

## Effects of Bromelain on Oxidative Stress and Lung Tissue Histopathology in an Experimental Rat Sepsis Model

Nurhan AKARAS<sup>1\*</sup>, Erdem TOKTAY<sup>2</sup>, Hasan ŞİMŞEK<sup>3</sup>, Nevra AYDEMİR CELEP<sup>4</sup>, Neslihan YÜCE<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Aksaray University, Aksaray, Türkiye

<sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Kafkas University, Kars, Türkiye

<sup>3</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Aksaray University, Aksaray, Türkiye

<sup>4</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, Erzurum, Türkiye

<sup>5</sup>Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, Türkiye

### ABSTRACT

Sepsis is an inflammatory syndrome that targets the lung tissue. Bromelain (BRO) is an enzyme complex known for its anti-inflammatory properties. In this study, the protective effect of BRO on lung injury due to sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) in *Sprague-Dawley* rats was investigated by biochemical and histopathological methods. Forty *Sprague dawley* rats were randomly divided into five groups as control, CLP, BRO, CLP+BRO 50 and CLP+BRO 100. In the study, after oral administration of 50 and 100 mg/kg BRO (total of 7 applications for 7 days) to rats, laparotomy and CLP were performed. The data showed that due to its antioxidant properties, BRO decreased CLP-induced myeloperoxidase (MPO) and lipid peroxidation (MDA) ( $p < 0,001$ ), increased glutathione (GSH) levels, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities ( $p < 0,001$ ). Additionally, CLP-induced lung histological changes were reduced with BRO supplementation. The results showed that BRO treatment has an antioxidant, anti-inflammatory effect on CLP-induced lung toxicity and helps preserve lung tissue architecture owing to its regulatory effect.

**Keywords:** Lung, Bromelain, Inflammation, Oxidative Stress, Sepsis

\*\*\*

### Deneysel Sıçan Sepsis Modelinde Bromelainin Oksidatif Stres ve Akciğer Doku Histopatolojisi Üzerine Etkileri

#### ÖZ

Sepsis, inflamatuvar bir sendrom olup başta akciğeri hedef almaktadır. Bromelainin (BRO) anti-inflamatuvar özelliği ile bilinen enzim kompleksidir. Bu çalışmada *Sprague dawley* sıçanlarında çekal ligasyon ve perforasyon (CLP) ile indüklenen sepsise bağlı akciğer hasarında BRO koruyucu etkisi biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle araştırıldı. Kırk adet *Sprague dawley* sıçan, kontrol, CLP, BRO, CLP+BRO 50 ve CLP+BRO 100 olmak üzere rastgele beş gruba ayrıldı. Çalışmada sıçanlara 50 ve 100 mg/kg BRO oral olarak (7 gün boyunca toplam 7 uygulama) verildikten sonra laparotomi ve CLP uygulanmıştır. Veriler, BRO'nun antioksidan özelliklerinden dolayı CLP ile indüklenen miyeloperoksidaz (MPO) ve lipid peroksidasyonu (MDA) azalttığını ( $p < 0,001$ ), glutatyon (GSH) seviyelerini, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini arttırdığını göstermiştir ( $p < 0,001$ ). Ayrıca CLP kaynaklı akciğer histolojik değişiklikler BRO takviyesi ile azalmıştır. Sonuçlar BRO tedavisinin CLP kaynaklı akciğer toksisitesi üzerinde antioksidan, anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu ve düzenleyici etkisi sayesinde akciğer doku mimarisinin korunmasına yardımcı olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer, Bromelain, İnflamasyon, Oksidatif Stres, Sepsis

To cite this article: Akaras N, Toktay E, Şimşek H, Aydemir Celep N, Yüce N. Effects of Bromelain on Oxidative Stress and Lung Tissue Histopathology in an Experimental Rat Sepsis Model. Kocatepe Vet J. (2023) 16(3):252-259.

Submission: 25.05.2023 Accepted: 25.07.2023 Published Online: 14.08.2023

ORCID ID: NA: 0000-0002-8457-9448, ET: 0000-0002-0715-2707, HŞ: 0000-0001-5573-4923, NAC: 0000-0003-1608-5881, NY: 0000-0001-6878-0646

\*Corresponding author e-mail: nurakaras@hotmail.com

Sepsis, enfeksiyona bağlı çoklu organ yetmezliği ve ölüme sebep olabilen sistemik inflamatuvar bir sendromdur (Zhang ve ark. 2021). Her yıl yoğun bakım ünitelerinde 5 milyondan fazla hasta sepsise bağlı hayatını kaybetmektedir (Chen ve ark. 2018). Akciğerler, sepsisli hastada ilk fonksiyonu bozulan organlardır. Yoğun bakımda yatan hastalarda, akciğer disfonksiyonu ve akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) ölüm riskini artıran nedenler içerisinde en sık görülenlerdendir (Zeng ve ark. 2015). Sepsisin hem akciğer hem de çoklu organ disfonksiyonu patogeneğinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması ve antioksidan savunma sistemlerinin azalması yatmaktadır. Artış gösteren oksidatif stres ile birlikte özellikle akciğer dokularında inflamatuvar hücre infiltrasyonu, konjesyon ve ödem gibi patolojik değişiklikler meydana gelmektedir (Chen ve ark. 2018; Giustina ve ark. 2019). Mevcut tedavi seçenekleri arasında antibiyotik ve sürekli pozitif basınçlı ventilasyonla tedavi ön plandadır. Fakat bu tedavilerin etkisi hem sınırlı hem de maliyetlidir (Chen ve ark. 2021). Son yıllarda sepsisin sebep olduğu akciğer disfonksiyonunun önüne geçmek için farklı tedavi ve stratejiler üzerinde durulmaktadır. Fakat başvurulan yöntemler yeterince etki gösterememiş ve altta yakan kesin mekanizma tam olarak çözülememiştir. Oksidatif stres, çoklu organ fonksiyon bozukluğunda önemli bir rol oynadığından antioksidanlar ile tedavi umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir. Doğal bileşikler özellikle birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan antioksidan ve anti-inflamatuvar etkilerinden dolayı birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir (Hu ve ark. 2020; Genin ve ark. 2016). Doğal bir ürün olan *Ananas comosus* (Ananas), *Bromeliaceae* familyasına ait önemli terapatik özelliği olan bir bileşiktir. Bromelain (BRO), ananasın saplarından elde edilen proteaz bir enzim kompleksidir (El-Demerdash ve ark. 2020; Ferah Okkay ve ark. 2023). BRO'nun kullanım alanları çok yaygınlaşmış, güvenilir ve özellikle gıdada, sağlık alanlarında ve kozmetikte yerini almıştır (El-Demerdash ve ark. 2020). Dünyanın birçok ülkesinde kullanılmakta olan BRO, özellikle Amerika ve Avrupada besin takviyesi olarak, Çin'de ise antimodülör bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Abo ve ark. 2021). BRO daha önceki çalışmalarda antioksidan, anti-inflamatuvar, antikanser ve anti-trombosit etkisi ortaya konmuştur (El-Demerdash ve ark. 2020; Ferah Okkay ve ark. 2023). Bu etkilerinden dolayı sepsisin neden olduğu akciğer disfonksiyonunda kullanılması alternatif bir yol olabilir.

