

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİDİN NEDEN OLDUĞU
HİPOTANSİYON VE ENFLAMASYONA mTOR'NİN KATKISININ
ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Meryem TEMİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
Doç. Dr. Cüneyt Kemal BUHARALIOĞLU

MERSİN - 2014

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

**SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİDİN NEDEN OLDUĞU
HİPOTANSİYON VE ENFLAMASYONA mTOR'NİN KATKISININ
ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Meryem TEMİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
Doç. Dr. Cüneyt Kemal BUHARALIOĞLU

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE FB (MT) 2014-1 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 267

MERSİN - 2014

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

"Eczacılık Farmakoloji Ana Bilim Dalı Eczacılık Farmakoloji Yüksek Lisans Programı" çerçevesinde yürütülmüş olan "Sıçanlarda Lipopolisakkaridin Neden Olduğu Hipotansiyon ve Enflamasyona mTOR'nin Katkısının Araştırılması" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29/12/2014

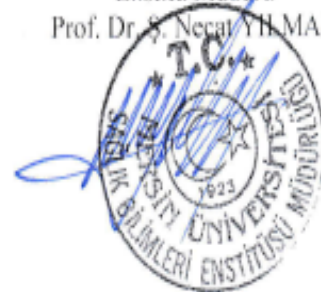
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Jüri Üyesi

Doç. Dr. İsmail ÜN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 05/10/2015 tarihli ve 2015/02 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ş. Necatullah MAZ



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimime başladığım günden itibaren gerek akademik, gerek idari ve gerekse sosyal yönlerden beni bu hayata alıştıran, bana her daim destek olan ve bana sabretmeyi öğreten danışman hocam Doç. Dr. Sn. Seyhan ŞAHAN FIRAT'a emeklerinden ve sabrından ötürü teşekkürlerimi sunuyorum.

Akademik hayata başlamamı sağlayan, hemen hemen her konuda yardımlarını ve bilgilerini benden esirgemeyen Ana Bilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Sn. Bahar TUNÇTAN'a ve desteğinden ötürü Ana Bilim Dalımız öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Sn. A. Nihal SARI'ya çok teşekkür ediyorum. İkinci tez danışman hocam Doç. Dr. Sn. C. Kemal BUHARALIOĞLU'na katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez deneylerim sırasında yardımları ve özellikle de sabırları için çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Şefika Pınar ŞENOL, Arş. Gör. Demet Sinem GÜDEN ve Yüksek Lisans öğrencisi Ecz. Pelin ÇEÇEN'e teşekkür ediyorum. Ve Arş. Gör. Ayça AKTAŞ desteğinin, sabrının, sohbetinin ve en önemlisi dostluğun için kocaman teşekkürler...

Yüksek Lisans eğitimim boyunca sağladığı maddi destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni bu dünyaya getiren ve bugünlere gelmemi sağlayan aileme hem maddi hem de manevi yönden verdikleri destekten ötürü sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sepsis ve Septik Şok	4
2.1.1. Epidemiyolojisi	7
2.1.2. Etiyolojisi	9
2.1.3. Patofizyolojisi	11
2.1.3.1. LPS'nin Yapısı	17
2.1.3.2. LPS'nin Sinyal İletisi	22
2.1.3.3. Septik Şokta Kardiyovasküler İşlev Bozukluğu	25
2.1.4. Tedavisi	26
2.2. Rapamisinin Memelilerdeki Hedefi (mTOR)	34
2.2.1. Yapısı ve Özellikleri	34
2.2.2. Etkinliğinin Düzenlenmesi	40
2.2.3. Ekspresyonu ve Fizyopatolojik İşlevlerdeki Rolü	44
2.2.3.1. Kanser Patojenezinde mTOR'nin Rolü	45
2.2.3.2. Metabolik Hastalıkların Patojenezinde mTOR'nin Rolü	47
2.2.3.3. Nörolojik Hastalıkların Patojenezinde mTOR'nin Rolü	48
2.2.3.4. Enflamasyon Patojenezinde mTOR'nin Rolü	49

2.2.4. mTOR İnhibitörleri	51
2.2.4.1. Rapamisin ve Rapamisin Analogları	51
2.2.4.2. mTOR ve PI3K Üzerinde Dual Etki Gösteren İnhibitörler .	53
2.2.4.3. Seçici mTORK1/2 İnhibitörleri	54
2.2.4.4. Diyet Türevi Doğal Ürünler	55
3. GEREÇ VE YÖNTEM	56
3.1. Gereç	56
3.1.1. Deney Hayvanı	56
3.1.2. Sarf Malzemesi	56
3.1.3. Teçhizat	60
3.2 Yöntem	61
3.2.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	61
3.2.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması, Dokuların Homojenize Edilmesi ve Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması	62
3.2.3. Doku Homojenalarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Belirlenmesi	63
3.2.4. Serum ve/veya Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Nitrit, 6-keto-PGF _{1α} , Nitrotirozin ve TNF-α Düzeyleri ile MPO Etkinliğinin Ölçülmesi	63
3.2.5. Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Ribozomal Protein S6, Fosforile Ribozomal Protein S6, İκB-α, Fosforile İκB- α, NF-κB p65, Fosforile NF-κB p65, iNOS, COX-2 ve Beta Aktin Protein Ekspresyonlarının Ölçülmesi	65
3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	67
4. BULGULAR	68
4.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	68
4.1.1. LPS'nin OAB ve KH Üzerindeki Etkisi	68
4.1.2. LPS ile Azalan OAB ve Artan KH Üzerinde Rapamisinin Etkisi ...	69
4.2. LPS ve/veya Rapamisinin rpS6 Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi	72

4.3. LPS ve/veya Rapamisinin IκB-α Protein Ekspresyon ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi	75
4.4. LPS ve/veya Rapamisinin NF-κB p65 Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi	78
4.5. LPS ve/veya Rapamisinin iNOS Protein Ekspresyon ile Nitrit ve Nitrotirozin Düzeyi Üzerindeki Etkisi	81
4.5.1. LPS ve/veya Rapamisinin iNOS Protein Ekspresyon Üzerindeki Etkisi	81
4.5.2. LPS ve/veya Rapamisinin Serum ve Doku Nitrit Düzeyi Üzerindeki Etkisi	83
4.5.3. LPS ve/veya Rapamisinin Doku Nitrotirozin Düzeyi Üzerindeki Etkisi	85
4.6. LPS ve/veya Rapamisinin COX-2 Protein Ekspresyonu ve 6-Keto- PGF _{1α} Düzeyi Üzerindeki Etkisi	87
4.6.1. LPS ve/veya Rapamisinin COX-2 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	87
4.6.2. LPS ve/veya Rapamisinin Doku 6- Keto-PGF _{1α} Düzeyi Üzerindeki Etkisi	89
4.7. LPS ve/veya Rapamisinin Doku TNF-α Düzeyi Üzerindeki Etkisi	91
4.8. LPS ve/veya Rapamisinin Doku MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi	93
5. TARTIŞMA	95
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	106
7. KAYNAKLAR	108
ÖZ GEÇMİŞ	130

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Septik şok etiyojisinde yer alan başlıca patojenler ve etkileştikleri immün sistem reseptörleri. A) Funguslar ve B) bakteriler	11
Şekil 2.2. Sepsis ve septik şok patofizyolojisinde makrofaj hücrelerinden mediyatör salıverilmesi	12
Şekil 2.3. Proenflamatuvar ve anti-enflamatuvar mediyatörler arasındaki denge	13
Şekil 2.4. Şiddetli sepsis ve septik şok patofizyolojisi	14
Şekil 2.5. LPS ve lipit A'nın yapısının şematik gösterimi	18
Şekil 2.6. LPS sinyal iletilişinde görev alan aksesuar proteinler	20
Şekil 2.7. LPS reseptör etkileşimi	21
Şekil 2.8. LPS sinyal iletilişi	23
Şekil 2.9. mTORK bileşenlerinin şematik gösterimi	35
Şekil 2.10. mTOR'nin şematik yapısı	36
Şekil 2.11. mTORK1 ve mTORK2'nin yapısı	39
Şekil 2.12. mTOR sinyal iletilişi ve etkinliğinin düzenlenmesi	43
Şekil 2.13. Rapamisin ve rapamisin analoglarının kimyasal yapısının şematik gösterimi	52
Şekil 4.1. Kontrol ve septik şoklu sıçanlarda rapamisinin (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi	71
Şekil 4.2. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde rpS6 protein ekspresyonu üzerinde rapamisinin etkisi	73
Şekil 4.3. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde rpS6 protein fosforilasyonu üzerinde rapamisinin etkisi	74

Şekil 4.4. Kontrol ve septik şoklu sıçanların böbrek (A), kalp (B), torasik aort (C) ve süperiyor mezenterik arterlerinde (D) IκB-α protein ekspresyonu üzerinde rapamisininin etkisi	
Şekil 4.5. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein fosforilasyonu üzerinde rapamisininin etkisi	77
Şekil 4.6. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB p65 protein ekspresyonu üzerinde rapamisininin etkisi	79
Şekil 4.7. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB p65 protein fosforilasyonu üzerinde rapamisininin etkisi	80
Şekil 4.8. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde iNOS protein ekspresyonu üzerinde rapamisininin etkisi	82
Şekil 4.9. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort, (D) süperiyor mezenterik arter ve (E) serumlarında nitrit düzeyleri üzerinde rapamisininin etkisi	84
Şekil 4.10. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen nitrotirozin düzeyleri üzerinde rapamisininin etkisi	86
Şekil 4.11. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde COX-2 protein ekspresyonu üzerinde rapamisininin etkisi	88
Şekil 4.12. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen 6-keto-PGF _{1α} düzeyleri üzerinde rapamisininin etkisi	90

Şekil 4.13. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen TNF- α düzeyleri üzerinde rapamisinin etkisi	92
Şekil 4.14. Kontrol ve septik şoklu sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde MPO düzeyleri üzerinde rapamisinin etkisi	94
Şekil 5.1. LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyona mTOR'nin katkısı için önerilen mekanizma	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sepsis ve septik şok ile ilgili tanımlar	5
Çizelge 2.2. Septik şok patojenezinde yer alan başlıca patojenler	10
Çizelge 2.3. Septik şok patojenezinde rol alan sitokinlerin ve sitokin olmayan mediyatörler, kaynakları ve septik şoktaki rolleri	15
Çizelge 2.4. Sepsis ve septik şokta NF-κB ile ilişkili genler	24
Çizelge 2.5. Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için <i>The Surviving Sepsis Campaign</i> 'in önerileri	27
Çizelge 4.1. Kontrol ve septik şoklu sıçanlarda LPS ve/veya rapamisinin OAB ve KH üzerindeki etkisi	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4EBP1	<i>eIF4E binding protein 1</i>
AGC	<i>Subfamily of protein kinases contains 60 members, including</i>
PKA,	<i>PKG and PKC</i>
Akt	<i>Protein kinase B</i>
AMP	<i>Guanozin 5'-monofosfat (guanosine 5'-monophosphate)</i>
AMPK	<i>AMP-ile etkinleştirilen protein kinaz (AMP-activated protein kinase)</i>
ANOVA	<i>Varyans analizi (analysis of variance)</i>
AP	<i>Etkinleştirici protein (activating protein)</i>
AP23573	<i>Deforolimus (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2- [(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35 R)-1,18-dihydroxy-19,30-dimethoxy-15,17,21,23,29,35- hexamethyl-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4- azatricyclo[30.3.1.0^{4,9}]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12- yl]propyl]-2-methoxycyclohexyl dimethylphosphinate</i>
ARDS	<i>İvegen solunum sıkıntısı sendromu (acute respiratory distress syndrome)</i>
ATP	<i>Adenosine three phosphate</i>
Bcl	<i>B hücresi lenfoma protein (B-cell lymphoma protein)</i>
C	<i>Karbon</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCI779	<i>Temsirolimus</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cGMP	<i>Siklik guanozin 5'-monofosfat (cyclic guanosine 5'-monophosphate)</i>
COX	<i>Siklooksijenaz (cyclooxygenase)</i>
CRIM	<i>Conserved region in the middle</i>
CYP	<i>Sitokrom P450 (cytochrome P450)</i>
dk.	<i>Dakika</i>

DAG	<i>Diacyl glycerol</i>
DD	<i>Death domain</i>
DDKH	Damar düz kas hücresi
DEPTOR	<i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>
dl	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik asit (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Ditiyotreytol (<i>dithiothreitol</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGCG	<i>Epigallocatechin gallate</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
eIF3	<i>Eukaryotic initiation factor 3</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ET	Endotelin (<i>endothelin</i>)
F ₁₀₂	İnspirasyonla alınan oksijen fraksiyonu (<i>fraction of inspired oxygen</i>)
FAT	<i>The rapamycin-associated protein ataxia telangiectasia mutated transformation/transcription domain-associated protein</i>
FATC	<i>FAT carboxy-terminal homology domain</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKBP12	<i>FK506-binding protein</i>
FLA	Fosfolipaz (<i>phospholipase</i>)
FRB	<i>FKBP12-rapamycin binding</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GDP	Güanozin difosfat (<i>guanosine diphosphate</i>)
GMP	Güanozin 5'-monofosfat (<i>guanosine 5'-monophosphate</i>)
GTP	Güanozin 5'-trifosfat (<i>guanosine 5'-triphosphate</i>)
HCl	Hidroklorik asit (<i>hydrochloric acid</i>)
HEAT	<i>Huntington, elongation factor 3, the regulatory A subunit</i>

	<i>of protein phosphatase 2A, and Tor 1p</i>
HM	<i>Hydrophobic motif</i>
ICAM	Hücre içi adezyon molekülü (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
I κ B	κ B inhibitörü (<i>inhibitor of κB</i>)
IFN	İnterferon (<i>interferon</i>)
IgE	İmmunoglobulin E
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IKK	I κ B kinaz (<i>IκB kinase</i>)
IKKs	<i>IκB kinases</i>
IL	İnterlökin (<i>interleukin</i>)
IL-1ra	<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>
IP ₃	<i>Inositol-1,4,5-triphosphate</i>
IRAK	İnterlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>)
IRF	İnterferon düzenleyici faktör (<i>interferon regulating factor</i>)
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
i.p.	İntraperitoneal (<i>intraperitoneal, intraperitoneally</i>)
i.v.	intravenöz (<i>intravenous, intravenously</i>)
KCl	Potasyum klorür (<i>potassium chloride</i>)
kg	Kilogram
KH	Kalp hızı
LBP	Lipit bağlayıcı protein (<i>lipid-binding protein</i>)
l	Litre
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein (<i>low density lipoprotein</i>)
LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
Lkb11	Serin treonin kinaz 11
LPS	Lipopolisakkarit (<i>lipopolysaccharide</i>)
LRR	<i>Leucin-repeated receptor</i>
LTA	Lipoteikoik asit (<i>lipoteichoic acid</i>)
Mal	<i>MyD88 adaptor-like</i>
MAPK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz

