba ait skor grafiklerine bakıldığında PC1 ve PC2 için %86 ve %12 varyasyon değerleri elde edilmiş gruplar arasında toplam varyasyon oranı %98 olarak bulunmuştur. Bu değer, gruplar arasında özellikle ARDS

ve diğer iki grup arasında spektral biyokompozisyonda önemli oranda değişimlerin olduğunu ortaya koymaktadır. PCA skor grafiğinde elde edilen gruplaşma bulgularını desteklemek amacıyla gözetimsiz kemometrik analiz yöntemlerinden sınıflandırma metodu olan HCA uygulanmıştır. HCAda sınıflar dendrogramda yer alan clusterlar ile gösterilmektedir (Roggo ve ark., 2007; Gurbanov ve ark., 2018; Dizaji ve ark., 2021). Benzer örnekler aynı clusterda, farklı örnekler ise farklı clusterda yer almaktadır. Örnekler arasındaki farklılıklar uzaklık/heterojenlik birimi ile ifade edilmektedir. Aynı

clusterda yer alan örneklerin birbiri arasındaki uzaklık değeri yüksektir (Siqueira ve Lima, 2016). Şekil 2'de K, ARDS ve ARDS+HİS gruplarına ait HCA dendrogram grafiği verilmektedir. PCA bulguları ile benzer olarak ARDS, K ve ARDS+HİS gruplarına göre farklı bir clusterda yer almakta olup, uzaklık değeri olarak 10 elde edilmiştir. ARDS ayırımında %100 duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değeri elde edilmiştir. K ve ARDS+HİS gruplarında ise bu değer 2 olarak elde edilmiştir, değer düşük olması her iki grup arasında karaciğer doku biyokimyasal kompozisyonun benzer olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. Kontrol, ARDS, ve ARDS-HİS gruplarına ait 3670-900 cm<sup>-1</sup> spektral bölgede uygulanan PCA skor grafiği.



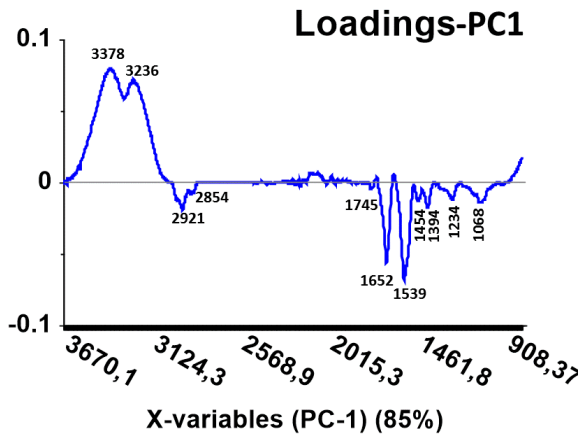
Şekil 2. Kontrol, ARDS, ve ARDS-HİS gruplarına ait 3670-900 cm<sup>-1</sup> spektral bölgede uygulanan HCA dendrogram grafiği.

ARDS ve hispidulin uygulanmasına bağlı, gruplar arası ayırma neden olan karaciğer dokusu biyomoleküllerindeki kalitatif ve kantitatif değişimleri belirlemek için PCA yükleme grafikleri kullanılmaktadır. Yükleme grafikleri, örnek spektrumlarına benzer grafiklerdir. Bu nedenle yükleme grafiğinin kalitatif ve kantitatif analiz, spectral bantlarının daha iyi yorumlamasını sağlar (Pocasap ve ark., 2020; Dizaji ve ark., 2021). Grafikte x eksenı dalgasayısına karşılık gelen spektral bantlar, y eksenı ise bu bantlara karşılık elde edilen eigen değerleri ile gösterilmektedir. Yüksek pozitif eigen ve negatif eigen değeri, spektral varyasyon