Bu çalışmada amaç, sepsis kaynaklı akciğer toksisitesine karşı BRO'nun potansiyel koruyucu etkisini biyokimyasal ve histopatolojik yöntemler kullanılarak araştırmaktır.

### Deneysel Prosedür ve Gruplar

Bu çalışmada, Kafkas Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesindeki deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen toplam 40 adet *Sprague dawley* (250-300gr, 3 aylık) cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Deney süresince, deney hayvanlarına yeteri kadar (ad libitum) su ve pellet yem verildi. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık:  $23\pm 2$  °C) ve (nem:  $\% 55 \pm 5$ ) barındırıldı. Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 22 Eylül 2022, protokol numarası: 2022-8/145). Çalışma 5 grup olacak şekilde her bir grup rastgele 8 sıçandan oluşmaktadır.

- 1. Grup: Kontrol (Sahte operasyon)
- 2. Grup: CLP
- 3. Grup: BRO 100 mg/kg
- 4. Grup: CLP + BRO 50 mg/kg
- 5. Grup: CLP + BRO 100 mg/kg

Çalışmada uygulanan BRO dozu literatüre göre belirlenerek bir hafta boyunca oral olarak uygulandı (Ferah Okkay ve ark. 2023; Sehirlı ve ark. 2021). CLP+BRO gruplarında 7. günün sonunda literatüre göre belirlenmiş CLP modeli oluşturuldu (Eraslan ve ark. 2020). Sepsis modeli oluşturmak için sıçanlara intraperitoneal yoldan 90 mg/kg ketamin ile anestezi uygulandı. CLP için 2 cm ebatında orta hatta boylamasına insizyonla batin açıldı. Ardından çekum eksplore edildi. Çıkan kolon dikkatlice sıvazlandı ve çekum gaita ile dolduruldu. Daha sonra ileoçekal valvin distalinden 3/0 ipekle bağlanıp, çekum ön yüzü 18 G iğne ile iki defa delindi. Feçes çıkışı gözlemlenince sonra laparotomi 4/0 ipek suture ile kapatıldı. CLP gruplarındaki sıçanlara takiben laparotomi ve çekal ligasyon perforasyon (CLP) uygulandı. Kontrol grubuna ise sıçanlara operatif işlem yapılmış, fakat CLP yöntemiyle sepsis modeli uygulanmamış, sadece çekum eksplore edilmiştir. Sıçanlar, CLP uygulamasından 16 saat sonra anestezi (ketamin ve ksilazin) altında sakrifiye edilerek akciğer dokuları alındı. Dokuların bir kısmı biyokimyasal analiz için -80°C'de, diğer kısmı ise histolojik değerlendirme yapmak için %10'luk formalin içerisinde saklandı.

### Biyokimyasal Analiz

Akciğer dokuları -80°C'den çıkarıldıktan sonra sıvı nitrojen içerisine bırakıldı ve porselen bir tokmak ile toz haline getirildi. Toz haline getirilen dokular %1,15 KCl ile seyreltildi, homojenize edildi ve santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant kısımlarından Placer ve arkadaşlarının (Placer ve ark. 1966) geliştirdiği methoda göre MDA seviyesi, Sun ve ark. (Sun ve ark. 1988) metoduna göre SOD aktivitesi, Sedlak ve Lindsay (Sedlak ve ark. 1968) kullandığı methoda göre GSH seviyesi, Bradleyin (Bradley ve ark. 1982) methoduna göre MPO aktivitesi, Lawrence ve Burk (Lawrence ve ark. 1976) methoduna göre ise GPx

aktivitesi ölçüldü. Toplam protein analizinde ise Lowry ve ark. (Lowry ve ark. 1951) geliştirdiği method kullanıldı.