	<i>(mitogen-activated protein kinase)</i>
MD	<i>Myeloid differentiation</i>
MEK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz <i>(mitogen-activated protein kinase kinase)</i>
mg	Miligram
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
mLST8	<i>Mammalian lethal with sec-13 protein 8</i>
MODS	Çoklu organ işlev yetmezliği sendromu <i>(multiple organ dysfunction syndrome)</i>
MPO	Miyeloperoksidaz (<i>Myeloperoxidase</i>)
mRNA	Haberci ribonükleik asit (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
mSin1	<i>Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1</i>
mTOR	Rapamisinin memelilerdeki hedefi <i>(mammalian target of rapamycin)</i>
mTORK	mTOR kompleks
MyD	Miyeloit farklılaşma faktörü (<i>myeloid differentiation factor</i>)
NaCl	Sodyum klorür (<i>sodium chloride</i>)
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat (<i>sodium bicarbonate</i>)
Nf1	Nörofibromatozis tip 1 (neurofibromatosis type 1)
NF-κB	Nükleer faktör κB (<i>nuclear factor κB</i>)
NK	<i>Natural killer cells</i>
NO	Nitrik oksit (<i>nitric oxide</i>)
NOS	Nitrik oksit sentaz (<i>nitric oxide synthase</i>)
O	Oksijen
O ₂ ⁻	<i>Superoxide</i>
OAB	Ortalama arter basıncı
P	İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi (<i>probability</i>)
P	<i>Phosphate</i>
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
Pa _{CO2}	Kan kısmi karbondioksit basıncı <i>(partial pressure of carbon dioxide in the blood)</i>
PAM	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄

PAMP	Patojen ile ilişkili moleküler kalıplar (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PE	Fenilefrin (<i>phenylephrine</i>)
PG	Prostaglandin (<i>prostaglandin</i>)
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (<i>prostaglandin I₂</i>); prostasiklin (<i>prostacyclin</i>)
PGN	Peptidoglikan (<i>peptidoglican</i>)
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
pIκB	<i>Phosphorylated inhibitor of κB</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	Protein kinaz C (<i>protein kinase C</i>)
PKG	Protein kinaz G (<i>protein kinase G</i>)
p-NF-κB	Fosforile nükleer faktör κB (<i>phosphorylated nuclear factor κB</i>)
Protor1/2	<i>Protein observed with rictor 1 and 2</i>
PRR	Kalıp tanıma reseptörleri (<i>pattern recognition receptor</i>)
RAD001	<i>Everolimus (dihydroxy-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-hydroxyethoxy)-3-methoxycyclohexyl]propan-2-yl]-19,30-dimethoxy-15,17,21,23,29,35-hexamethyl-11,36-dioxa-4-azatricyclo[30.3.1.0 hexatriaconta-16,24,26,28-tetraene-2,3,10,14,20-pentone)</i>
RAPA	Rapamisin (<i>rapamycin</i>)
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin</i>
RBD	<i>Ras binding domain</i>
Rheb	<i>Ras-homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNA	Ribonükleik asit (<i>ribonucleic acid</i>)
RNC	<i>Raptor N-terminal conserved domain</i>
rpS6	Ribozomal protein S6 (<i>ribosomal protein S6</i>)
S6K	S6 kinaz (<i>S6 kinase</i>)
sa.	Saat
SDS	Sodyum dodesil sülfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)

SE	<i>Status epilepticus</i>
Ser	Serin
SGK1	<i>Serum and glucocorticoid-induced protein kinase</i>
SIRS	Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (<i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
Sn.	Saniye
SKB	Sistolik kan basıncı
<i>S. pneumonia</i>	<i>Streptococcus pneumonia</i>
SSA	Sığır serum albümini (<i>bovine serum albumin</i>)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAK	Transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz (<i>transforming growth factor-activated kinase</i>)
TCR	T hücresi reseptörü (<i>T-cell receptor</i>)
TE	Tris/etilendiamintetraasetik asit (<i>tris-ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
TEF	Trombosit etkinleştirici faktör
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin</i> (<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>)
TGF	Doku büyüme faktörü (<i>tissue growth factor</i>)
Thr	Treonin (<i>threonin</i>)
TK	<i>Tyrosine kinase</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tümör nekrozlaştırıcı faktör (<i>tumor necrosis factor</i>)
TOR	Rapamisin hedefi (<i>target of rapamycin</i>)
TRAF	Tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>)
TRAM	<i>Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>

TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
TTÇ	Tris tampon çözeltilisi
U	<i>Ubiquitization</i>
Ub	<i>Ubiquitization</i>
µl	Mikrolitre
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
YKST	Yağsız kurutulmuş süt tozu (<i>non-fat dry milk</i>)
WD40	<i>About 40 amino acids with conserved W and D forming four anti-parallel beta strands</i>

ÖZET

Sıçanlarda Lipopolisakkaridin Neden Olduğu Hipotansiyon ve Enflamasyona mTOR'nin Katkısının Araştırılması

Bu çalışmada spesifik bir mTOR inhibitörü olan rapamisin kullanılarak, sıçanlarda lipopolisakkarit (LPS)'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamatuvar süreçte bir serin/treonin kinaz olan mTOR'nin etkinliği araştırıldı. *In vivo* deneylerde, kontrol grubu olarak serum fizyolojik ve septik şok grubu olarak LPS, deney grubu olarak da tek başına veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanan sıçanlar kullanıldı. Serum fizyolojik ve LPS, sıçanlara 0. saat kan basıncı ölçümünün ardından uygulandı, rapamisin ise serum fizyolojik veya LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra i.p. olarak uygulandı. Sıçanlara, serum fizyolojik/LPS enjeksiyonundan hemen önce ve 1, 2, 3 ve 4 saat sonra invazif olmayan bir yöntem ile kuyruklarından ortalama arteriyel basınç (OAB) ve kalp hızı (KH) değerleri ölçüldü. Deneyler sonunda öldürülen sıçanlardan kan, sağ böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterleri izole edildi. İzole edilen bu dokulardan doku homojenatları hazırlandı ve bu homojenatlarda nükleer faktör κ B (NF- κ B) p65, κ B inhibitörü (I κ B)- α , ribozomal protein S6 (rpS6), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), indüklenebilir siklooksijenaz (COX-2) protein ekspresyonları ve/veya fosforilasyonları ile güçlü proenflamatuvar sitokin olan tümör nekrozaştırıcı faktör (TNF)- α düzeyleri ve miyeloperoksidaz (MPO) etkinliği araştırıldı. rpS6 protein ekspresyonu LPS uygulaması ile değişmezken, I κ B- α protein ekspresyonu azaldı. rpS6 fosforilasyonu, NF- κ B p65 ekspresyonu ve fosforilasyonu, I κ B- α fosforilasyonu, iNOS ve COX-2 protein ekspresyonları ise LPS ile artış göstermiştir. LPS uygulaması ile serum ve/veya dokularda ölçülen nitrit, nitrotirozin, 6-keto-PGF_{1 α} , TNF- α düzeylerinde ve MPO etkinliğinde artma gözlemlendi. LPS'nin neden olduğu tüm bu değişiklikler rapamisin ile geri çevrildi. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, sıçanlarda LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamatuvar süreçte mTOR enziminin etkinliğinin katkısının olduğunu gösterdi.

Anahtar kelimeler: LPS, mTOR, NF- κ B, enflamasyon, hipotansiyon

ABSTRACT

Investigation of Contribution of mTOR in LPS-Induced Hypotension and Inflammation in Rats

In this study, the activation of mTOR, a serine/threonin kinase, on lipopolysaccharide (LPS)-induced hypotension and inflammatory process in rats was investigated by using rapamycin a specific inhibitor of mTOR. In vivo experiments, saline, LPS, rapamycin and/or LPS+rapamycin-treated rats were used as control, septic shock and experimental group, respectively. Saline and LPS were administered after 0th hour blood pressure measurement and rapamycin was administered 1 hour after saline or LPS i.p. injection. Just before injection of either saline or LPS in rats and 1, 2, 3 and 4 hour after injection, mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were measured from tail by non-invasive method. At the end of the experiments, rats were sacrificed and blood, right kidney, heart, thorasic aorta, superior mesenteric artery were isolated. Tissue homogenates were prepared from those tissue and the expression and activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) p65, (inhibitor of κ B) I κ B- α , inducible nitric oxide syntase (iNOS), inducible cyclooxygenase (COX-2), ribosomal protein S6 (rpS6), tumor necrosis factor (TNF)- α levels which is potent proinflammatory cytokine and myeloperoxidase (MPO) activity were investigated. The expression of rpS6 did not change with LPS administiration, but the protein expression of I κ B- α was decreased. The phosphorylation of rpS6 and I κ B- α , the expression and phosphorylation of NF- κ B p65, and the expression of iNOS and COX-2 showed an increase with LPS. Nitrit, nitrotyrosine, 6-keto-PGF1 α , TNF- α , and MPO levels were increased in serum and/or tissue homogenates with LPS administration. All of these changes which induced by LPS were reversed by rapamycin. The results of the study demonstrated the contribution of mTOR in LPS-induced hypotension and inflammatory process in rats.

Keywords: LPS, mTOR, NF- κ B, inflammation, hypotension

1. GİRİŞ

Sepsis koagülasyon sistemi, fibrinolitik sistem, kompleman sistemi, kinin sistemi ve sitokin kaskadının yer aldığı hematolojik ve hemodinamik değişimler ile organ yetmezliği ve ölümün gözlendiği çok bilinmeyenli bir denklem olarak tanımlanmaktadır (1).

Sepsis ve septik şok özellikle organ destek sistemlerinde ilerleyen teknolojiye ve bu teknoloji sayesinde sepsis ve septik şokun patofizyolojisininin daha da iyi aydınlanmasına karşın, yoğun bakım birimlerindeki kritik hastalarda önde gelen mortalite nedeni olmaya devam etmektedir (2). Tıp ve teknoloji alanındaki bu gelişmelere karşın sepsisin görülme sıklığı giderek artmaktadır. 2000-2008 yılları arasında sepsis nedeniyle hastaneye yatmalar iki katı daha fazla artarak, 326.000 bireyden 727.000 bireye çıkmıştır (3).

Sepsis ve septik şok görülme riski uç yaş grupları olarak tanımlanan, prematüre ve yenidoğanlarda veya 65 yaş üzerindeki bireylerde oldukça yüksektir. Bununla birlikte nötropeni, malignite, disproteinemi, immünosupresyon ve glukokortikoid kullanımı gibi savunma mekanizmalarının zayıfladığı durumlarda; siroz, diyabet ve kronik böbrek yetmezliği gibi birincil hastalığı bulunanlarda; idrar sondası, entübasyon, intravenöz kateter veya cerrahi girişim uygulananlarda ve yanık, travma, septik düşük ve lohusalık durumlarında sepsis ve septik şok görülme riski artmaktadır (1). İyatrojenik etkenler, cinsiyet (erkek) ile birlikte immüniteyi düzenleyen genlerin polimorfizminin yer aldığı genetik etkenler bireyleri septik şoka yatkın duruma getirebilen etkenler olarak kabul edilmektedir (3-8).

Amerika Birleşik Devleti'nde şiddetli sepsis görülme sıklığı 1000 nüfus için 3 olgu ve 100 hastane çıkışında 2,26 olgudur; şiddetli sepsisi bulunan hastaların %51'i yoğun bakım tedavisi görmekte ve bir %17'3'lük bölümünde ise yoğun bakım biriminde yapay ventilasyon veya koroner yoğun bakım biriminde tedavi uygulanmaktadır. Mortalite oranı %28,6'dır. Çocuklarda mortalite oranı ise %10 olup,

85 yaş üstünde ise bu oran %38,4'e çıkmaktadır (9).

Çoklu organ yetmezliğinin eşlik ettiği septik şok yoğun bakım birimlerinde en sık görülen ölüm nedenidir. Septik şokta hemodinamik durum değişkendir ve pek çok mediyatör sistemik vasküler direnci azaltırken, kalp debisi ile normal perfüzyon basıncı dengelenememekte ve şok durumu gelişmektedir (10).

Sepsis ve septik şok patofizyolojisi bakteri hücre duvarı bileşeni olan lipopolisakkarit (*lipopolysaccharide*; LPS) üzerine yoğunlaşmıştır (11). LPS, septik şokta ortaya çıkan tehlikeli kan basıncı azalmasından sorumludur (12). LPS'nin toksisitesi ile immunolojik etkisinden sorumlu olan ve endotoksin olarak da adlandırılan, yapının en iç tabakasını oluşturan immünoreaktif, biyolojik olarak etkili olan lipit A bileşenidir (13). Lipit A, savunma sisteminde yer alan çeşitli reseptörler tarafından tanınarak güçlü bir immün yanıt oluşturmaktadır (14).

LPS sinyal iletilisinde çeşitli tirozin kinaz, serin/treonin kinaz enzimleri, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz enzimlerinin yanı sıra, nükleer faktör- κ B (*nuclear factor- κ B*; NF- κ B) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkinleşmesi ile proenflamatuvar sitokinler ve kemokinler yer almaktadır. Bu konu ile ilgili olarak daha önce yapılan çalışmalarda bir tirozin kinaz olan Dtk'nin LPS sinyal iletilisindeki rolü bildirilmiştir. Bununla birlikte, laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalar ile Dtk'nin LPS ile oluşturulan septik şok ve zimosan ile oluşturulan septik olmayan şoktaki katkısı gösterilmiştir (15, 16).

Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (*mammalian target of rapamycin*; mTOR), 290 kDa molekül ağırlığında bir serin/treonin kinaz enzimidir. mTOR, farklı düzenleyici alt birimlere bağlanarak farklı sinyal ileti yollarında yer alan ve rapamisine duyarlılıkları farklı kompleksleri oluşturduğu bilinmektedir. Farklı komplekslerle birlikte translasyon, translasyonel olayların yanı sıra transkripsiyonel olayların düzenlenmesi, ribozom biyogenez, otofaji, glukoz metabolizması, hipoksiye karşıya verilen hücresel yanıt, hücre yaşamı ve aktin hücre iskeleti organizasyonu gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. mTOR, nötrofiller, mast hücreleri, doğal

öldürücü hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doğal immün sistemin hücreleri ile T hücreleri ve B hücrelerinin dahil olduğu kazanılmış immün sistem hücrelerinin etkinliklerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır ve immün yanıtlar ile organ homeostazını düzenlediği bilinmektedir (17-20).

Bu tez çalışmasında, spesifik bir mTOR inhibitörü olan ve *Food and Drug Administration* tarafından onay alarak, organ transplantasyonu sonrasında kullanımı ile klinik kullanıma girmiş rapamisin LPS ile sıçanlarda oluşturulan enflamasyon ve hipotansiyondaki rolü, mTOR/I κ B- α /NF- κ B yolu ve ilişkili proenflamatuvar ve aynı zamanda vazodilatör mediyatörler üzerindeki etkisi incelenerek araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis ve Septik Şok

Şok, bütün vücutta genel kan akımı yetersizliği anlamında kullanılmaktadır. Bu yetersizlik, kan akımının aşırı derecede azalması nedeniyle özellikle oksijen olmak üzere diğer maddelerin doku ve hücrelere taşınmasının aşırı derecede azalması sonucu, dokularda zedelenme oluşturacak düzeydedir. Hemorajik şok, nörojenik şok, anafilaktik şok ve septik şok olmak üzere farklı şok türleri vardır. Septik şok, hastanelerde kardiyojenik şok dışında diğer şok türleri arasında daha sık ölüme neden olan şok türüdür (21).