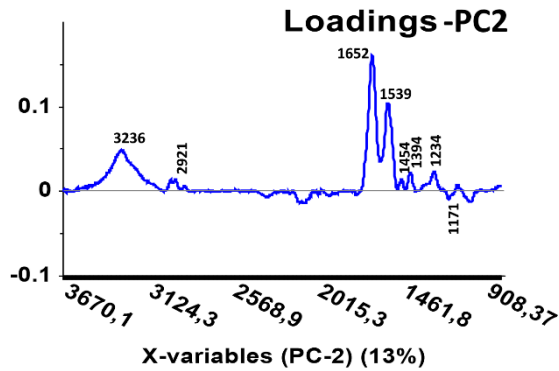
değerinin yüksek olduğunu ve gruplar arasındaki ayırma katkı oranının önemli olduğunu belirtmektedir. PC1 ve PC2 için yükleme grafikleri Şekil 3 ve 4'de verilmektedir. Her iki PC de, 3700-2800 ile 1800-900 cm<sup>-1</sup> spektral bölgesinde eigen değeri yüksek birçok spektral bant elde edilmiştir. Varyasyonları ve bunları PClere olan katkısını belirlemek için, bantların konumu ile bant tanımları belirlenerek PC1 ve PC2 için bant varyasyonları hesaplanmıştır (Tablo 2).

**Tablo 2.** PCA yüklem grafiklerinde yer alan IR spektral bantların tanımı ve PC1 ve PC2deki açıklanan % varyasyonları

Bant Konumu	PC1	PC2	Bant Tanımı	Referans
3378	98,93	99,95	Amit A: peptit N-H gerilme, titreşimi,-OH gerilme	Dominguez-Vidal ve ark., 2016
3236	96,48	99,90	Amit A: peptit N-H gerilme, titreşimi,-OH gerilme	Dominguez-Vidal ve ark., 2016
2921	91,28	95,45	CH <sub>2</sub> asimetrik gerilme: lipit	Zohdi ve ark., 2015
2854	91,19	92,45	CH <sub>2</sub> simetrik gerilme:lipit	Zohdi ve ark., 2015
1745	80,58	90,22	C=O gerilme trigliserit kolesterol ester	Gautam ve ark., 2016
1652	50,19	99,54	amit I—α-helix, protein	Çakmak ve ark., 2003
1539	73,40	99,91	Amit II, protein	Çakmak ve ark., 2003
1454	87,01	98,07	CH <sub>3</sub> makaslama titreşimi:lipit	Severcan ve ark., 2000
1394	81,77	99,53	CH <sub>3</sub> simetrik bükülme titreşimi: proten ve lipit	Mihály ve ark., 2017
1234	61,44	94,86	PO <sub>2</sub> - antisimetrik gerilme:Fosfolipit, nükleik asit	Mehra ve ark., 2020
1171	93,60	94,64	kollajen	Zohdi ve ark., 2015
1068	71,20	71,87	C-O gerilme fosfodiester, riboz	Ashtarinezhad ve ark.,2014
921	79,27	81,52	Nükleik asit, RNA riboz	Ami ve ark.,2013



**Şekil 3.** Kontrol, ARDS, ve ARDS-HİS gruplarına ait 3670-900 cm<sup>-1</sup> spektral bölgede uygulanan PCA analizi PC1'e ait yüklem grafiği.



**Şekil 4.** Kontrol, ARDS, ve ARDS-HİS gruplarına ait 3670-900 cm<sup>-1</sup> spektral bölgede uygulanan PCA analizi PC2'e ait yüklem grafiği.

PC1 yüklem grafiğinde en yüksek eigen değerine sahip bant 3378,3236,1652,1539 cm<sup>-1</sup>, PC2 de ise en yüksek eigen değerleri 1652, 1539 cm<sup>-1</sup> bantlar için elde edilmiştir. Protein kaynaklı bu iki bantın % değerleri PC2 de %99,54 ve 99,91 olarak bulunmuştur. PC1 da