### Histopatolojik Analiz

Sıçan akciğer doku örnekleri %10'luk formalin içerisinde 48 saat boyunca tespit edilmiştir. Ardından 4 saat süresince yıkamaya alınan dokular, devamında artan dereceli alkol serilerinde dehidratasyon, ksilende şeffaflaştırma ve parafinde infiltrasyon işlemleri yapılarak bloklar haline getirilmiştir. Bloklan dokulardan konvansiyonel ışık mikroskopik incelemeleri için mikrotom ile 5 µm'lik kesitler elde edilerek lamalar üzerine bırakılmıştır. Alınan kesitler hematoksin-eozin (H&E) ile prosedüre uygun şekilde boyanmıştır. Histolojik analizler için; kesitler, bilgisayar destekli mikroskop ile fotoğraflanıp ayrı ayrı 2 histolog tarafından körlleme yöntemiyle incelenmiştir. Akciğer hasarı, daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi histolojik bir skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi (Liu ve ark. 2019). Değerlendirmede, dört patolojik parametre kullanıldı ve 0 ile 4 arasında bir ölçekte puanlandı: alveolar konjesyon, kanama, lökosit infiltrasyonu

veya nötrofil agregasyonu ve alveolar duvar kalınlığı. Karşılaştırmalı analiz için dört parametrenin tümü için puanların toplamı kaydedildi.

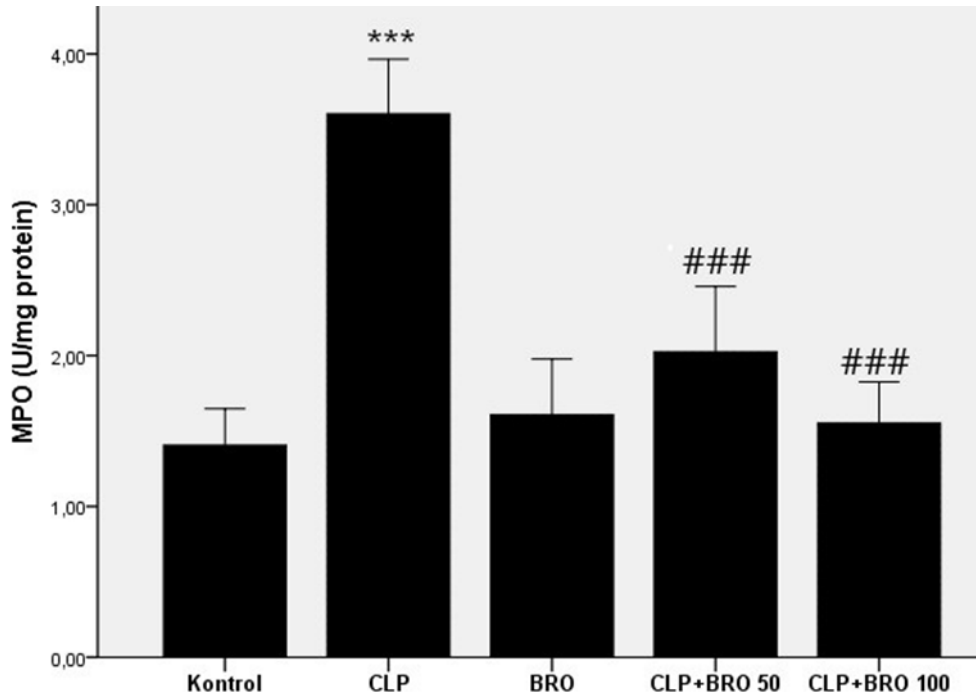
### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS versiyon 20.0 bilgisayar programı kullanıldı. Grupların biyokimyasal ve histopatolojik verilerinin analizi ve karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey karşılaştırma testi kullanıldı. İstatistiksel analiz sonuçları ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edildi.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### BRO'nun ve CLP'nin Akciğer Dokusu MPO Aktivitesine Etkisi

İnflamasyon belirteçlerinden MPO aktivitesi Şekil 1'de gösterilmiştir. CLP modeli sıçanlarda akciğer dokusunda MPO aktivitesini arttırarak inflamasyon düzeyini arttırmıştır. BRO'nun CLP uygulaması ile birlikte uygulandığında MPO aktivitesini, CLP grubuna kıyasla önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir ( $p < 0,001$ ).



**Şekil 1:** Tüm deney gruplarına ait myeloperoksidaz (MPO) sonuçları. \*\*\* Kontrol grubuna karşı  $p < 0,001$ , ### CLP grubuna karşı  $p < 0,001$

**Figure 1:** Myeloperoxidase (MPO) results of all experimental groups. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. control group, ###  $p < 0,001$  vs. CLP group.

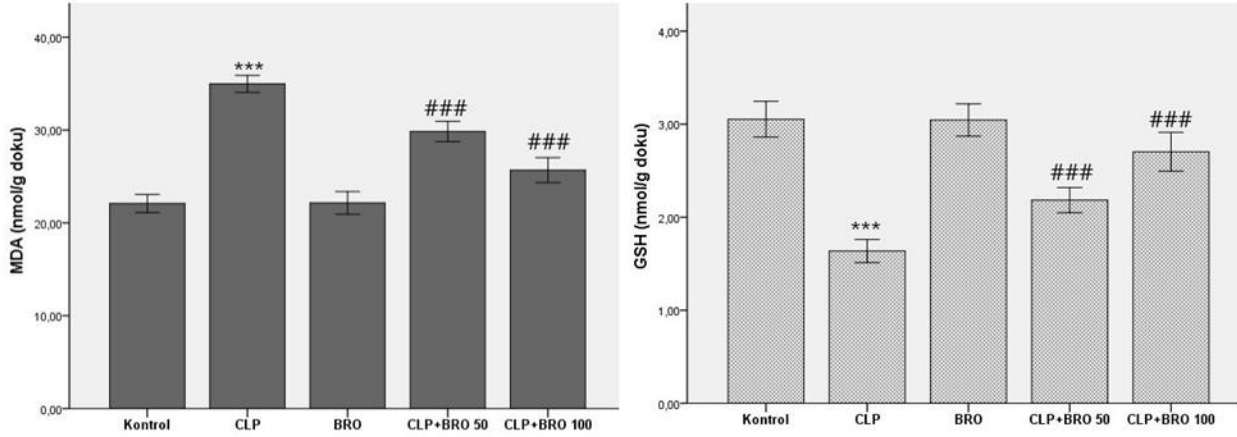
### BRO'nun ve CLP'nin Akciğer Dokusu MDA ve GSH Düzeylerine Etkisi

Sıçan akciğer dokusunda analiz edilen MDA ve GSH düzeyleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Akciğer dokuları MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla CLP oluşturulan grupta artış olduğu tespit edilmiştir.