Septik şok, sepsisin en ağır komplikasyonudur ve yaşamı tehdit edici bir hastalıktır (22). Yunan dilinde “pislenme” anlamına gelen sepsis, enfeksiyona karşı tüm organ sistemlerinin rol oynadığı, klinik, hemodinamik, hematolojik, biyokimyasal ve enflamatuvar yanıtın ortaya çıkardığı bulguları içeren heterojen klinik bir tablodur (23). Sepsis yüksek mortalite ile seyreden ve ciddi ekonomik maliyeti olan, giderek artan önemli klinik bir sorundur (24). Uzun yıllar sepsis ve enfeksiyon terimleri birbirlerinin alternatifi olarak kullanılmışsa da, son yıllarda yapılan araştırmalar sepsisin vücudu istila eden organizmadan çok, konağın yetersiz immünolojik yanıtına bağlı olarak ortaya çıkan bir enflamatuvar yanıt olduğunu göstermiştir (2). Septik şok, yeterli sıvı resüsitasyonuna karşın devam eden -refrakter- hipotansiyon ve perfüzyon anormallikleriyle belirgin, ivergen dolaşım yetmezliği ile karakterize sepsis durumudur (11). Çizelge 2.1’de sepsis ve septik şok ile ilgili tanımlar yer almaktadır. Hipotansiyon, sistolik arteriyel kan basıncının 90 mmHg’den az veya hipotansiyona neden olabilecek başka bir neden yokken, sıvı resüsitasyonuna karşın sistolik arteriyel kan basıncında 40 mmHg’den daha fazla azalma olarak tanımlanmaktadır (25). Sepsis tablosunun septik şoka dönüşmesi hastaneye yatışın ardından ilk 24 saat içinde olmaktadır (26). Septik şokta yalnızca morbidite oranı değil, aynı zamanda mortalite oranında da artma gözlenmektedir (27).

Çizelge 2.1. Sepsis ve septik şok ile ilgili tanımlar.

Enfeksiyon	Normalde steril olan konakçıda mikroorganizmanın varlığı veya mikroorganizmanın yayılmasına karşı verilen yangılı yanıt ile belirgin mikrobiyal durum.
Bakteriyemi	Kanda canlı bakteri bulunması durumu.
Sistemik yangılı yanıt sendromu	Şiddetli klinik belirtiler ile kendini gösteren sistemik enflamatuvar yanıt. Sayılan durumlardan en az ikisi olmalı: Ateş > 38 °C veya < 36 °C; kalp hızı > 90 atım/dk; solunum hızı ≥ 20 solunum/dakika veya Pa _{CO2} < 32 torr (< 4.3 kPa); lökosit > 12.000 hücre/mm ³ veya > %10 olgunlaşmamış hücre.
Sepsis	Bilinen veya olası bir enfeksiyona karşı verilen sistemik yanıt durumu. Sayılan durumlardan bazıları olabilir: <u>Genel değişkenler</u> (ateş > 38.3°C; hipotermi < 36°C; kalp hızı > 90 atım/dk. veya yaşa göre normal değerinden iki standart sapma daha çok; takipne; mental durumda değişiklik; anlamlı derecede ödem veya pozitif sıvı dengesi [24 saatten uzun süre > 20 ml/kg]; hiperglisemi [diyabet yokluğunda kan glukozu > 140 mg/dl veya 7.7 mmol/l]); <u>enflamasyona ilişkin değişkenler</u> (lökositoz [lökosit sayısı > 12.000 µl ⁻¹]; lökopeni [lökosit sayısı < 4.000 µl ⁻¹]; %10'dan çok olgunlaşmamış biçimde normal lökosit sayısı; plazma C-reaktif protein düzeyi normal değerinden iki standart sapma daha çok; plazma prokalsitonin düzeyi normal değerinden iki standart sapma daha çok); <u>hemodinamik değişkenler</u> (arteriyel hipotansiyon [yetişkinlerde SKB < 90 mmHg, OAB < 70 mmHg veya SKB'de > 40 mmHg kadar bir azalma ya da kan basıncı yaşa göre normal değerinden iki standart sapma daha az]); <u>organ işlev bozukluğu ile ilgili değişkenler</u> (arteriyel hipoksemi [Pao ₂ /Fio ₂ değeri < 300]; ıveğen oligoüri [yeterli miktarda sıvı uygulanmasına karşın idrar çıkışı en az 2 saat süreyle < 0.5 ml/kg/sa.]; kreatinin düzeylerinde artma [> 0.5 mg/dl veya 44.2 µmol/l]; pıhtılaşma anormallikleri [uluslararası normalize oranı > 1.5 veya etkinleştirilmiş kısmi tromboplastin süresi > 60 Sn.]; ileus [bağırsak sesleri yokluğunda]; trombositopeni [trombosit sayısı < 100.000 µl]; hiperbilirubinemi [plazma toplam bilirubini > 4 mg/dl veya 70 µmol/l]); <u>doku perfüzyonu ile ilgili değişkenler</u> (hiperlaktatemi [> 1 mmol/l]; azalmış kapiler dolun veya lekelenme).

Çizelge 2.1. (devam) Sepsis ve septik şok ile ilgili tanımlar.

Sepsisin neden olduğu hipotansiyon	Hipotansiyona neden olabilecek bir durum olmamasına karşın, SKB'nin 90 mmHg'den düşük olması veya OAB'nin 70 mmHg'den düşük olması ya da SKB'de 40 mmHg'den daha çok bir azalma olması veya kan basıncının yaşa göre normal değerinden iki standart sapma daha az olması durumu.
Sepsisin neden olduğu doku hipoperfüzyonu	Enfeksiyonun neden olduğu hipotansiyon, laktat düzeylerinde yükselme veya oligoüri olması durumu.
Şiddetli sepsis	Sepsisin neden olduğu organ işlev bozukluğu veya doku hipoperfüzyonu ile birlikte olan sepsis durumu. Enfeksiyon nedeniyle olduğunu düşündüren sayılan durumlardan herhangi biri olabilir: Sepsisin neden olduğu hipotansiyon; laktat düzeyleri normal laboratuvar üst değerlerinin üzerinde; yeterli miktarda sıvı uygulanmasına karşın idrar çıkışı 2 saatten uzun süre < 0.5 ml/kg/sa. enfeksiyon kaynağı olarak pnömoni yokluğunda Pao ₂ /Fio ₂ değeri < 250 ile birlikte ıvegen akciğer zedelenmesi; enfeksiyon kaynağı olarak pnömoni varlığında Pao ₂ /Fio ₂ değeri < 200 ile birlikte ıvegen akciğer zedelenmesi; kreatinin > 2 mg/dl (176.8 µmol/l); bilirubin > 2 mg/dl (34.2 µmol/l); trombosit sayısı < 100.000 µl; koagülopati (uluslararası normalize oranı > 1.5).
Septik şok	Yeterli sıvı resüsitasyonuna karşın hipotansiyon ve perfüzyon anormalliklerinin de birlikte olduğu sepsis. Her zaman değil ise de, laktik asidoz, oligoüri veya mental durumda ıvegen bir bir değişiklik ile birlikte görülebilir. İnotropik veya vazopresör ilaçları kullanan hastalar perfüzyon anormalliklerinin ölçüldüğü sırada hipotansif olmayabilirler.
Çoklu organ yetmezliği	Girişim ile homeostazın sağlanamadığı hastalarda organ işlevlerinin değişmesi.

Fio₂, inspirasyonla alınan oksijen fraksiyonu; OAB, ortalama arteriyel basınç; PaCO₂, kan kısmi karbondioksit basıncı; SIRS, sistemik enflamatuvar yanıt sendromu; SKB, sistolik kan basıncı.

2.1.1. Epidemiyolojisi

1990 yılında *An American College of Chest Physicians/Society* tarafından sepsis ve komplikasyonları olan septik şok, ıvegen solunum sıkıntısı sendromu (*acute respiratory distress syndrome*; ARDS) ile çoklu organ yetmezliği sendromunu (*multiple organ dysfunction syndrome*; MODS) tanımlanmıştır. Bu topluluk tarafından, sepsisin enfeksiyon etkenine karşı verilen sistemik enflamatuvar bir yanıt olduğu, bununla birlikte septik şok ve MODS'a kadar ilerleyen immün yanıtın bir bölümünü oluşturduğu belirtilmiştir (28).

Birleşik Devletler'de 2010 ile 2020 yılları arasında şiddetli sepsis ve septik şok olgularının sayısının 934,000'den 1110,000'e ulaşması öngörülmektedir (29). Kuzey Amerika'da yapılmış olan bir epidemiyolojik çalışmada her 1000 kişilik popülasyonda 3 sepsis olgusunun görüldüğü bildirilmiştir (30). Adhikari ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada Birleşik Devletler'deki görülme sıklığı tüm dünyaya ekstrapole edilmiştir ve dünya genelinde her yıl 19 milyonun üzerinde sepsis gözlendiği tahmin edilmektedir. Gerçekte görülme sıklığının ise muhtemelen daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir (31).

Yılda ortalama 100.000 kişiden yaklaşık 50-95'inin sepsise yakalandığı ve bu durumun her yıl %9 oranında artış gösterdiği bildirilmiştir. Hastaneye yatanların yaklaşık olarak %2'si sepsise yakalanmaktadır ve sepsisli hastaların yaklaşık %9'unun şiddetli sepsise dönüştüğü ve bu hastaların da %3'ünde septik şokun geliştiiği gözlenmiştir. Yoğun bakım birimlerinde ise septik şok %10 oranında gözlenmektedir (4, 32).

Enfeksiyona karşı verilen ve sistemik enflamatuvar yanıt olarak başlayan sonrasında sepsis, şiddetli sepsis ve septik şoka kadar ilerleyebilen bu klinik olguda mortalite oranı giderek artmaktadır (11). Herhangi bir organda yetmezlik gelişen sepsis ve septik şoklu hastaların oranı %19,1'den %30,2 oranına yükselmiştir ve bu oran hastalığın şiddetinin bir göstergesidir. Yetmezlik gelişen organ sayısının 1'den 5'e kadar artması mortalite oranının %30,2'den %100'e çıkmasına yol açmaktadır (11).

Şiddetli sepsis ve septik şokta sıklıkla yetmezlik gelişen organlar akciğerler ve böbreklerdir. Bunlara ek olarak kardiyovasküler işlev bozukluğu, hematolojik sorunlar, metabolik bozukluklar ve nörolojik sorunlar da görülebilmektedir. MODS, organların işlevlerinde meydana gelebilecek geçici işlev bozukluğu veya geri dönüşümsüz organ yetmezliği olarak tanımlanmaktadır. MODS’de etkenler enfeksiyon, şiddetli sepsis, septik ve diğer şok durumlarında, travma ile yanık olguları olarak tanımlanmaktadır ve daha çok kalp, böbrek, beyin, akciğer ve karaciğer gibi yaşamsal önemi yüksek olan organlarda gözlenmektedir. Septik şokta olduğu gibi yoğun bakım birimlerinde mortalite ve morbidite oranı çok yüksektir (33).

Septik şokun ortaya çıkması insan yaşamının 60’lı yaşlarında pik yapmaktadır. Kanseri, immün sistemin baskılanması, süregen obstrüktif akciğer hastalığı gibi süregen hastalıklar, süregen organ yetmezliği, yatrogenik etkenler ve erkek cinsiyet ile immüniteyi düzenleyen genlerin polimorfizmi gibi genetik etkenler insanları septik şoka yatkın hale getirebilen etkenler olarak kabul edilmektedir (3-8).

Tıp ve teknoloji alanındaki gelişmelere karşın, sepsis ölüm sıklığı giderek artmaktadır. 2000 yılından 2008 yılına kadar sepsis nedeniyle hastaneye yatışlar iki katından daha çok artmış olup, 326.000 kişiden 727.000 kişiye çıkmıştır. %15 ile %30 arasında değişen mortalite oranı ile ABD’de ölüm nedenleri sıralamasında 11. sırada yer almakta ve çocukluk çağındaki ölümlerin %7’sinden sorumlu olduğu bilinmektedir (34-37). Sepsis, önemli bir ekonomik yükü temsil etmekte olup, 2003 yılından 2007 yılına kadar şiddetli sepsis hastalarının toplam hastane maliyetlerinin %57 oranında artarak 24,3 milyar dolara ulaştığı bildirilmiştir (38). Toplumda yaş ortalamasının giderek artması, antimikrobiyal ilaçlara dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve girişimsel terapötik yaklaşımların yaygınlaşması nedeniyle önümüzdeki yıllar içerisinde hastane maliyetlerinin de buna paralel olarak artması beklenmektedir (39).

2.1.2. Etiyolojisi

Sepsis ve septik şok herhangi bir mikroorganizma ile ilişkili olabileceği gibi en yaygın etiyolojik patojenler Gram-pozitif bakteriler (hastaların %40'ı), Gram-negatif bakteriler (hastaların %38'i) ve funguslardır (hastaların %17'si) (11). Belirli bazı virüs ve riketsiyalar da benzer sendromlar oluşturabilmektedir (11). Virüs ve parazitlerin etiyolojideki rolü önemsiz kabul edilmekle birlikte, %2-4 oranında etken oldukları belirtilmiştir (4). Gram-negatif bakterilerin etkinliği özellikle jenidoüriner sistem enfeksiyonlarıyla birlikte daha da artmıştır (40).

Karın içi ve üriner sistem enfeksiyonlarının ardından gözlenen sepsis olgularının yaklaşık olarak yarısında etkenin *S. pneumonia* olduğu tespit edilmiştir (41-44). Sepsise ait bir epidemiyolojik çalışma, 1979 ile 2000 yılları arasında Gram-pozitif enfeksiyonların gram negatif enfeksiyonlardan yüksek olduğunu göstermiştir (45). Ancak, son yıllarda 7 ülkede 14,000 yoğun bakım biriminde yatan ve şiddetli sepsis tanısı konulan hastalar ile yapılan bir çalışmada hastalardan %62 oranında Gram-negatif bakteriler; %47 oranında Gram-pozitif bakteriler ve %19 oranında funguslar izole edilmiştir (44). Sepsis ve şiddetli sepsis olgularında *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* Gram-pozitif bakteriler içerisinde; *Escherichia coli* ise Gram-negatif bakteriler içerisinde en yaygın olarak izole edilen etiyolojik etkindir (43, 46).