varyasyon yüzdelerinde yükseklik bakımından diğer bantlar incelendiğinde 2921 için % 91,28, 2854 için % 91,19 elde edilmiştir. Kollajen kaynaklı 1171 bantı için bu oran %93,60, nükleik asit kaynaklı 1234 bant için PC2de %94,86 olarak hesaplanmıştır. RNA kaynaklı 921 cm<sup>-1</sup> de yer alan bant için varyasyon yüzdesi %81,52 olarak bulunmuştur. Söz konusu bantlardaki yüksek varyasyon değerleri belirtilen makromoleküllerde gruplar arası değişimlerin yüksek olduğunu göstermektedir. Özellikle PCA ve HCA analizlerinde ARDS grubunu diğer çalışılan iki gruba göre ayrı yerde konumlanması, ARDS kaynaklı karaciğer doku lipit nükleik asit ve protein içeriğinde kantitatif değişimlerin oluşmasını engellediğini ortaya koymaktadır. ARDS grubunda oluşan içeriksel değişimler, hastalık kaynaklı artan oksidatif stresle ilgili olabilir. Çünkü artan oksidatif stres doku biomoleküler kompozisyonunda yıkımlara neden olmaktadır. Hispidulin protektif amaçlı uygulamasında bu tür değişimlerin engellenmesi molekülün antioksidant özelliği ile ilgili olabilir. Hispidulinin karaciğerde antioksidan özelliği Ferrandiz ve ark. (1994) tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, 50-150 mg/kg doz aralığında hispidulin uygulamasının karaciğerde lipit peroksidasyonu azalttığı, 150 mg/kg dozun MDA oluşumunu engellediği belirtilmiştir. CCl<sub>4</sub> karaciğer toksisitesine karşı hispidulinin hepaprotektif özelliği Jin ve ark. (2011) ile yapılan çalışma ile gösterilmiş ve 300 mg/kg dozda hispidulin uygulamasının karaciğer enzimleri olan ALT'de 7 kat, AST'de ise 2 kat azalmaya neden olduğu ifade edilmiştir. ARDS kaynaklı lipit, protein ve nükleik asitlerdeki degradasyonun hispidulin uygulanmış sıçanlarda görülmesi ve bu grubun kontrol grubu ile aynı yerde konumlanması söz konusu bileşiğin hepatoprotektif rolünü ve bu bağlamda ARDS hastalarında kullanılabilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

#### 4. Sonuç

Karaciğer-akciğer ekseninin daha iyi anlaşılması, ARDS'lu veya riskini taşıyan hastalarda klinik müdahale için yeni teşhislerin ve terapötik stratejilerin hakkında bilgi sağlanması açısından önemlidir. Günümüzde ARDS tedavisi ve olası komplikasyonları, COVID-19 salgını nedeniyle daha önemli hale gelmektedir. Modern bilimsel veriler, en yaygın ARDS komplikasyonunun karaciğer hasarı olduğunu göstermektedir. ARDS'ye bağlı karaciğer yetmezliği olan hastaların tedavi stratejilerine hispidulinin eklenmesi yaşam kalitelerini artıracaktır.

#### Katkı Oranı Beyanı

Yazarın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Yazar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	N.Ş.Ö.
K	100
T	100
Y	100
VTI	100
VAY	100
KT	100
YZ	100
KI	100
GR	100
PY	100
FA	100

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

#### Çatışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

#### Etik Onay Beyanı

Bu araştırma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (onay tarihi: 22 Aralık 2022, onay numarası: 2022/14).

#### Destek ve Teşekkür Beyanı

Sağladığı imkânlardan dolayı Atatürk Üniversitesi DAYTAM (Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi)'a teşekkür ederim.

#### Kaynaklar

Abbas S, Simsek Ozek N, Emri S, Koksall D, Severcan M, Severcan F. 2018. Diagnosis of malignant pleural mesothelioma from pleural fluid by Fourier transform-infrared spectroscopy coupled with chemometrics. *J Biomed Opt*, 23(10): 105003.

Ami D, Mereghetti P, Doglia SM. 2013. Multivariate analysis for Fourier transform infrared spectra of complex biological systems and processes. *Multivariate Analysis Manag Eng Sci*, 2013: 189-220.

Anan K, Kawamura K, Suga M, Ichikado K. 2018. Clinical differences between pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: a retrospective cohort study of prospectively collected data in Japan. *J Thorac Dis*, 10: 5796.

Ashtarinezhad A, Shirazi FH, Vatanpour H, Mohamzadehasl B, Panahyab A, Nakhjavani M. 2014. FTIR-microspectroscopy detection of metronidazole teratogenic effects on mice fetus. *Iran J Pharm Res*, 13: 101.

Aydın S, Çöl M. 2020. İtalya'daki COVID-19 salgınına genel bir bakış, Editors: Osman Memikoğlu, Volkan Genç, Covid-19, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye, pp: 75.