BRO'nun (50 ve 100 mg/kg) CLP ile birlikte uygulanması, sepsisin neden olduğu artan MDA seviyesini doza bağlı olarak önemli ölçüde hafifletmiştir ( $p < 0,001$ ). GSH seviyesi, CLP

grubunda kontrol grubuna göre akciğer dokusunda önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). CLP+BRO 50 ve CLP+BRO 100 grupları CLP oluşturulan grubu ile kıyaslandığında akciğer

GSH düzeylerinde artış olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ).



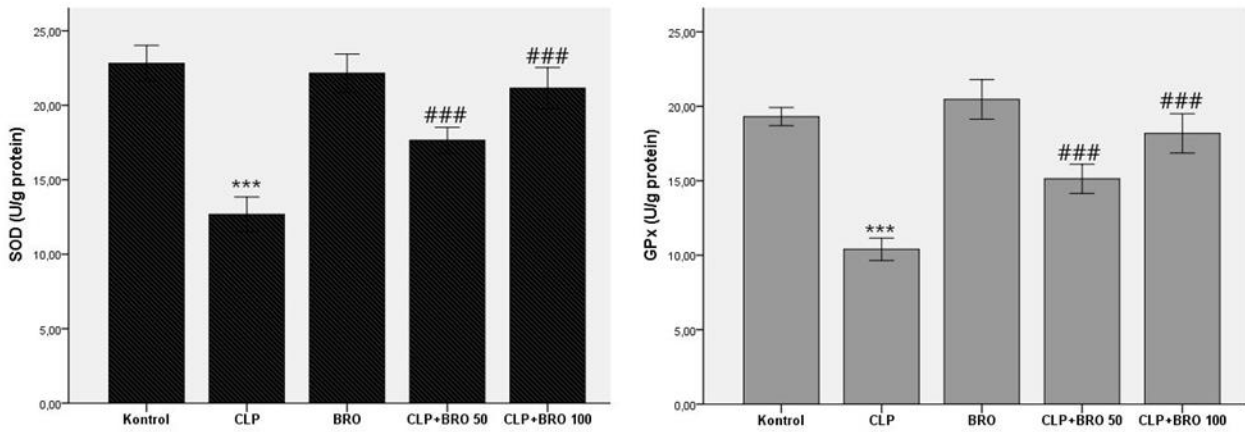
**Şekil 2:** Tüm deney gruplarına ait malondialdehit (MDA) ve Glutasyon (GSH) sonuçları. \*\*\* Kontrol grubuna karşı  $p<0,001$ , ### CLP grubuna karşı  $p<0,001$

**Figure 2:** Malondialdehyde (MDA) and Glutathione (GSH) results of all experimental groups. \*\*\*  $p<0,001$  vs. control group, ###  $p<0,001$  vs. CLP group

### BRO'nun ve CLP'nin Akciğer Dokusu Antioksidan Enzim Belirteçleri Üzerine Etkisi

Akciğer dokusu antioksidan enzim (SOD, GPx) aktiviteleri Şekil 3'de verilmiştir. Bulgulara göre, CLP grubunda SOD ve GPx enzim aktivitelerinin kontrol

grubuna göre düştüğü tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). CLP ile birlikte BRO uygulanması SOD ve GPx enzim aktivitelerini doza bağlı olarak artırarak iyileşme sağlamıştır ( $p<0,001$ ).



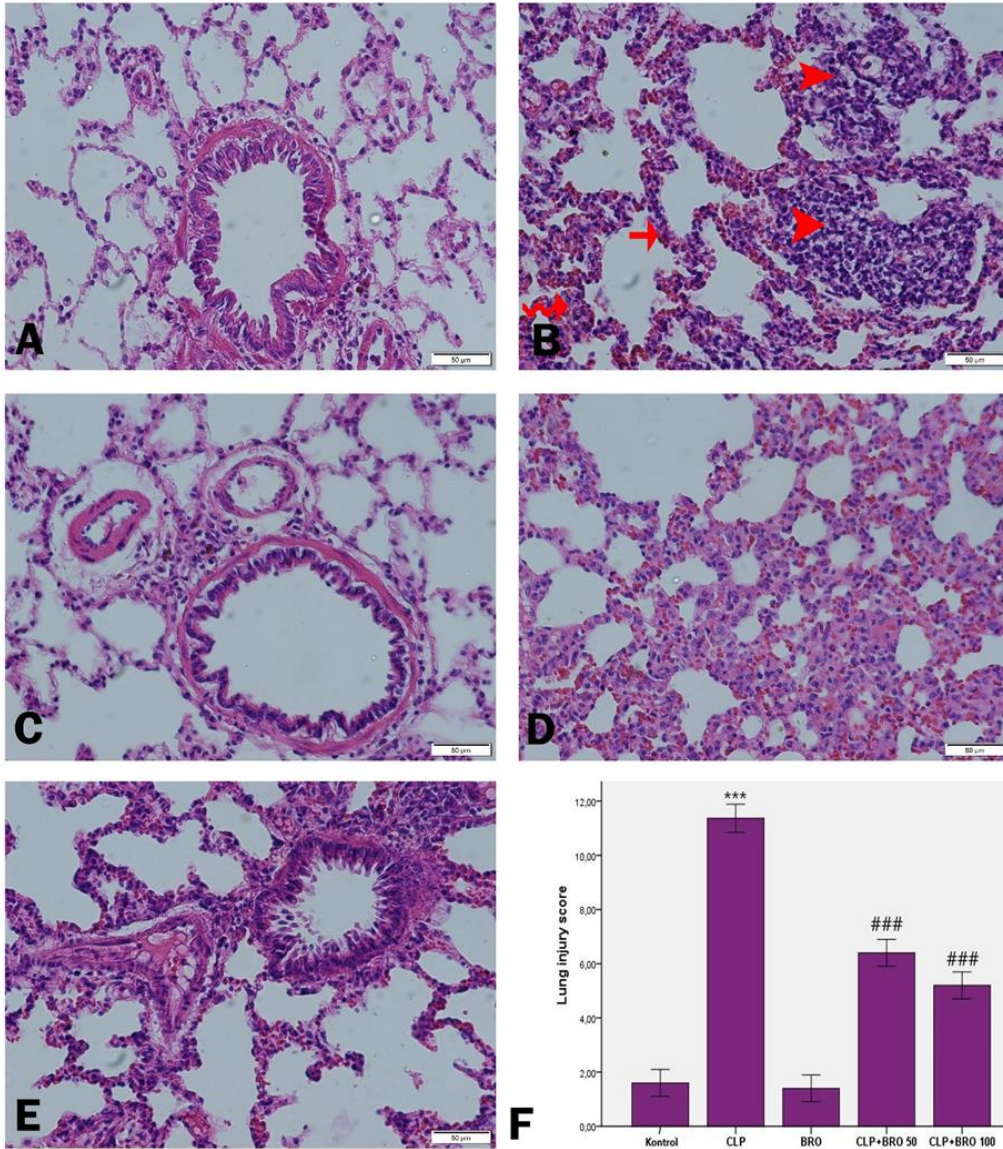
**Şekil 3:** Tüm deney gruplarına ait Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) sonuçları \*\*\* Kontrol grubuna karşı  $p<0,001$ , ### CLP grubuna karşı  $p<0,001$