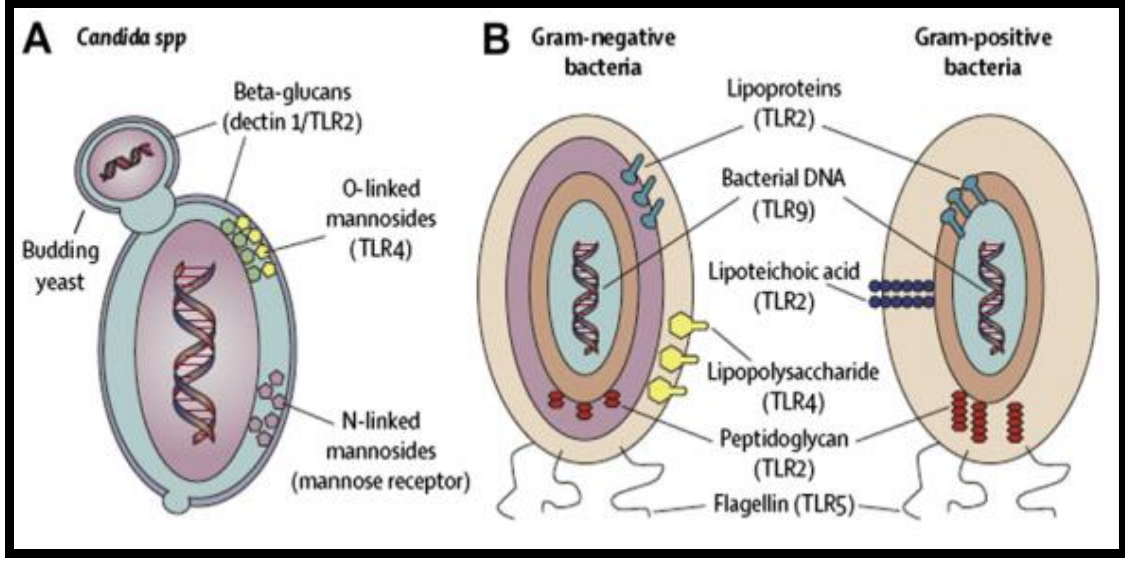
Solunum sistemi, üriner sistem ve karın içi enfeksiyonlarının kan dolaşımına geçerek sepsis tablosu oluşturma oranının %80'den fazla olduğu gösterilmiştir. Çizelge 2.2'de sepsis ve septik şok patojenezinde yer alan başlıca patojen mikroorganizmalar listelenmiştir (22).

Çizelge 2.2. Septik şok patojenezinde yer alan başlıca patojenler.

Etken	Görülme sıklığı*
<u>Gram-Pozitif bakteriler</u>	%30-50
Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>	%14-24
Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>	%5-11
Diğer <i>Staphylococcus</i> türleri	%1-3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	%9-17
Diğer <i>Streptococcus</i> türleri	%6-12
<i>Enterococcus</i>	%3-13
Anaeroblar	%1-2
Diğer Gram-pozitif bakteriler	%1-5
<u>Gram-Negatif Bakteriler</u>	%25-30
<i>Escherichia coli</i>	%9-27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%8-15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	%2-7
Diğer Enterobakter türleri	%6-16
<i>Haemophilus influenzae</i>	%2-10
Anaeroblar	%3-7
Diğer Gram-negatif bakteriler	%3-12
<u>Funguslar</u>	
<i>Candida albicans</i>	%1-3
Diğer <i>Candida</i> türleri	%1-2
Mayalar	%1
<u>Parazitler</u>	%1-3
<u>Virüsler</u>	%2-4

*Klinik çalışmalar ve epidemiyolojik çalışmalardan alınmıştır.

Sepsis ve septik şok etiyolojisinde yer alan başlıca patojenler olan bakterilerin ve fungusların immün sistem reseptörleri ile olan etkileşimleri Şekil 2.1’de gösterilmiştir (47).



Şekil 2.1. Septik şok etiolojisinde yer alan başlıca patojenler ve etkileştikleri immün sistem reseptörleri. (A) Funguslar ve (B) bakteriler. *TLR, toll-like receptor.*

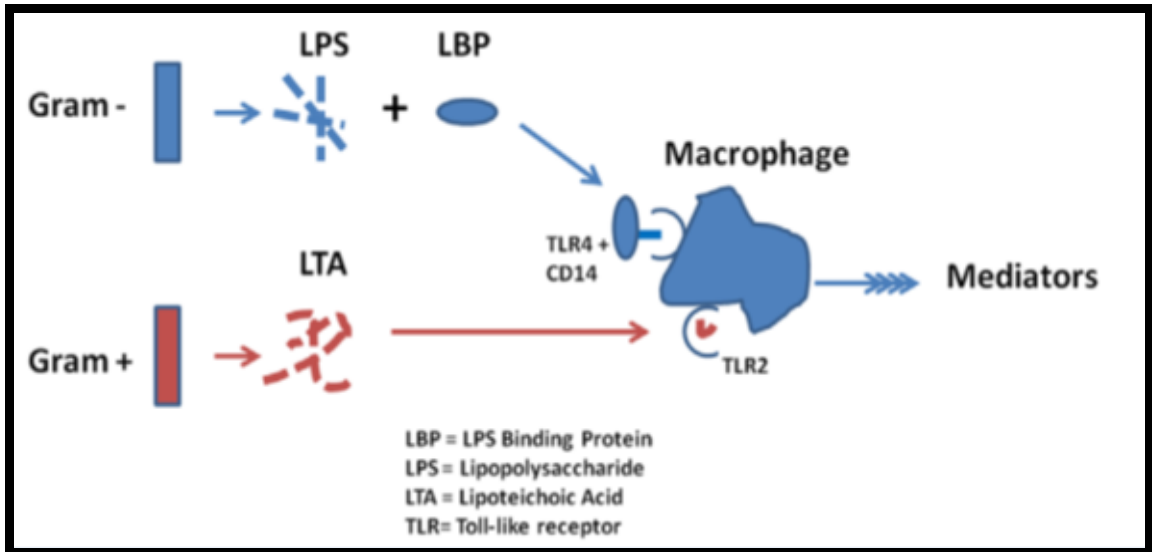
2.1.3. Patofizyolojisi

Septis ve septik şok patofizyolojisi, deri, respiratuvar sistem, jeniöüriner sistem veya gastrointestinal sistem aracılığıyla invazif mikroorganizmaların dolaşıma katılmasıyla başlamaktadır (29, 48). Bu mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de listelenmiştir. Septik şokta patojen ve konağın savunma sistemi arasındaki etkileşim sonucunda meydana gelen patofizyolojik değişimler oldukça karmaşıktır ve mikroorganizmanın yok edilmesine aracılık eden proenflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ve saliverilmesi artmakta bunun yanı sıra, oluşan bu enflamatuvar yanıtı kontrol etmek amacıyla antienflamatuvar mediyatörlerin oluşumu da artış göstermektedir. Ortaya çıkan bu enflamatuvar yanıtlar konak dokusunda zedelenmeye yol açmakta, artan antienflamatuvar yanıtlar lökosit hücrelerinin etkinleşmesine aracılık etmektedir. Bunun ardından patojenin yok edilmesi için başlayan yerel enflamatuvar süreçler ortadan kaybolmakta ve yerini sistemik enflamatuvar yanıtlara bırakmaktadır. Böylece yalnızca enfeksiyon olarak başlayan enflamatuvar yanıt sepsis, şiddetli sepsis ya da septik şoka dönüşebilmektedir (11).

Septik şok gelişmesine yol açan süreçler, çok sayıda farklı mediyatör ve hücreleri içermesi nedeniyle kompleks ve multifaktöriyeldir. Bu kompleks sendrom mikrobiyal

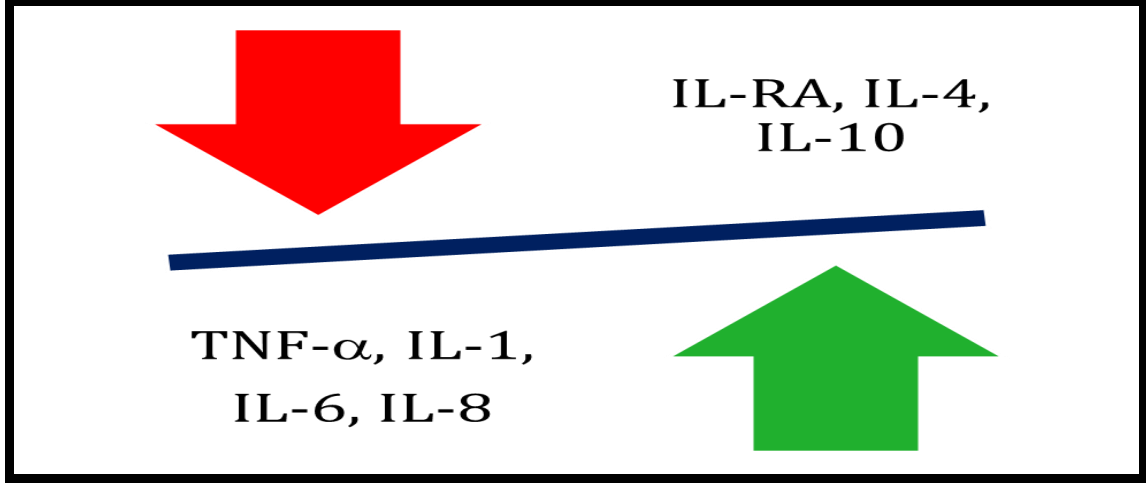
etkene karşı enflamasyon ve koagülasyon kaskatlarının eş zamanlı etkinleşmesi ile belirgindir (29, 49). Dolaşımda mikroorganizmanın bulunması daha çok fagositler olmak üzere, lökosit hücrelerinin etkinleşmesine ve bu hücrelerden sitokin salıverilmesine aracılık etmektedir (29). Etkinleşen bu hücrelerden salıverilen mediyatörlerin etkisi altında çok sayıda ve farklı hücreler etkinleşmekte ve buna bağlı olarak da zarar verici süreçler başlatılmaktadır. İlk etkinleşen hücre olan makrofaj hücreleri, tümör nekrozlaştırıcı faktör (*tumor necrosis factor*; TNF)- α , interlökin (*interleukin*; IL)-1 ve IL-6'yı içeren proenflamatuvar nitelikteki sitokinlerin oluşumuna aracılık etmekte ve oluşumları artan bu proenflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesine neden olmaktadır (11). Sitokinler enflamatuvar ve immün yanıtlarda kilit rol oynamamakla birlikte, immün yollarının daha fazla etkinleşmesine aracılık etmektedir (29). Aktive olan makrofaj hücrelerinden salıverilen bu proenflamatuvar mediyatörler, endotel hücreler, lenfositler, hepatositler, nötrofiller ve trombositlerin dahil olduğu farklı hücre türlerini de etkilemektedir (11).

Septik şok etiyojisinde yer alan en yaygın patojenler olan bakterilerin, immün sistemine ait makrofaj hücrelerini etkinleştirmesi ve etkinleşen bu hücrelerden mediyatör salıverilmesi üzerine olan etkileri Şekil 2.2'de özetlenmiştir (50).



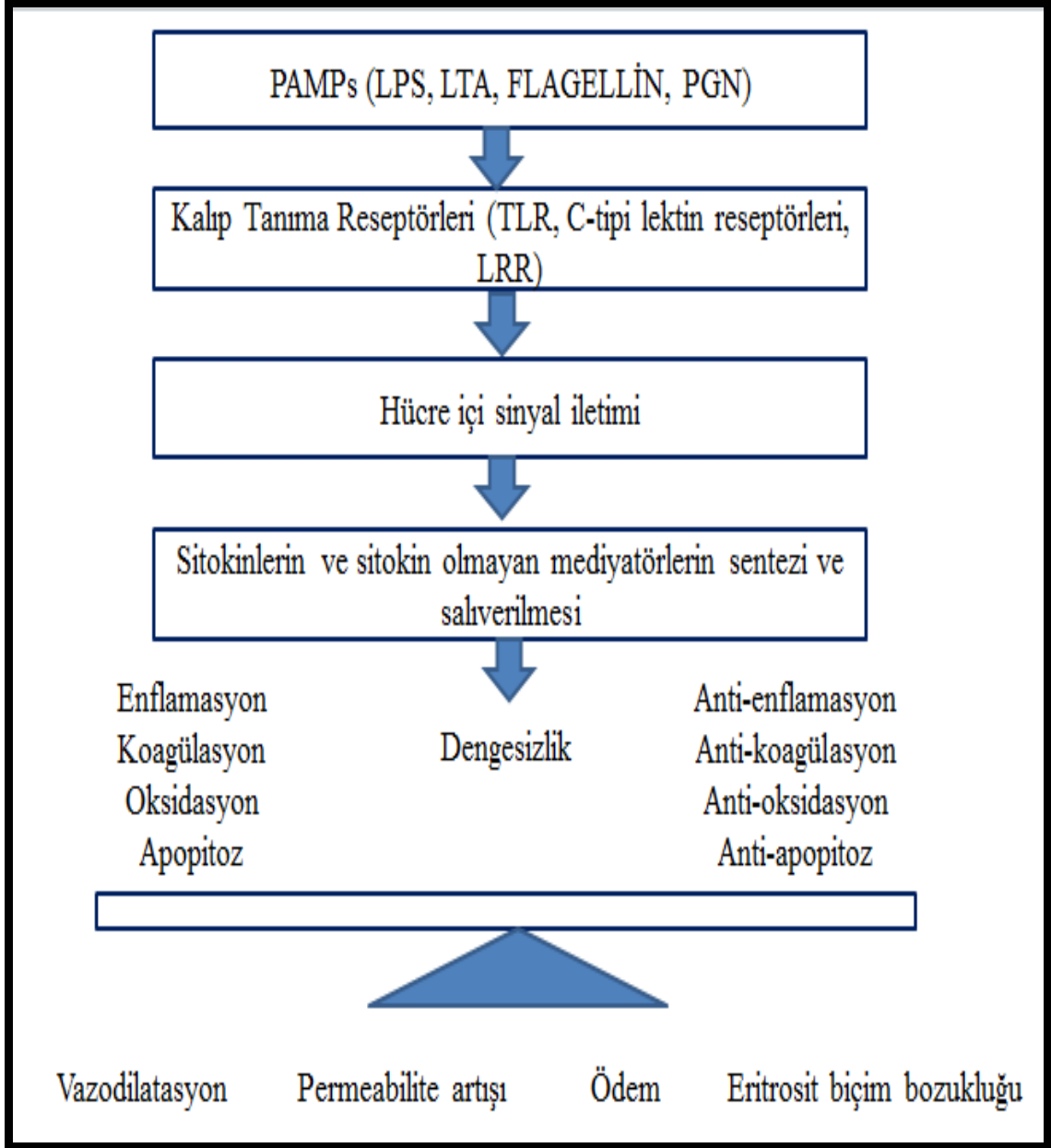
Şekil 2.2. Sepsis ve septik şok patofizyolojisinde makrofaj hücrelerinden mediyatör salıverilmesi. *LBP*, LPS binding protein; *LPS*, lipopolysaccharide; *LTA*, lipoteichoic acid; *TLR*, toll-like receptor.

Enflamatuvar yolların etkinleşmesi ile proenflamatuvar ve antienflamatuvar mediyatörler arasındaki kompleks etkileşim sepsis ve septik şok patojenezinde majör rol oynamaktadır (Şekil 2.3) (11).



Şekil 2.3. Proenflamatuvar ve antienflamatuvar mediyatörler arasındaki denge. *TNF*, tumor necrosis factor; *IL*, interleukin.

Septik şok patofizyolojisi Şekil 2.4'te şematize edilmiştir. Septik şok patojenezinde yer alan özgül sitokinler ve sitokin olmayan mediyatörlerin kaynakları ve septik şoktaki rolleri Çizelge 2.2'de açıklanmıştır (47).



Şekil 2.4. Şiddetli sepsis ve septik şok patofizyolojisi. *LRR*, leucin-repeated receptor; *LTA*, lipoteichoic acide; *PAMPs*, pathogen associated molecular patterns; *PGN*, peptidoglican; *TLR*, toll-like receptor.

Çizelge 2.3. Septik şok patojenezinde rol alan mediyatörler, kaynakları ve septik şoktaki rolleri.