Bellani G, Laffey JG, Pham T. 2016. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA*, 315: 788-800.

Cai Y, Zou Z, Liu L, Chen S, Chen Y, Lin Z, Chen Y. 2015. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits hepatocyte apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp*, 8(1): 107.

Craig AP, Franca AS, Irudayaraj J. 2013. Pattern recognition applied to spectroscopy: Conventional methods and future directions: Pattern Recognition: Practices, Perspectives and Challenges. Vincent, Eddimburg, UK, pp: 1-46.

Çakmak G, Togan I, Uğuz C, Severcan F. 2003. FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol. *Appl Spectrosc*, 57(7): 835-841.

Dizaji AN, Ozek NS, Yilmaz A, Aysin F, Yilmaz M. 2021. Gold nanorod arrays enable highly sensitive bacterial detection via surface-enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 206: 111939.

Dominguez-Vidal A, Pantoja-de la Rosa J, Cuadros-Rodríguez L, Ayora-Cañada MJ. 2016. Authentication of canned fish packing oils by means of Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem*, 190: 122-127.

Elibol B, Severcan M, JakubowskaDogru E, Dursun I, Severcan F. 2022. The structural effects of Vitamin A deficiency on biological macromolecules due to ethanol consumption and withdrawal: An FTIR study with chemometrics. *J Biophotonics*, 15(7): e202100377.

Fahelbom KM, Saleh A, Al-Tabakha MM, Ashames AA. 2022. Recent applications of quantitative analytical FTIR spectroscopy in pharmaceutical, biomedical, and clinical fields: A brief review. *Rev Anal Chem*, 41(1): 21-33.

Ferrandiz ML, Bustos G, Paya M, Gunasegaran R, Alcaraz MJ. 1994. Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. *Life Sci*, 55(8): PL145-PL150.

Gautam R, Deobagkar-Lele M, Majumdar S, Chandrasekar B, Victor E, Ahmed SM, Nandi D. 2016. Molecular profiling of sepsis in mice using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *J Biophotonics*, 9(1-2): 67-82.

Gok S, Aydın OZ, Sural YS, Zorlu F, Bayol U, Severcan F. 2016. Bladder cancer diagnosis from bladder wash by Fourier transform infrared spectroscopy as a novel test for tumor recurrence. *J Biophotonics*, 9(9): 967-975.

Guillot A, Tacke F. 2019. Liver macrophages: old dogmas and new insights. *HepatoL Commun*, 3(6): 730-743.

Gurbanov R, Bilgin M, Severcan F. 2016. Restoring effect of selenium on the molecular content, structure and fluidity of diabetic rat kidney brush border cell membrane. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1858(4): 845-854.

Gurbanov R, Gozen AG, Severcan, F. 2018. Rapid classification of heavy metal-exposed freshwater bacteria by infrared spectroscopy coupled with chemometrics using supervised method. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 189: 282-290.

Herrero R, Sánchez G, Asensio I, López E, Ferruelo A, Vaquero J. 2020. Liver-lung interactions in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med Exp*, 8(1): 1-13.

Hilliard KL, Allen E, Traber KE, Yamamoto K, Stauffer NM, Wasserman GA. 2015. The lung-liver axis: a requirement for