**Figure 3:** Superoxide dismutase (SOD) and Glutathione peroxidase (GPx) results for all experimental groups \*\*\*  $p<0,001$  vs. control group, ###  $p<0,001$  vs. CLP group

## BRO'nun ve CLP'nin Akciğer Dokusu Histopatolojik Değişiklikler Üzerine Etkisi

H&E boyaması sonucu akciğer dokuları histolojik olarak incelendiğinde kontrol grubu sıçanların akciğer dokuları normal morfolojiye sahip ve belirgin bir hasar yoktu (Şekil 4.A). Özellikle alveol duvarları normal kalınlıkta ve bronşiolerin düzgün histolojik yapı gösterdiği gözlemlendi. Aynı şekilde BRO grubunda kontrole yakın görüntüler olduğu gözlemlendi (Şekil 4.C). CLP uygulanan grupta ise akciğer dokularında inflamatuvar hücre infiltrasyonunun dikkat çekici olduğu saptandı. Bu gruptaki akciğerlerin alveol

duvarları kalınlaşmış, ödem, kapiller hiperemi olduğu gözlemlendi. Ayrıca bazı bronşiolerin ve bronşların epitel hücrelerinin deforme olduğu saptandı (Şekil 4.B). Aksine CLP ile birlikte BRO uygulanması akciğer hasarını modüle ettiği gözlemlendi (Şekil 4.D, 4.E). Akciğer hasar skorları değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre CLP grubunda akciğer hasarının arttığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Ancak CLP grubuna göre CLP+BRO gruplarında histolojik skorların düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.F).



**Şekil 4:** Akciğer dokusunun ışık mikrografları. (A) Kontrol grubu (sahte operasyon), (B) CLP (sepsis) grubu; kıvrık ok: alveolar duvar kalınlığı, ok başı: inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ok: kanama, (C) BRO (Bromelain) grubu, (D) CLP+BRO 50 (sepsis+ bromelain 50) grubu, (E) CLP+BRO 100 (sepsis + bromelain 100) grubu. (F) Akciğer hasarı, yöntemlerde açıklanan akciğer skorları kullanılarak değerlendirildi. \*\*\* Kontrol grubuna karşı  $p<0,001$ , ### CLP grubuna karşı  $p<0,001$ . (H&E boyama; bar: 50 $\mu$ m)

**Figure 4:** Light micrographs of lung tissue. (A) Control group (fake operation), (B) CLP (sepsis) group; curved arrow: alveolar wall thickness, arrowhead: inflammatory cell infiltration, arrow: bleeding, (C) BRO (Bromelain) group, (D) CLP+BRO 50 (sepsis+ bromelain 50) group, (E) CLP+BRO 100 (sepsis + bromelain 100) group. (F) Lung injury was assessed using lung scores described in the methods. \*\*\*  $p<0.001$  versus control group, ###  $p<0.001$  versus CLP group. (H&E staining; bar: 50 $\mu$ m)

## TARTIŞMA

Sepsis, çoklu organ hasarına sebep olan ve mortalitesi giderek artan küresel bir sağlık sorunudur. Özellikle akciğer dokusu sepsis için birincil hedef organdır. Bu bağlamda, sepsisin zararlı etkilerini azaltmak ve tedavi seçenekleri sunmak için araştırmalar giderek artmaktadır. Özellikle son yıllarda tedavi amaçlı olarak, doğal yöntemlere ve fitokimyasallara ilgi artmaktadır. BRO güvenilir, ucuz ve toksik etkisi olmayan doğal bir etken maddedir. Daha önce yapılan çalışmalar, BRO'nun anti-inflamatuvar ve antioksidan etkilerinin olduğunu rapor etmiştir (El-Demerdash ve ark. 2020; Ferah Okkay ve ark. 2023). Fakat sepsis hasarına karşı etkisi ve mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada amaç, sepsis modeli oluşturulan sıçanlarda akciğer doku hasarına karşı BRO'nun etkisini belirlemektir.