Septik Şokta Rol Alan Mediyatörler			
Grup	Mediyatör	Kaynak	Septik şoktaki rolü
Proenflamatuvar sitokinler	IL-1 β	Monositler Makrofajlar Lenfositler Endotel hücreler	Ateş, hipotansiyon, T hücre ve makrofaj etkinleşmesi, miyokardiyal supresyon
	TNF- α	Etkinleşen makrofajlar	Ateş, hipotansiyon, miyokardiyal depresyon, nötrofil ve endotel hücrelerin etkinleşmesi
	IL-6	T hücreleri B hücreleri Endotel hücreler	B ve T lenfositlerinin proliferasyonunun uyarılması
	IL-8	Etkin makrofajlar Monositler Kuppfer hücreleri	T hücreleri ve nötrofiller için kemotaktik etki
	IL-17	Etkin T hücreleri	IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1b, TGF-b, TNF- α ve kemokinlerin sentezinin uyarılması
	IL-18	Etkin makrofajlar	IL-12 ile birlikte hücrel immün yanıtları başlatır. IFN- γ salgılanmasını artırır.
	IFN- γ MIF	Doğal katil hücreler Etkin makrofajlar	Viral ve hücre içi bakteriyel patojenlere karşı savunma TNF ekspresyonunda artma TLR4 ekspresyonunda artma
Antienflamatuvar sitokinler	IL-10	Epitel hücreler Lenfositler Monositler	Makrofajların işlevlerini baskılar ve TNF- α salıverilmesini azaltır.
	IL-4	?	
	IL-1RA	Monositler	IL-1'in etkisini inhibe eder.
	TGF- β	Çeşitli hücreler	Fagositik etkinliğe müdahale etmektedir.
Endotelial faktörler	NO		Mikrovasküler permeabilitede artma Vazomotor tonüs kaybı Miyokardiyal depresyon Periferel venöz göllenme
Hormonlar	Vazopressin	Arka hipofiz bezi	
	Glukokortikoit	Hipotalamus-hipofiz ekseni	
Araşidonik asit metabolitleri	Prostaglandin Lökotrienler Tromboksanlar	İmmün hücreler Pankreas	Havayolu etkinliğinde artma Vazokonstriksiyon Trombositlerin agregasyonu Vaskuler permeabilite de artma

Çizelge 2.3. (devam). Septik şok patojenezinde rol alan mediyatörler, kaynakları ve septik şoktaki rolleri.

Septik Şokta Rol Alan Mediyatörler			
Grup	Mediyatör	Kaynak	Septik şoktaki rolü
Diğerleri	TEF	Endotel hücreler Makrofajlar Nötrofiller	Trombositlerden histamin salıverilmesi Endotel hücrelerin etkinleşmesi
	Komplemen proteinleri C3a-C5a		Histamin salıverilmesi Kapiller permeabitede artma, vazodilatasyon
	Miyokardiyal baskılayıcı faktör	Pankreas	Negatif inotropi Fagositoz etkinliğinin azalması

G-CSF, granülosit koloni uyarıcı faktör (*granulocyte colony stimulating factor*); GM-CSF, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*); IFN, interferon (*interferon*); IL, interlökin (*interleukin*); MIF; Makrofaj inhibe edici faktör (*Macrophage inhibitory factor/macrophage migration inhibitory factor*); NO, nitrik oksit (*nitric oxide*); TGF, doku büyüme faktörü (*tissue growth factor*); TEF, trombosit etkinleştirici faktör; TLR, *Toll-like receptor*; TNF, tümör nekrozlaştırıcı faktör (*tumor necrosis factor*).

İnsanda sepsis ve septik şokta ortaya çıkan sistemik enflamatuvar yanıtlar insan dokusunda bulunmayan, mikrobiyal türevli makromoleküller tarafından başlatılmaktadır. Bu moleküller patojen ile ilişkili moleküler kalıp (*pathogen-associated molecular pattern*; PAMP)'lar olarak tanımlanmaktadır ve bu kalıplar içerisinde en potenti bakteriyel lipopolisakkarit (*lipopolysaccharide*; LPS)'dir (29).

Gram-negatif sepsis patofizyolojisi bakteri hücre duvarı bileşeni olan LPS üzerine yoğunlaşmıştır (11). LPS, Gram-negatif bakterileri immün sistem tarafından tanınmaları için birincil hedef haline getirmektedir. Bununla birlikte LPS, septik şokta meydana gelen tehlikeli kan basıncı düşüşünden sorumludur (12).

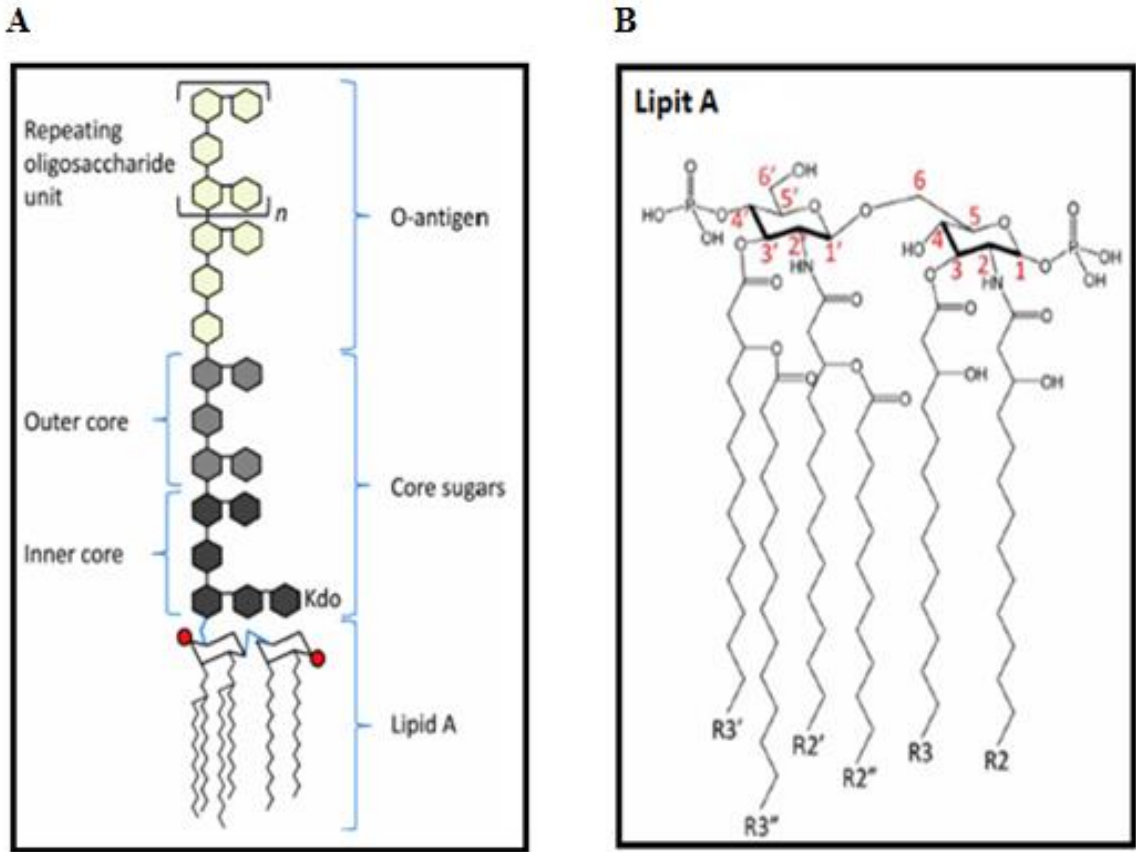
Doğal immün sistem, konak hücrelerde eksprese edilen kalıp tanıma reseptör (*pattern recognition receptor*; PRR)'leri ile PAMP'ları tanımakta ve patojen mikroorganizmalara karşı savunma sisteminin birincil hattını oluşturmaktadır. LPS, iyi karakterize edilmiş PAMP'lardan birisidir (51).

2.1.3.1. LPS'nin Yapısı

LPS, birbirlerine kovalent olarak bağlanmış, moleküle polar ve amfipatik özelliklerini kazandıran üç değişik bölgeden oluşmaktadır (52):

- (1) Endotoksin olarak da bilinen lipit A
- (2) Çekirdek oligosakkarit
- (3) Tekrarlayan oligosakkarit zincirlerinden oluşan O antijeni.

LPS'nin toksisitesi ile immünolojik etkisinden sorumlu olan ve yapının en iç tabakasını oluşturan immünoaktif, biyoaktif lipit A bileşeni Şekil 2.5'te görüldüğü üzere 6 adet açıl grubu ile 2 adet glukozamin molekülüne bağlı (13) ve konak hücredeki *toll-like receptor* (TLR) 4 ve *myeloid differentiation* (MD) 2 reseptörleri tarafından tanınarak güçlü bir immün yanıt oluşturmaktadır (14) LPS dışında lipoteikoik asit (LTA), peptidoglikan ve mannan gibi Gram-pozitif bakterilerin ve fungusların hücre duvarı bileşenleri de immün yanıtı güçlü bir şekilde uyarmakta ve enfeksiyona yanıt olarak proenflamatuvar sitokinlerin oluşumunu tetiklenmektedir (53).

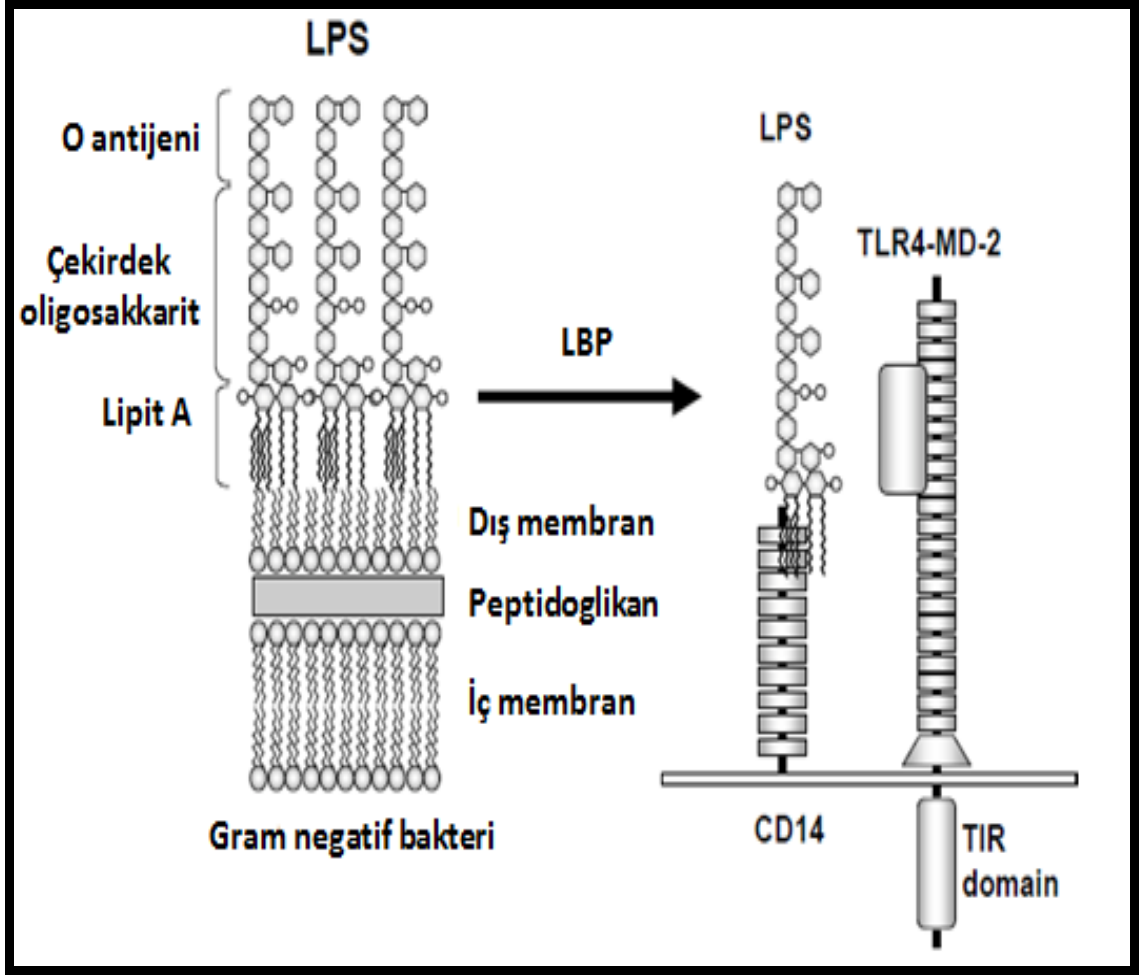


Şekil 2.5. Lipopolisakkarit ve lipit A'nın yapısının şematik gösterimi. (A) LPS ve (B) lipit A.

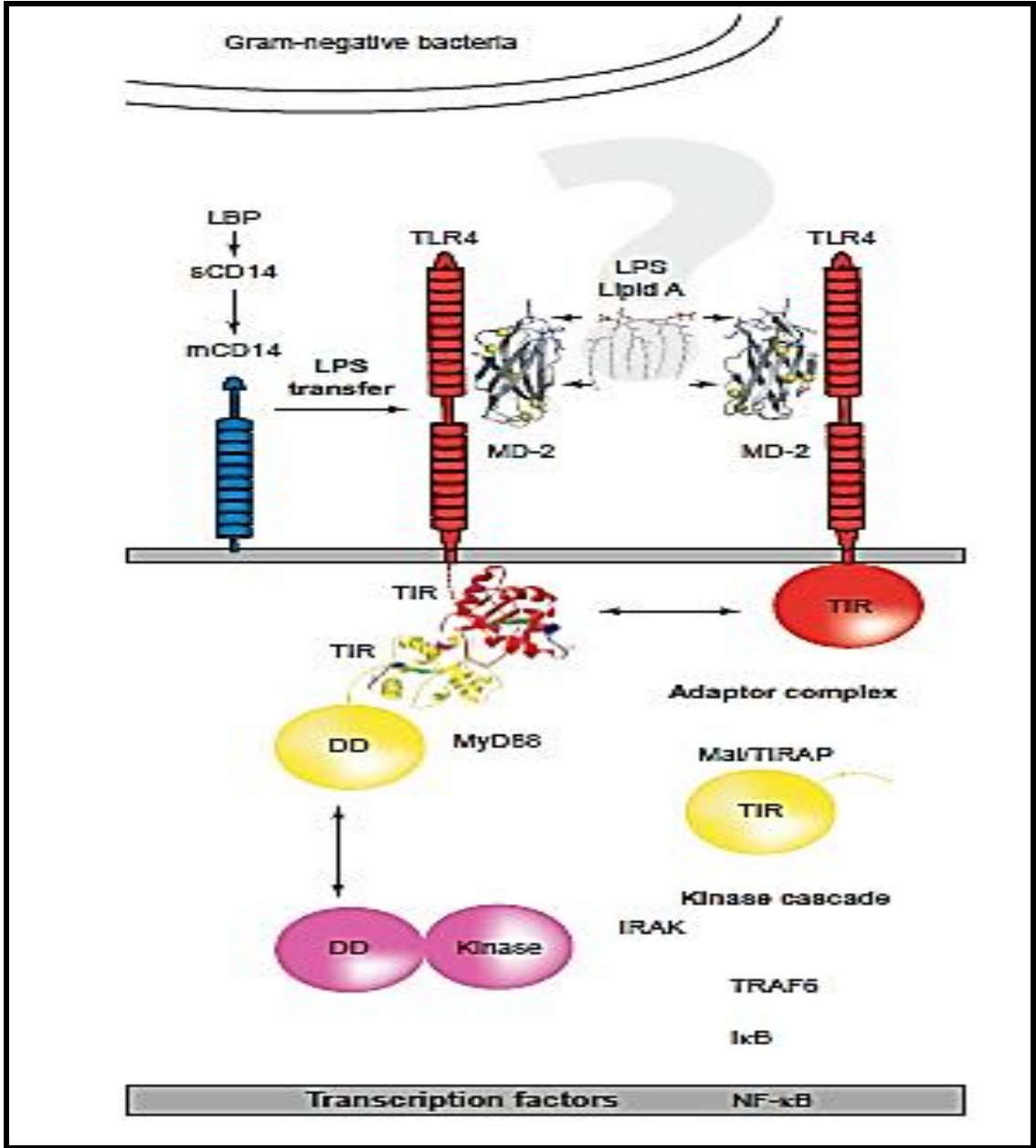
Lipit A, yüksek derecede immünoreaktiftir ve gram-negatif sepsiste gözlenen toksik etkilerin bir çoğundan sorumlu olan ve "endotoksin" olarak da bilinen yapıdır. Lipit A'nın başlıca etkisi, makrofajları etkinleştirmesi ve enflamasyona neden olan olayları tetiklemesidir (54).