- maximal innate immunity and hepatoprotection during pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 53(3): 378-390.
- Hu LL, Wang WJ, Zhu QJ, Yang L. 2020. Novel coronavirus pneumonia-related liver injury: etiological analysis and treatment strategy. *Chinese J Hepatol*, 28(2): 97-99.
- Jin XF, Qian J, Lu YH. 2011. The role of hepatoprotective effect of a flavonoid-rich extract of *Salvia plebeia* R. Br. on carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. *J Medic Plant Res*, 5(9): 1558-1563.
- Kamyshnyi A, Krynytska I, Matskevych V, Marushchak M, Lushchak O. 2020. Arterial hypertension as a risk comorbidity associated with COVID-19 pathology. *Int J Hypertens*, 2020: 8019360.
- Kaya AG, Kaya A. 2020. Klinik yaklaşım: Solunum sistemi. Editors: Osman Memikoğlu Volkan Genç, Covid-19, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye, pp: 75.
- Lee D, Lee JH, Kim BH, Lee S, Kim DW, Kang KS. 2022. Phytochemical combination (p-Synephrine, p-octopamine hydrochloride, and hispidulin) for improving obesity in obese mice induced by high-fat diet. *Nutrients*, 14(10): 2164.
- Li J, Fan JG. 2020. Characteristics and mechanism of liver injury in 2019 coronavirus disease. *J Clin Transl Hepatol*, 8(1): 13.
- Liu K, Zhao F, Yan J, Xia Z, Jiang D, Ma P. 2020. Hispidulin: A promising flavonoid with diverse anti-cancer properties. *Life Sci*, 259: 118395.
- Mehra S, Chadha P. 2020. Alterations in structure of biomolecules using ATR-FTIR and histopathological variations in brain tissue of *Channa punctatus* exposed to 2Naphthalene sulfonate. *Toxicol Res*, 9(4): 530-536.
- Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. 2021. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet*, 398: 622-637.
- Mihály J, Deák R, Szegvártó I.C, Bóta A, Beke-Somfai T, Varga Z. 2017. Characterization of extracellular vesicles by IR spectroscopy: fast and simple classification based on amide and CH stretching vibrations. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1859(3): 459-466.
- Nardo AD, Schneeweiss-Gleixner M, Bakail M, Dixon ED, Lax SF, Trauner M. 2021. Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver Int*, 41(1): 32.
- Papazian L, Aubron C, Brochard L. 2019. Formal guidelines: management of acute respiratory distress syndrome. *Ann Intens Care*, 9: 69.
- Pocasap P, Weerapreeyakul N, Junhom C, Phiboonchaiyanan PP, Srisayam M, Nonpunya A, Barusrux S. 2020. FTIR microspectroscopy for the assessment of mycoplasmas in HepG2 cell culture. *Appl Sci*, 10(11): 3766.
- Redko O, Dovgalyuk A, Dovbush A, Nebesna Z, Yakubyshyna L, Krynytska I. 2021. Liver injury associated with acute respiratory distress syndrome and the prospects of mesenchymal stromal cells therapy for liver failure. *Therapy*, 8(12): 14-21.
- Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. 2007. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal*, 44(3): 683-700.
- Rui L. 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4(1): 177.
- Sauzier G, van Bronswijk W, Lewis SW. 2021. Chemometrics in forensic science: approaches and applications. *Analyst*, 146(8): 2415-2448.
- Severcan F, Haris PI. 2012. Introduction to vibrational spectroscopy in diagnosis and screening in "Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening" *Adv Biomedic Spectrosc*, 6: 1-10.
- Severcan F, Toyran N, Kaptan N, Turan B. 2000. Fourier transform infrared study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the C-H region. *Talanta*, 53(1): 55-59.
- Siqueira LF, Lima KM. 2016. MIR-biospectroscopy coupled with chemometrics in cancer studies. *Analyst*, 141(16): 4833-4847.
- Türker-Kaya S, İlbay G. 2020. Analysis of rat blood plasma upon acute epileptic seizures by infrared spectroscopy with chemometrics. *Vib Spectrosc*, 109: 103074.
- Wang Y, Alkhalidy H, Luo J, Liu D. 2019. Antidiabetic effects of hispidulin in streptozotocin-induced insulin deficient mice. *The FASEB J*, 33(S1): 834-838.
- Wu F, Li S, Zhang N, Huang W, Li X, Wang M, Han B. 2018. Hispidulin alleviates high-glucose-induced podocyte injury by regulating protective autophagy. *Biomed Pharmacother*, 104: 307-314.
- Yang P, Formanek P, Scaglione S, Afshar M. 2019. Risk factors and outcomes of acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with cirrhosis. *Hepatol Res.*, 49(3): 335-343.
- Yonar D, Severcan M, Gurbanov R, Sandal A, Yilmaz U, Emri S, Severcan F. 2022. Rapid diagnosis of malignant pleural mesothelioma and its discrimination from lung cancer and benign exudative effusions using blood serum. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1868(10): 166473.
- Zohdi V, Whelan DR, Wood BR, Pearson JT, Bambery KR, Black M. 2015. Importance of tissue preparation methods in FTIR micro-spectroscopical analysis of biological tissues: traps for new users. *PLoS One*, 10(2): e0116491.