Sepsise maruz kalan dokularda ilk savunma hattı nötrofiller, monositler ve makrofajlardır. Sepsis geliştiğinde özellikle nötrofiller inflamatuvar mediyöörleri serbest bırakarak anti-mikrobiyal öldürmeye ve akciğer patolojik değişikliklere katkıda bulunurlar. Ayrıca nötrofiller, sitokinlerin, proteazların ve ROS'ların konsantrasyonlarını da artırır (Giustina ve ark. 2019; Yu ve ark. 2020). İnflamasyon ve sepsisin önemli belirteçlerinden birisi, MPO enzim aktivitesidir (Margotti ve ark. 2022). Mevcut çalışmada, sepsise bağlı olarak MPO seviyesinin arttığı ve bu artışla inflamatuvar yanıtın ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bulgularımıza benzer şekilde literatürdeki diğer sepsis çalışmalarında da MPO aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Baradaran Rahimi ve ark. 2019; Li ve ark. 2019). CLP ile birlikte BRO uygulaması ise MPO aktivitesini düşürerek inflamatuvar yanıtı azaltmıştır.

Sepsisin akciğer üzerindeki patolojik hasar mekanizmalarından birisi, oksidatif strestir (Li ve ark. 2022). Oksidatif stres, ROS'ların artması ve antioksidan kapasitenin baskılanmasına dayanan bir hasar olarak tanımlanır (Akaras ve ark. 2017; Gür ve ark. 2022; Kandemir ve ark. 2022; Semis ve ark. 2022; Şimşek ve ark. 2023a; Şimşek ve ark. 2023b). Sepsis hasarında dokularda yüksek oranda biriken inflamatuvar sitokinler, ROS oluşumunu artırmaktadır. Artan ROS özellikle akciğer hücre zarlarına, lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verebilmektedir. Ayrıca artan ROS lipid peroksidasyonunu aktive eder ve mitokondriyal membran hasarına sebep olmaktadır (Gür ve ark. 2023; Petronilho ve ark. 2016; Anter ve ark. 2022). Mevcut çalışmada, CLP uygulamasının akciğer dokusunda lipid peroksidasyon belirteçlerinden MDA seviyesini artırdığı ve bu artışın oksidatif strese neden olduğu görülmüştür. CLP ile birlikte BRO uygulaması ise MDA seviyesini doza bağlı olarak azaltmıştır. Yakın zamanda yapılan toksisite çalışmalarında, BRO'nun MDA seviyesini azalttığına dair kanıtlar sunulmuştur (Khazaeel ve ark. 2022; Ferah Okkay ve ark. 2023). Mevcut çalışma verileri

değerlendirildiğinde, BRO'nun membran kaynaklı hasarlara karşı koruyucu olabileceği sonucuna varıldı. İnflamasyona bağlı olarak gelişen oksidatif stresin gelişmesinde önemli katkısı olan süreçlerden birisi antioksidanların baskılanması veya inhibe olmasıdır. Oksidatif stres enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleriyle detoksifiye edilebilir (Kandemir ve ark. 2020; Gur ve ark. 2022). Antioksidanlar, oksidan moleküllerin dokular üzerindeki olumsuz etkilerini sınırlayan ve serbest radikalleri temizleyerek oksidatif hücre hasarına karşı koruyan hücresel savunma mekanizmalarının bir parçasıdır. Hücrede bol miktarda bulunan GSH enzimatik olmayan tripeptit yapıda bir antioksidandır. GSH, oksidanlar ile ksenobiyotiklerin temizlenmesinde ve ilaçların detoksifikasyonunda aktif rol alır (Turk ve ark. 2019). Mevcut çalışmada, akciğer dokularında sepsise bağlı GSH düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. GSH azalması, sepsis kaynaklı ROS'ların artmasına bağlı olarak artan GSH kullanımına bağlı olabilir. CLP ile birlikte BRO uygulamasının, doza bağlı olarak GSH miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak yüksek doz olan 100mg/kg dozunda BRO uygulaması, GSH seviyesini kontrol grubuna yakın bir düzeye getirmiştir. Antioksidan enzimlerinden SOD, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüşümünü katalizlerken, GPx ise  $H_2O_2$ 'yi su ve oksijene dönüştürür (Akaras ve ark. 2023). Mevcut çalışmada, CLP uygulaması sıçan akciğer dokularında, SOD ve GPx enzim aktivitelerinde azalmaya sebep olurken, BRO takviyesinin enzim miktarlarını modüle ettiği tespit edilmiştir. Önceki araştırmalar, çalışmamıza benzer şekilde sepsisin antioksidan enzimlerin aktivitesini azalttığını rapor etmiştir (Cınar ve ark. 2019, Liu ve ark. 2021). Agarwal ve ark. mevcut çalışma ile paralel olarak BRO'nun antioksidan kapasitesini artırdığını rapor etmiştir (Agarwal ve ark. 2016).

Mevcut çalışmada, CLP kaynaklı akciğer histopatolojik bulgular biyokimyasal bulgularla uyumlu sonuçlar göstermiştir. Özellikle CLP uygulaması ile akciğerde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hiperemi ve alveoler duvar kalınlaşması görülmüştür. Hu ve ark. çalışmalarında, sepsisin akciğerde oksidatif strese bağlı olarak konjesyona ve ödeme sebep olduğunu rapor etmiştir (Hu ve ark. 2020). Mevcut çalışmada, CLP ve BRO'nun birlikte uygulanması dejeneratif değişiklikleri iyileştirmiştir.

## SONUÇ

Bütün veriler birlikte değerlendirildiğinde, CLP'nin oksidatif stresi ve inflamasyonu arttırarak akciğer dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan, BRO akciğer dokularında ROS'u temizleme özelliğinden dolayı



oksidatif stresi, inflamasyonu, patolojik değişiklikleri azaltmış ve CLP'ye karşı koruma sağlamıştır.