Gram-negatif bakterilere veya LPS gibi bakteriyel ürünlere yanıt olarak başlayan enflamatuvar süreçlerde rol alan başlıca reseptör TLR4 olmasına karşın, 3 farklı ekstrasellüler aksesuar protein (Şekil 2.6) de görev almaktadır (55). LPS ve Gram-negatif bakterilere verilen hızlı enflamatuvar yanıtın indüksiyonunda (56) rol alan aksesuar proteinlerden biri olan lipopolisakkarit bağlayıcı protein (*LPS binding protein*; LBP), hepatositler tarafından sentezlenip dolaşıma verilen, 60 kDa ağırlığında olup LPS'nin lipit A kısmına bağlanan (57) ve lipit transferaz etkinliğine sahip bir serum glikoproteinidir. Lipit transferaz etkinliği ile bakteri hücre duvarında bulunan

LPS'nin *cluster of differentiation* (CD) 14 reseptörlerine transferine aracılık etmektedir (58). CD14 reseptörü miyelomonosit, makrofaj ve polimorfonükleer lökositlerde eksprese edilen ve glikozil-fosfotidilinozitol ile bağlı olarak bulunan (*membran* CD14; mCD14) veya dolaşımda çözünebilir protein formunda (*soluble* CD14; sCD14) bulunan, LPS sinyal iletiminde rol alan aksesuar proteinlerden bir diğeri olup, yaklaşık olarak 50 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. CD14, TLR4 reseptörleri keşfedilmeden önce LPS'nin reseptörü olarak biliniyordu (59). TLR4, LPS ile başlayan sinyal ileti olaylarında yer alan, TLR ailesinin bir üyesi olup, a) lösinden zengin tekrarlayan üniteleri olan ve PAMP'ları tanıyan ekstrasellüler bölge, b) transmembranal bölge ve c) IL-1 reseptörleri ile yüksek oranda homoloji gösteren intrasellüler *Toll/IL-1 receptor* (TIR) bölgelerinden oluşan (60) tip 1 transmembran proteindir. TLR4'ten farklı olarak CD14'ün hücre içi olayları başlatabilen sitoplazmik bileşeni yoktur ve bu nedenle sinyal iletimini başlatamamaktadır. CD14, TLR4/MD-2 reseptör kompleksine LPS sunmaktadır (51). CD14 geni silinmiş farelerde LPS'ye karşı düşük yanıtverilebilirlik ve LPS'nin öldürücü etkisine karşı direnç gelişiminin ortaya çıktığı gösterilmiştir (61). *Myeloid differentiation* (MD)-2, TLR4'ün LPS ile işlevsel olarak etkileşmesinde rol alan ve ekstrasellüler lipit bağlayıcı protein ailesine ait olan, 160 aminoasitten oluşan bir reseptör proteindir. TLR4 reseptörlerinin ko-reseptörü olarak da adlandırılan ve yapısal olarak TLR4 reseptörlerinin en dış bölgesiyle etkileşen aksesuar proteinlerin üçüncüsüdür. TLR4 aracılıklı LPS sinyal iletiminde MD-2'nin rolü MD-2 geni olmayan farelerde yapılan araştırmada LPS'ye karşı oluşan duyarsızlık ile gösterilmiştir. TLR4-MD-2 heterodimerinin LPS için tam bir tanıma bölgesi oluşturduğu düşünülmektedir. TLR dimerizasyonu, NF-κB'nin etkinleşmesine ve buna bağlı olarak proenflamatuvar sitokin oluşumuna yol açan intrasellüler olayların etkinleşmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (62-69). LPS'nin aksesuar proteinler ve TLR ile etkileşimi Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



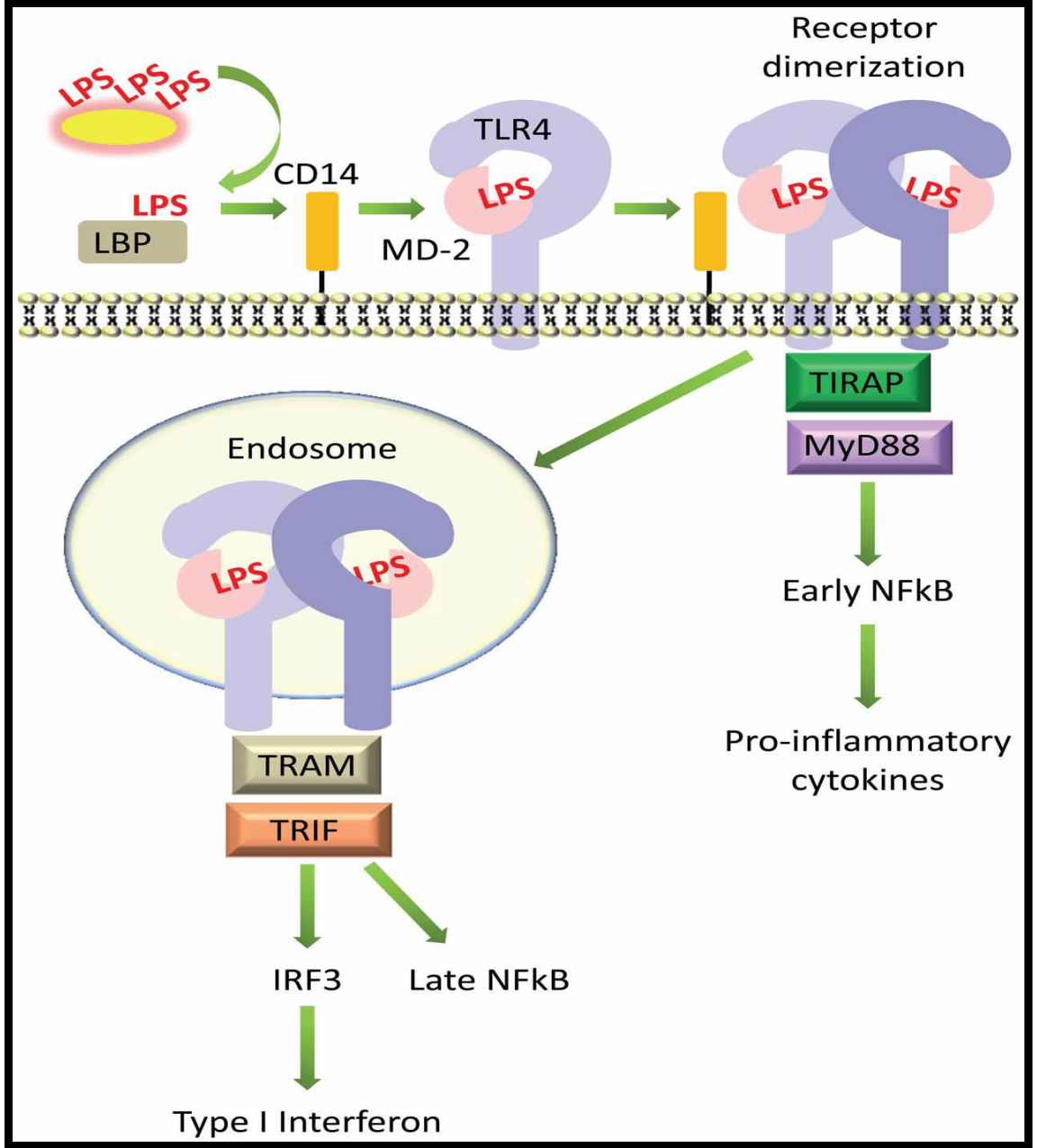
Şekil 2.6. LPS sinyal iletilisinde görev alan aksesuar proteinler. *CD*, cluster of differentiation; *LPS*, lipopolysaccharide; *LBP*, LPS-binding protein; *MD*, myeloid differentiation; *TIR*, toll/IL-1-receptor homologous region; *TLR*, toll-like receptor.



Şekil 2.7. LPS reseptör etkileşimi. *sCD*, soluble cluster of differentiation; *DD*, death domain; *IκB*, inhibitory κB ; *IRAK*, *IL-1* receptor associated kinase; *LPS*, lipopolysaccharide; *LBP*, lipopolysaccharide binding protein; *mCD*, membran cluster of differentiation; *MD*, myeloid differentiation; *Mal*, MyD88 adaptor-like; *MyD*, myeloid differentiation factor; *NF-κB*, nuclear factor κB ; *TLR*, toll-like receptor; *TIR*, toll/IL-1 receptor; *TIRAP*, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein; *TRAF*, tumour necrosis factor-associated factor; *TRIF*, toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β ; *TRAM*, TRIF-related adapter molecule.

2.1.3.2. LPS'nin Sinyal İletisi

LPS, bakteri hücre duvarlarından LBP tarafından ekstrakte edilip serumda LBP tarafından taşınmaktadır. LBP, LPS'yi dolaşımında çözülmüş bir protein halinde bulunan veya makrofaj hücreleri gibi immün sistem hücrelerinin membranlarında glikozil-fosfotidilinozitol ile bağlı halde bulunan CD14 reseptörlerine transfer etmektedir. CD14 reseptörleri hücre içi sitoplazmik bölgesinin olmaması nedeniyle sinyal iletimini başlatamamaktadır. CD14, TLR4-MD-2 reseptör kompleksine LPS sunmakta ve bu reseptör kompleksinin dimerize forma dönüşerek etkinleşmesine aracılık etmektedir. LPS'nin bağlanması ardından TLR4-MD-2 kompleksi ikinci bir TLR4-MD-2 reseptör kompleksi ile dimerize olarak hücre içi TIR bölgesi aracılığıyla adaptör proteinlerini etkinleştirmektedirler (70). TLR4 reseptörleri *myeloid differentiation factor 88* (MyD88)'e bağımlı ve *toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF)-bağımlı olmak üzere 2 farklı yol ile sinyal iletimini başlatmaktadır. MyD88'e bağımlı yolda TLR4-MD-2 reseptör kompleksinin dimerizasyonu ile etkinleşen *toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein* (TIRAP) ve MyD88 gibi adaptör proteinler (71), özgül tirozin kinazlar ile serin/treonin kinazların etkinleşmesine aracılık ederek birbirlerini izleyen bir dizi olayları tetiklemektedir. Bu sinyal ileti yolu, diğer transkripsiyonel etkinleştiriciler ile birlikte inhibitör κ B (*inhibitory κ B*; I κ B)'nin fosforilasyonu, ubiquitasyonu ve degradasyonuna yol açarak NF- κ B'nin serbest hale gelmesine, nükleer membran bağlayıcı bölgeleri ile nükleer membrana bağlanarak nükleusa translokasyonuna aracılık etmektedir. Enflamasyona aracılık eden pıhtılaşma faktörleri, sitokinler, kemokinler, nitrik oksit sentaz (NOS), kompleman sistemi ve diğer akut faz proteinlerinin genleri, promotör bölgelerinde NF- κ B bağlayan alanlara sahiptir (72, 73). TLR4 reseptörlerinin etkinleşmesi ile başlayan bu sinyal ileti yolu, bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'in etkinliğinin artması, TNF- α ile IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinlerin ve enflamasyonda rol oynayan enzimlerin oluşumunda ve/veya etkinliğinde artma ile sonuçlanmaktadır (74). TLR4'ün endozomal internalizasyonu bir diğer transkripsiyon faktörü olan IRF3'ün etkinliğini artıran TRAM ve TRIF gibi farklı adaptör proteinlerin etkinleşmesine aracılık etmektedir. Bu yol ile tip 1 interferon üretimini artırarak da NF- κ B'in geç dönem etkinleşmesine yol açmaktadır (Şekil 2.8) (75).



Şekil 2.8. LPS sinyal iletisi. CD, cluster of differentiation; LPS, lipopolysaccharide; LBP, lipopolysaccharide binding protein; MD, myeloid differentiation; MyD, myeloid differentiation factor; TLR, toll-like receptor; TIRAP, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein; TRIF, toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β ; TRAM, TRIF-related adapter molecule.

LPS maruziyetinden sonra proenflamatuvar sitokinler ve diğer enflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonundaki artma ile sistemik enflamasyona, prokoagulan etkinlikte artmaya, organ zedelenmesine ve septik şoka katkısının olduğu gösterilmiştir (72, 73).

Çizelge 2.4. Sepsis ve septik şokta NF-κB ile ilişkili genler.

Sepsis ve Septik Şokta NF-κB ile İndüklenebilen Genler	
Grup	NF-κB'ye Bağımlı Genler
Akut faz proteinleri	C-reaktif proteinleri LPS bağlayıcı proteinler
Sitokinler	TNF-α G-CSF, GM-CSF IL-1a, IL-1B, IL-2, IL-6, IL-12 IFN-β
Kemokinler	MIP-1α MIP-2
Pıhtılaşma (koagülasyon) faktörleri	Doku faktörü Doku faktörü yolu inhibitörü
Adezyon molekülleri	ICAM-1 VCAM-1 E-selectin ELAM-1
Enzimler	iNOS COX-2 C3 komplemen FLA ₂ Metalloproteinaz (matriks)
İmmünoresseptörler	IL-2 reseptör-a <i>Major histocompatibility complex class 1</i>

COX, siklooksijenaz (*cyclooxygenase*); FLA, fosfolipaz (*phospholipase*) A; G-CSF, granüosit koloni uyarıcı faktör (*granulocyte colony stimulating factor*); GM-CSF, granüosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*); ICAM, hücre içi adezyon molekülü (*intercellular cell adhesion molecule*); IFN, interferon (*interferon*); IL, interlökin (*interleukin*); iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (*inducible nitric oxide synthase*); MIP, makrofaj enflamatuvar protein (*macrophage inflammatory protein*); TNF, tümör nekrozaştırıcı faktör (*tumor necrosis factor*); VCAM, vasküler hücre adezyon molekülü (*vascular cell adhesion molecule*).