**Çıkar çatışması:** Yazarların bildirecek çıkar çatışması yoktur.

#### Yazar katkı bilgileri:

Konsept: N.A., Dizayn: N.A., E.T., Denetim: N.A., E.T., Kaynaklar: N.A., N.Y., N.A.C., Materyal: N.A., E.T., Veri Toplama: N.A., N.Y., N.A.C., Literatür Analizi: N.A., N.Y., N.Y. N.A., H.S., Yazan: N.A., H.S., Derleme: N.A., E.T., H.S.

**Etik Kurul Bilgileri:** Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2022-8/145) tarafından onaylanmıştır.

### KAYNAKLAR

Agarwal, S., Chaudhary, B., & Bist, R. (2016). Bacoside A and bromelain relieve dichlorvos induced changes in oxidative responses in mice serum. *Chemico-biological interactions*, 254, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.017>

Akaras, N., Bal, T., Atilay, H., Selli, J., & Halici, M. B. (2017). Protective effects of agomelatine on testicular damage caused by bortezomib. *Biotechnic&histochemistry:official publication of the Biological Stain Commission*, 92(8), 552–559. <https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1350748>

Akaras, N., Gur, C., Kucukler, S., & Kandemir, F. M. (2023). Zingerone reduces sodium arsenite-induced nephrotoxicity by regulating oxidative stress, inflammation, apoptosis and histopathological changes. *Chemico-biological interactions*, 374, 110410. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110410>

Anter, A., Ahmed, A. F., Hammad, A. S. A., Almalki, W. H., Abdel Hafez, S. M. N., Kasem, A. W., El-Moselhy, M. A., Alrabia, M. W., Ibrahim, A. R. N., & El-Daly, M. (2022). The Severity of Acute Kidney and Lung Injuries Induced by Cecal Ligation and Puncture Is Attenuated by Menthol: Role of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Apoptotic Markers. *Frontiers in medicine*, 9, 904286. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.904286>

Baradaran Rahimi, V., Rakhshandeh, H., Raucci, F., Buono, B., Shirazinia, R., Samzadeh Kermani, A., Maione, F., Mascolo, N., & Askari, V. R. (2019). Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activity of *Portulaca oleracea* Extract on LPS-Induced Rat Lung Injury. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(1), 139. <https://doi.org/10.3390/molecules24010139>

Bradley, P. P., Priebe, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of investigative dermatology*, 78(3), 206–209. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>

Chen, G., Hou, Y., Li, X., Pan, R., & Zhao, D. (2021). Sepsis-induced acute lung injury in young rats is relieved by calycosin through inactivating the HMGB1/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway and NLRP3 inflammasome. *International immunopharmacology*, 96, 107623. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107623>

Chen, X., Wang, Y., Xie, X., Chen, H., Zhu, Q., Ge, Z., Wei, H., Deng, J., Xia, Z., & Lian, Q. (2018). Heme Oxygenase-1 Reduces Sepsis-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Acute Lung Injury. *Mediators of inflammation*, 2018, 9413876. <https://doi.org/10.1155/2018/9413876>

Cinar, I., Sirin, B., Aydin, P., Toktay, E., Cadirci, E., Halici, I., & Halici, Z. (2019). Ameliorative effect of gossypin against acute lung injury in experimental sepsis model of rats. *Life sciences*, 221, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.039>

El-Demerdash, F. M., Baghdadi, H. H., Ghanem, N. F., & Mhanna, A. B. A. (2020). Nephroprotective role of bromelain against oxidative injury induced by aluminium in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 80, 103509. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103509>

Eraslan, E., Tanyeli, A., Akdemir, F. N. E., & Güler, M. C. (2020). Reno-Protective Effects of 6-Shogaol on Kidney Tissue in Cecal Ligation and Puncture-Induced Polymicrobial Sepsis Rat Model. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15(3), 244–250.

Ferah Okkay, I., Okkay, U., Bayram, C., Cicek, B., Sezen, S., Aydin, I. C., Mendil, A. S., & Hacimuftuoglu, A. (2023). Bromelain protects against cisplatin-induced ocular toxicity through mitigating oxidative stress and inflammation. *Drug and chemical toxicology*, 46(1), 69–76. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.2011308>

Gerin, F., Sener, U., Erman, H., Yilmaz, A., Aydin, B., Armutcu, F., & Gurel, A. (2016). The Effects of Quercetin on Acute Lung Injury and Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in the Rat Model of Sepsis. *Inflammation*, 39(2), 700–705. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0296-9>

Giustina, A. D., Danielski, L. G., Novochadlo, M. M., Goldim, M. P. S., Joaquim, L., Metzker, K. L. L., Carli, R. J., Denicol, T., Cideira, T., Vieira, T., & Petronilho, F. (2019). Vitamin B6 reduces oxidative stress in lungs and liver in experimental sepsis. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(4), e20190434. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190434>

Gur, C., Kandemir, F. M., Caglayan, C., & Satici, E. (2022). Chemopreventive effects of hesperidin against paclitaxel-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via amendment of Nrf2/HO-1 and caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Chemico-biological interactions*, 365, 110073. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110073>

Cihan, G. Ü. R., Kandemir, Ö., & Kandemir, F. M. (2022). Ratlarda diklofenak ile indüklenen kardiyotoksiste üzerine krisinin etkilerinin oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve apoptoz belirteçleri ile değerlendirilmesi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 15(2), 151–160.