2.1.3.3. Septik Şokta Kardiyovasküler İşlev Bozukluğu

▪ Miyokardiyal Depresyon

Şiddetli sepsis ve septik şok iNOS ekspresyonunda artma ve NO oluşumundaki artma ile ilişkilidir. NO, miyositlerde kalsiyum metabolizmasını etkilemekte ve kontraktıl işlevine zarar vermektedir. NO ve süperoksit iyonun tepkimeye girmesi sonucu oluşan peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türleri miyositler üzerine doğrudan toksik etki göstermektedir. Deneysel bulgular da sepsiste NO ile ilişkili miyokardiyal depresyonu desteklemektedir (76).

Miyokardiyal depresyon dolaşımdaki bir veya daha fazla miyokardiyal depresan maddelerin doğrudan veya dolaylı etkileri sonucunda meydana gelmektedir. Şiddetli sepsiste salıverilen bazı sitokinler muhtemelen miyokardiyal işlev bozukluğuna katkıda bulunmaktadır. TNF- α ve IL-1 miyosit işlev bozukluğu ile ilişkilidir ve sepsiste ortaya çıkan erken dönem miyokardiyal depresyonu açıklamaktadır. *In vitro* miyokart hücrelerinde ve septik şoklu hastaların serumlarında yapılan çalışmalarda TNF- α ve IL-1'in miyokardiyal depresan etkinlikten sorumlu olduğu gösterilmiştir (77). Bu sitokinler iNOS'un etkin indükleyicileri olarak kabul edilmektedir ve muhtemelen miyokardiyal işlev bozukluğuna neden olan mekanizmalardan birini temsil etmektedir.

▪ Vasküler İşlev Bozukluğu

Septik şokta vasküler değişimler esas olarak mediyatörlerin vasküler düz kas hücreleri üzerine olan etkileri ve endotelial işlev bozukluğundan ileri gelmektedir. NO salıverilmesi, sepsis ve septik şokta vasküler düz kas hücrelerinde meydana gelen işlev bozukluğunun birincil nedeni olarak kabul edilmektedir. NO düz kas hücrelerinin plazma membranlarının hiperpolarizasyonuna neden olmakta ve düz kas hücrelerinin katekolaminlere karşı duyarlılığını azaltarak vazodilatasyona yol açmaktadır.

Endotelial işlev bozukluğu, kan basıncında azalma ile endotel hücrelerin vasküler tonüsün sürdürülmesinde yetersizliği yol açmaktadır. Bununla birlikte endotel hücrelerin zedelenmesi kapiler sızıntıya yol açarak damar içi hacmin azalmasıyla

birlikte ilişkili organlarda ödem oluşumuna neden olmaktadır (47).

2.1.4. Tedavisi

Sepsis ve septik şok enfekte edici mikroorganizma ile konağın immün, enflamatuvar ve koagülasyon yanıtları arasındaki kompleks etkileşim sonucunda ortaya çıkan yaşamı tehdit edici bu durumun kontrol altına alınıp tedavi edilmesi kompleks ve dinamik bir süreç olarak kabul edilmektedir. Sepsis ve septik şok tedavisi yetmezlik gelişen organ sistemlerinin desteklenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu kapsamda (1) destekleyici bakımının (oksijenasyon/ventilasyon stratejisi, uygun sıvı/vazopresör ilaç kullanımı) geliştirilmesi, (2) antimikrobiyal tedavi, (3) bakteriyel virülans etkenlerin hedeflenmesi (antiendotoksin antikorları) ve (4) konak yanıtının hedeflenmesi (kortikosteroidler, antisitokin ilaçlar, antikoagülanlar) gibi tedavi stratejileri bulunmaktadır (29).

Çizelge 2.5'te sepsis ve septik şokta *The Surviving Sepsis Campaign*'in önerdiği tedavi yaklaşımları özetlenmiştir. Bu tedavi yaklaşımları son olarak 2012 yılında güncellenmiş ve yayınlanmıştır (78, 79).

Çizelge 2.5. Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *The Surviving Sepsis Campaign*'in önerileri.

Tedavi Önerileri

Resüsitasyon

- Tanıdan sonraki ilk 6 saatte hedefe yönelik resüsitasyona başlanmalıdır.
- Hemodinamik iyileşme görülene kadar sıvı tedavisine devam edilmelidir. Hedefler
 - ✓ Santral venöz basınç 80-120 mmHg
 - ✓ OAB \geq 65 mmHg
 - ✓ İdrar çıkışı \geq 0.5 ml/kg/sa.
 - ✓ Santral venöz (süperiyör vena kava) veya karışık venöz oksijen doygunluğu sırasıyla %70 veya %65 (derece 1C)

Enfeksiyon Tanısı, Antimikrobiyal Tedavi, Kaynak Kontrolü ve Enfeksiyonun Önlenmesi

Tanı

- Antimikrobiyal ilaç tedavisine başlanmadan önce veya tedaviye başlanmışsa 45 dakika içerisinde kan kültürü alınmalıdır (derece 1C).
- Enfeksiyon kaynağını doğrulamak için zamanında görüntüleme çalışmaları yapılmalıdır.
- Teşhisten sonraki 12 saat içerisinde enfeksiyon kaynağının kontrolü için seçilen yöntemin faydaları ve riskleri değerlendirilmelidir (derece 1C).
- Enfeksiyon etkeni olarak yaygın kandidiyaz olması durumunda 1,3-beta-D-glukan testi (derece 2B), manan ve antimannan antikor testleri yapılmalıdır (derece 2C).

Antimikrobiyal tedavi

- Septik şok veya septik şok gelişmemiş şiddetli sepsis durumlarında 1 saat içerisinde tüm patojen mikroorganizmaları hedef alan geniş spektrumlu etkili intravenöz antimikrobiyal ilaç uygulanmalıdır (derece 1B/1C).
 - Enfeksiyonun yeniden alevlenmemesi uygulanan antimikrobiyal tedavi rejimi günlük olarak değerlendirilmelidir (derece 1B).
 - Ampirik antimikrobiyal tedavi 3-5 günden daha uzun uygulanmamalıdır. Etken belirlendiğinde tek ilaçla tedaviye devam edilmelidir (derece 2B).
 - Şiddetli sepsisi olan nötropenik hastalarda ve *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* gibi çoklu ilaca direçli olan bakterilerin varlığı saptanan hastalarda kombine ampirik tedavi uygulanmalıdır (derece 2B). Şiddetli enfeksiyon nedeniyle solunum yetmezliği olan hastalarda ve septik şoklu hastalarda *P. aeruginosa* bakteriyemisi için geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleri aminoglikozitler veya florokinolonlar ile kombinasyonu kullanılmalıdır (derece 2B). *Streptococcus pneumoniae* enfeksiyonundan septik şok gelişen hastalarında beta-laktam ve makrolit grubu antibiyotiklerin kombinasyonları kullanılmalıdır (derece 2B).
-

Çizelge 2.5 (devam). Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *The Surviving Sepsis Campaign*'in önerileri.

Tedavi Önerileri

Enfeksiyon Tanısı, Antimikrobiyal Tedavi, Kaynak Kontrolü ve Enfeksiyonun Önlenmesi

- Tedavi süresi normal koşullarda 7-10 gündür. *S aureus* kaynaklı bakteriyemisi olan; fungal ve viral enfeksiyonlarda veya nötropeni gibi immün sistem hastalığı olan hastalarda bu süre daha uzun olabilir (derece 2C).
- Viral kaynaklı şiddetli sepsis ve septik şoklu hastalarda olabildiğince antiviral tedaviye başlanmalıdır (derece 2C).
- Enfeksiyon kaynağının söz konusu olmadığı şiddetli enflamasyon ile belirgin hastalarda antimikrobiyal tedavi uygulanmamalıdır (derecelendirilmemiş).

Kaynak Kontrolü

- Eğer yapılabiliriyorsa tanı konulduktan sonra ilk 12 saat içerisinde kaynak kontrolü için girişim yapılabilir (derece 1C).
- Olası enfeksiyon kaynağı olarak peripankreatik nekroz tanımlanmışsa, canlı ve cansız dokuların sınırları belirleninceye kadar kesin girişim geciktirilebilir (derece 2B).
- Şiddetli sepsisli hastada kaynak kontrolü gerektiğinde, apsenin cerrahiden çok perkütanöz olarak boşaltılması gibi en az fizyolojik zarar oluşturabilecek biçimde etkili bir girişim yapılmalıdır (derecelendirilmemiş).
- Damar içi aygıtları, şiddetli sepsis ve septik şokun kaynağı ise, öteki damar girişleri yerleştirildikten sonra hızla çıkarılmalıdır (derecelendirilmemiş).

Enfeksiyonun Önlenmesi

- Ventilasyon ile ilişkili pnömoni insidensini azaltmak için seçici oral ve dekontaminasyon ve seçici dijestif dekontaminasyon uygulanmalıdır (derece 2B).
 - Yoğun bakım ünitelerinde şiddetli sepsis olan hastalarda ventilasyon ile ilişkili pnömoni riskini azaltmak için orafaringeal dekontaminasyon için oral klorheksidin glukonat kullanılabilir.
-
-

Çizelge 2.5 (devam). Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *The Surviving Sepsis Campaign*'in önerileri.

Tedavi Önerileri

Hemodinamik Destek ve Adjuvan Tedavi

Sıvı Tedavisi

- Şiddetli sepsis ve septik şokta resüsitasyon amacıyla ilk tercih edilecek sıvı kristaloitlerdir (derece 1B).
- Şiddetli sepsis ve septik şokta sıvı resüsitasyonu amacıyla hidroksietil nişastaları kullanılmamalıdır (derece 1B).
- Şiddetli sepsis ve septik şokta hastalar fazla miktarda kristaloite gereksinim duyduklarında sıvı resüsitasyonunda albümin kullanılabilir (derece 2C).
- Vurum hacmi değişikliği gibi dinamik veya arteriyel basınç ve kalp hızı gibi statik değişimlerde hemodinamik iyileşme ortaya çıkana kadar sıvı uygulamasına devam edilmelidir (derecelendirilmemiş).

Vazopresörler

- Vazopresör ilaçlar OAB'nin 65 mmHg olmasının istendiği durumlarda başlanmaktadır (derece 1C).
 - Noradrenalin ilk tercih vazopresör ilaç olarak kullanılmalıdır (derece 1B).
 - Kan basıncının sürdürülmesinde ek ilaca gereksinim duyulduğu zaman adrenelin kullanılmalıdır (derece 2B).
 - Noradrenaline karşı tolerans geliştiği durumlarda, OAB'yi yükseltmek için veya kullanılan noradrenalin dozunu azaltmak için 0,03 U/dk dozunda vazopresin noradrenaline eklenebilir (derecelendirilmemiş).
 - Dopamin noradrenaline alternatif vazopresör ilaç olarak sadece taşiaritmi veya bradikardi gelişme riski düşük olan ve sol ventrikül sistolik işlev bozukluğu olan hastalarda kullanılabilir (derece 2C).
 - Fenilefrin, bazı durumlar dışında septik şok tedavisinde önerilmemektedir. Bu durumlar; (a) noradrenalin ile ilişkili ciddi aritmilerde, (b) kalp debisinin yüksek, kan basıncının ise devamlı düşük olduğu durumlarda (c) inotropik/vazopresör ilaçlarla vazopresin kombinasyonu ile OAB'nin hedeflenen düzeye getirilemediği durumlarda uygulanan kurtarma tedavisinde (derece 1C).
 - Düşük doz dopamin böbrekleri korumak amacıyla kullanılmamalıdır (derece 1A).
 - Miyokart işlev bozukluğu durumlarında veya uygun intravasküler hacim ve OAB'ye karşın hipoperfüzyonun geliştiği durumlarda dobutamin, intravenöz 20 µg/kg/dk infüzyon şeklinde veya vazopresör tedaviye eklenerek kullanılmalıdır (derece 1C).
-
-

Çizelge 2.5 (devam). Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *The Surviving Sepsis Campaign*'in önerileri.

Tedavi Önerileri

Hemodinamik Destek ve Adjuvan Tedavi

Kortikosteroitler

- Uygun sıvı resüsitasyonu ve vazopresör tedavi bozulan hemodinamik işlevleri düzeltebiliyorsa i.v. hidrokortizon kullanımından kaçınılmalıdır. Hidrokortizon kullanılacaksa 200 mg/gün doz 7 gün boyunca 3 veya 4 bölünmüş doz şeklinde uygulanmalıdır (derece 2C).
 - Hidrokortizon kullanması gerekli olan septik şoklu hastalarda ACTH uyarı testi yapılmamalıdır (derece 2B).
 - Vazopresör kullanımına gerek duyulmayan hastalarda hidrokortizon dozu giderek azaltılmalıdır (derece 2D).
 - Şok gelişmemiş sepsis hastalarının tedavisinde kortikosteroitler kullanılmamalıdır (derece 1D).
-

Diğer Destekleyici Tedaviler

Kan Ürünü Uygulaması

- Hipoperfüzyon, koroner arter hastalığı, miyokart iskemisi, hipoksemi veya ivergen hemoroji bulunmayan hastalarda hemoglobin düzeyleri 7-9 g/dl olarak hedeflenmelidir. Hemoglobin düzeyleri <7 g/dl olduğu durumlarda kırmızı kan hücresi transfüzyonu yapılmamalıdır (derece 1B).
- Şiddetli sepsis ile ilişkili anemi tedavisinde eritropoietin kullanılmamalıdır (derece 1B).
- Şiddetli sepsis ve septik şokun tedavisinde antitrombin kullanılmamalıdır (derece 1B).

İmmunoglobulinler

- Erişkin şiddetli sepsis ve septik şok hastalarında i.v. immünoglobulinler kullanılmamalıdır (derece 2B).

Selenyum

- Şiddetli sepsis tedavisinde i.v. selenyum kullanılmamalıdır (derece 2C).
-
-

Çizelge 2.5 (devam). Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *The Surviving Sepsis Campaign*'in önerileri.

Tedavi Önerileri

Diğer Destekleyici Tedaviler

Sepsisin Neden Olduğu ARDS için Mekanik Ventilasyon

- Sepsisin neden olduğu ARDS'li hastalarda tidal hacim 6 ml/kg olarak hedeflenmelidir (derece 1A).
- ARDS için düşük tidal hacim ve inspiratuvar plato basıncının sınırlandırılması stratejisi uygulanabilir (derece 1A/1B).
- ARDS'li hastalarda minimum pozitif son ekspiratuvar basınç uygulanmalıdır (derece 1B).
- Son ekspirasyon sonunda alveolar kolapstan kaçınmak için pozitif son ekspiratuvar basınç uygulanmalıdır (derece 1B).
- Sepsisin neden olduğu ARDS'li hastalar için düşük pozitif son ekspiratuvar basınç değerlerinden daha yükseğini hedef alan girişimlerde bulunulmalıdır (derece 2C).
- Mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda, kontrendike bir durum olmadığı sürece aspirasyon riskini azaltmak amacıyla yatak başları yükseltilmelidir (derece 1B).
- ARDS nedeniyle şiddetli refrakter hipoksemisi olan hastalar için iyileştirme girişimleri uygulanmalıdır (derece 2C).
- Uygun koşulların sağlanmasında yeterli deneyimin olması durumunda, P_{aO_2}/F_{iO_2} değeri ≤ 100 mmHg olan sepsisin neden olduğu ARDS'li hastalar yüzüstü yatırılmalıdır (derece 2C).
- Sepsisin neden olduğu ARDS'li hastalarda rutin pulmoner arter kateteri kullanımından kaçınılmalıdır (derece 1A).
- İvegen akciğer zedelenmesi veya ARDS gelişme ihtimali olan ve doku hipoperfüzyonu için herhangi bir kanıt olmayan hastalarda konservatif sıvı tedavi stratejisi uygulanmalıdır (derece 1C).
- Bronkospazm gibi özgül bir endikasyon olmadığında beta-2 adrenerjik reseptör agonistleri sepsisin neden olduğu ARDS'nin tedavisinde kullanılmamalıdır (derece 1B).