Gur, C., Akarsu, S. A., Akaras, N., Tuncer, S. C., & Kandemir, F. M. (2023). Carvacrol reduces abnormal and dead sperm counts by attenuating sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in the testicular tissues of rats. *Environmental toxicology*, 38(6), 1265–1276. <https://doi.org/10.1002/tox.23762>

Hu, Q., Wang, Q., Han, C., & Yang, Y. (2020). Sufentanil attenuates inflammation and oxidative stress in sepsis-induced acute lung injury by downregulating KNG1 expression. *Molecular medicine reports*, 22(5), 4298–4306. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11526>

Kandemir, F. M., Caglayan, C., Aksu, E. H., Yildirim, S., Kucukler, S., Gur, C., & Eser, G. (2020). Protective effect of rutin on mercuric chloride-induced reproductive damage in male rats. *Andrologia*, 52(3), e13524. <https://doi.org/10.1111/and.13524>

- Kandemir, F. M., Ileriturk, M., & Gur, C. (2022). Rutin protects rat liver and kidney from sodium valproate-induced damage by attenuating oxidative stress, ER stress, inflammation, apoptosis and autophagy. *Molecular biology reports*, 49(7), 6063–6074. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07395-0>
- Khazaeel, K., Rad, O. R., Jamshidian, J., Tabandeh, M. R., Mohammadi, G., & Atashfaraz, A. (2022). Effect of bromelain on sperm quality, testicular oxidative stress and expression of oestrogen receptors in bisphenol-A treated male mice. *Andrologia*, 54(11), e14584. <https://doi.org/10.1111/and.14584>
- Lawrence, R. A., & Burk, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(4), 952–958. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(76)90747-6)
- Li, L., Wang, H., Zhao, S., Zhao, Y., Chen, Y., Zhang, J., Wang, C., Sun, N., & Fan, H. (2022). Paeoniflorin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress and inflammation via SIRT1/FOXO1a/SOD2 signaling in rats. *Phytotherapy research*: PTR, 36(6), 2558–2571. <https://doi.org/10.1002/ptr.7471>
- Li, R., Ren, T., & Zeng, J. (2019). Mitochondrial Coenzyme Q Protects Sepsis-Induced Acute Lung Injury by Activating PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR Pathway in Rats. *BioMed research international*, 2019, 5240898. <https://doi.org/10.1155/2019/5240898>
- Liu, Y., Mu, S., Li, X., Liang, Y., Wang, L., & Ma, X. (2019). Unfractionated Heparin Alleviates Sepsis-Induced Acute Lung Injury by Protecting Tight Junctions. *The Journal of surgical research*, 238, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.01.020>
- Liu, Y., Zhang, Y., Feng, Q., Liu, Q., Xie, J., Li, H., Yang, F., Liu, X., Gao, W., Bai, X., Li, Z., & Wang, Y. (2021). GPA Peptide Attenuates Sepsis-Induced Acute Lung Injury in Mice via Inhibiting Oxidative Stress and Pyroptosis of Alveolar Macrophage. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 5589472. <https://doi.org/10.1155/2021/5589472>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.
- Margotti, W., Goldim, M. P. S., Machado, R. S., Bagio, E., Dacoregio, C., Bernades, G., Lanzarin, E., Stork, S., Cidreira, T., Denicol, T. L., Joaquim, L., Danielski, L. G., Metzker, K. L. L., Bonfante, S., Margotti, E., & Petronilho, F. (2022). Oxidative stress in multiple organs after sepsis in elderly rats. *Experimental gerontology*, 160, 111705. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.111705>
- Petronilho, F., Florentino, D., Danielski, L. G., Vieira, L. C., Martins, M. M., Vieira, A., Bonfante, S., Goldim, M. P., & Vuolo, F. (2016). Alpha-Lipoic Acid Attenuates Oxidative Damage in Organs After Sepsis. *Inflammation*, 39(1), 357–365. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0256-4>
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry*, 16(2), 359–364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9)
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25(1), 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Semis, H. S., Gur, C., Ileriturk, M., Kandemir, F. M., & Kaynar, O. (2022). Evaluation of Therapeutic Effects of Quercetin Against Achilles Tendinopathy in Rats via Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, Autophagy, and Metalloproteinases. *The American journal of sports medicine*, 50(2), 486–498. <https://doi.org/10.1177/03635465211059821>
- Simsek, H., & Akaras, N. (2023). Acacetin ameliorates acetylsalicylic acid-induced gastric ulcer in rats by interfering with oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *International Journal of Medical Biochemistry*, 6(2).
- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497–500.
- Şehirli, A. Ö., Sayiner, S., Savtekin, G., & Velioglu-Ögünc, A. (2021). Protective effect of bromelain on corrosive burn in rats. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 47(6), 1352–1358.
- Şimşek, H., Akaras, N., Gür, C., Küçükler, S., & Kandemir, F. M. (2023). Beneficial effects of Chrysin on Cadmium-induced nephrotoxicity in rats: Modulating the levels of Nrf2/HO-1, RAGE/NLRP3, and Caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Gene*, 875, 147502. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147502>
- Turk, E., Kandemir, F. M., Yildirim, S., Caglayan, C., Kucukler, S., & Kuzu, M. (2019). Protective Effect of Hesperidin on Sodium Arsenite-Induced Nephrotoxicity and Hepatotoxicity in Rats. *Biological trace element research*, 189(1), 95–108. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1443-6>
- Yu, H., Liu, Y., Wang, M., Restrepo, R. J., Wang, D., Kalogeris, T. J., Neumann, W. L., Ford, D. A., & Korthuis, R. J. (2020). Myeloperoxidase instigates proinflammatory responses in a cecal ligation and puncture rat model of sepsis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 319(3), H705–H721. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00440.2020>
- Zeng, M., He, W., Li, L., Li, B., Luo, L., Huang, X., Guan, K., & Chen, W. (2015). Ghrelin attenuates sepsis-associated acute lung injury oxidative stress in rats. *Inflammation*, 38(2), 683–690. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9977-z>
- Zhang, J., Wang, C., Wang, H., Li, X., Xu, J., & Yu, K. (2021). Loganin alleviates sepsis-induced acute lung injury by regulating macrophage polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *International immunopharmacology*, 95, 107529. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107529>