Sedasyon, Analjezi, Nöromusküler Blokaj

- Mekanik ventilasyon uygulanan septik şoklu hastalarda en az düzeyde devamlı veya aralıklı sedasyon uygulanmalıdır (derece 1B).
 - ARDS olmayan septik şoklu hastalarda nöromusküler bloke edici ilaçlar, bırakılması halinde uzun süre nöromusküler blokaj riskinden dolayı kullanılmamalıdır. Bu ilaçların kullanılması gerekiyor ise aralıklı olarak bolus şeklinde veya blokaj derinliği izlenerek sürekli infüzyonla verilmelidir (derece 1C).
-
-

Çizelge 2.5 (devam). Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *The Surviving Sepsis Campaign*'in önerileri.

Tedavi Önerileri

Diğer Destekleyici Tedaviler

- Sepsisin neden olduğu ARDS'nin erken dönemlerinde olan ve Pao_2/FiO_2 değeri < 150 mmHg olan hastalarda 48 saatten uzun olmamak şartıyla nöromusküler blokaj yapan ilaçlar kullanılabilir (derece 2C).

Glukoz Kontrolü

- Kan glukozunun kontrolü için özgül tedavi yaklaşımları kullanılmalıdır (derece 1A).
- Yoğun bakım birimlerindeki şiddetli sepsis hastalarında birbirini izleyen iki ölçümde kan glukoz düzeyleri >180 mg/dl (10 mmol/l) ise insülin kullanımına başlanmalıdır (derece 1A).
- Kan glukoz düzeylerinin < 180 mg/dl olması hedeflenmelidir (derece 1A).
- Glukoz düzeyleri ve insülin infüzyon hızı stabil duruma gelene kadar her 1-2 saatte kan glukoz düzeyleri ölçülmelidir, hasta stabilize olduktan sonra her 4 saatte bir kan glukoz düzeyleri ölçülmelidir (derece 1C).

Renal Replasman Tedavisi

- Renal yetmezlik veya aşırı sıvı birikimi mevcut ise sürekli venövenöz hemofiltrasyon veya kesintili hemodiyaliz yöntemleri uygulanmalıdır (derece 2B). Şiddetli sepsis ve akut böbrek yetmezliği olan hastalarda aralıklı olarak yapılan hemodiyaliz ve devamlı renal replasman tedavisi eşdeğer kabul edilmektedir (derece 2B).
- Hemodinamik yönden stabil olmayan septik hastalarda sıvı dengesini sürdürmek amacıyla devamlı tedavi uygulanmalıdır (derece 2D).

Bikarbonat Tedavisi

- Hemodinamik iyileşmeyi sağlamak veya vazopresör gereksinimini azaltmak için hipoperfüzyonun neden olduğu laktik asidemili hastalarda sodyum bikarbonat tedavisi uygulanmamalıdır (derece 2B).

Derin Ven Tromboz Profilaksisi

- Şiddetli sepsis hastalarında derin ven trombozu gelişmesine karşı profilaksi uygulanmalıdır (derece 1B).
 - Düşük doz fraksiyonlanmamış heparin veya düşük molekül ağırlıklı heparin derin ven trombozunu önlemede etkilidir (derece 1A).
 - Kreatinin klirensi < 30 ml/dk olduğu durumlarda böbreklerde metabolizma oranı düşük olan deltaparin veya başka bir düşük molekül ağırlıklı heparin kullanılmalıdır (derece 1A).
 - Trombositopeni, şiddetli koagülopatisi olan ve heparin kullanılması kontrendike olan hastalarda derin ven trombozuna karşı profilaksi uygulanmamalıdır (derece 1B).
-

Çizelge 2.5 (devam). Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *The Surviving Sepsis Campaign*'in önerileri.

Tedavi Önerileri

Diğer Destekleyici Tedaviler

Stres Ülseri Profilaksisi

- Kanama riski olan şiddetli sepsis ve septik şok hastalarında H₂ reseptör blokerleri veya proton pompası inhibitörleri stres ülseri profilaksisi amacıyla kullanılmalıdır (derece 1B).
- Stres ülseri profilaksisinde proton pompası inhibitörleri H₂ reseptör blokörlerine tercih edilmelidir (derece 2D).
- H₂-reseptör blokörleri sükralfata göre daha etkilidir (derece 2D).
- Risk etkeni olmayan hastalara profilaksi uygulanmamalıdır (derece 2D).

Beslenme

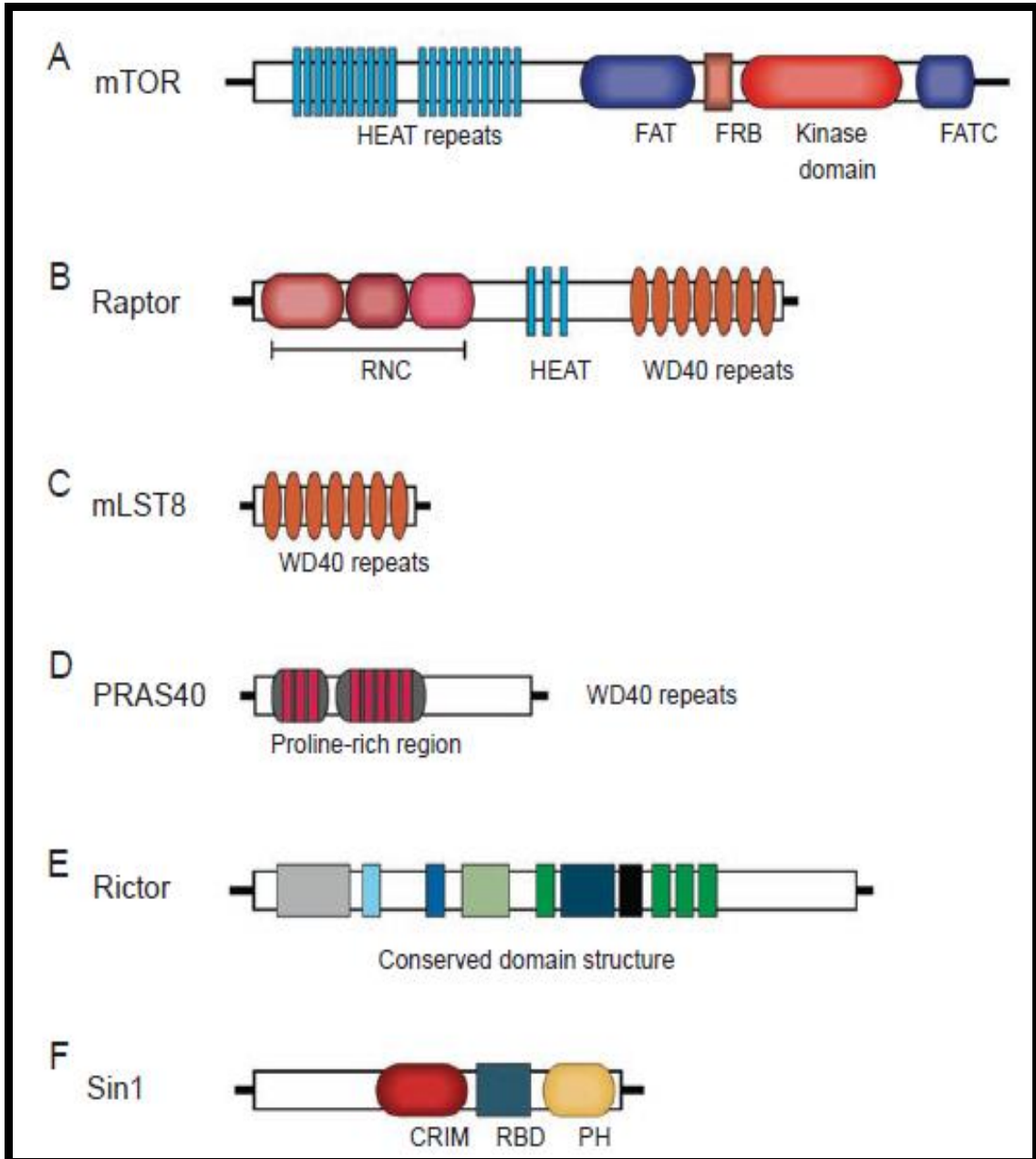
- Oral veya enteral beslenme uygulanmalıdır. Şiddetli sepsis ve septik şok teşhisinden sonraki ilk 48 saat içinde tolere ediliyorsa i.ntravenöz glukoz uygulanmalıdır (derece 2C).
 - Tamı konulduktan sonraki ilk hafta içerisinde yüksek kalorili besinlerden kaçınılmalıdır. Hasta tolere edebiliyorsa günlük > 500 cal olacak şekilde beslenme uygulanmalıdır (derece 2B).
 - Şiddetli sepsis ve septik şok tanısından sonraki ilk 7 gün, intravenöz glukoz ve oral beslenme tek başına parenteral beslenme veya enteral beslenme ile birlikte parenteral beslenmeye tercih olarak uygulanmalıdır (derece 2B).
-

Kanıtın özelliğine göre sınıflandırma: Derece A, yüksek (randomize klinik denemelere dayanılarak); derece B, orta (*downgraded* randomize klinik denemelere veya *upgraded* gözlemsel çalışmalara dayanılarak); derece C, düşük (kontrol randomize klinik denemeler ile birlikte iyi yapılmış gözlemsel çalışmalara dayanılarak); derece D, çok düşük (*downgraded* kontrollü çalışmalar veya başka kanıtlara göre uzman görüşüne dayanılarak). Önerinin gücüne göre sınıflandırma: Derece 1, güçlü; derece 2, zayıf. ARDS, i ve gen solunum sıkıntısı sendromu; OAB, ortalama arter basıncı.

2.2. Rapamisinin Memelilerdeki Hedefi (mTOR)

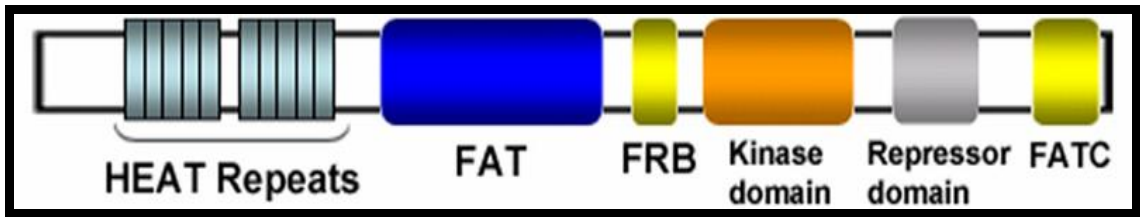
2.2.1. Yapısı ve Özellikleri

Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (*mammalian target of rapamycin*; mTOR), *Streptomyces hygroscopicus* bakterisinin oluşturduğu makrolit türevi bir molekül olan ve klinikte "sirolimus" olarak da adlandırılan rapamisinin hedef molekülüdür. Mayalarda rapamisinin hedefi (*target of rapamycin*; TOR) olarak adlandırılan mTOR, evrimsel olarak korunmuş olup, yüksek ökaryotik canlılarda (memeli, sinekler, solucanlar) bir TOR geni (mTOR, dTOR, ceTOR), mayalarda ise (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) 2 adet TOR (Tor1 ve Tor2) geni bulunmaktadır (17, 80-84). mTOR, 290 kDa ağırlığında atipik bir serin/treonin kinaz olup, fosfatidilinozitol-3-kinaz-ilişkili kinaz (*phosphatidylinositol 3-kinase*; PI3K) ailesine aittir (18). mTORK1 ve mTORK2 gibi işlevsel olarak farklı komplekslerin katalitik çekirdeğini oluşturmaktadır. mTORK1 ve mTORK2 300-500 kDa ağırlığında olan büyük moleküllerdir. Bu kompleksler birbirleriyle ortak ve birbirlerinden farklı protein bileşenleri içermektedirler ve farklı çevresel uyaranlara yanıt olarak çok sayıda hücrel süreçleri kontrol ederler (80-84). mTORK1'e ait 6 ve mTORK2'ye ait 7 adet protein bileşeni bulunmaktadır. Bu bileşenlerden katalitik mTOR alt birimi, *mammalian lethal with sec-13 protein 8* (mLST8), *DEP domain containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR) ve Tti1/Tel2 her iki kompleks için ortaktır. Bununla birlikte, *regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin* (raptor) ve *proline-rich Akt substrate 40 kDa* (PRAS40) mTORK1'e özgü bileşenler iken rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), *mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1* (mSin1) ile *protein observed with rictor 1 and 2* (protor1/2) ise mTORK2'nin yapısında bulunmaktadır. mTOR içeren bu komplekslerin rapamisine olan duyarlılıkları farklılık göstermektedir. mTORK1 rapamisine duyarlı olup, rapamisin tarafından seçici olarak inhibe edilirken mTORK2 rapamisine duyarsızdır ve rapamisin tarafından inhibe edilmemektedir (18).



Şekil 2.9. mTORK bileşenlerinin şematik gösterimi. (A) mTOR, (B) Raptor, (C) mLST8, (D) PRAS 40, (E) Rictor, (F) Sin1. *CRIM*: conserved region in the middle; *FAT*, rapamycin-associated protein (*FRAP*)-ataxia telangiectasia mutated (*ATM*)-transformation/transcription domain-associated protein (*TRRAP*); *FATC*, *FAT* carboxy-terminal homology domain; *FRB*, *FK506* binding protein (*FKBP12*)/rapamycin-binding domain; *HEAT*, Huntington, elongation factor 3, the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A, and *Tor 1p*; *mLST8*, mammalian lethal with *sec-13* protein 8; *PH*, pleckstrin homology; *PRAS 40*, proline-rich Akt substrate 40 kDa; *Raptor*, regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin; *RBD*: Ras binding domain; *Rictor*, rapamycin-insensitive companion of mTOR; *RNC*, *Raptor* N-terminal conserved domain; *Sin1*, stress-activated map kinase-interacting protein 1; *WD40*: about 40 amino acids with conserved W and D forming four anti-parallel beta strands.

mTORK1 ve mTORK2'nin yapısında yer alan mTOR bileşeni, yapısında N-terminal ve C-terminal ucu bulduran bir protein kinazdır. N-terminal ucunda 20 adet birbirini izleyen *Huntington, elongation factor 3, the A subunit of protein phosphatase 2A, and TOR1* (HEAT) tekrarları ve bunu izleyen, kinaz etkinliğini düzenlediği düşünülen, FAT (*the rapamycin-associated protein [FRAP]-ataxia telangiectasia mutated [ATM]-transformation/transcription domain-associated protein [TRRAP]*) bölgesi yer almaktadır. C-terminal ucunda ise kinaz etkinliğine sahip katalitik kinaz alt birimi bulunmaktadır. HEAT dizisinin protein-protein etkileşmesine aracılık ettiği; FAT ve FATC birimlerinin bilinmeyen bir mekanizma ile mTOR kinaz etkinliğini düzenlediği düşünülmektedir. *FKBP12-rapamycin binding* (FRB) bölgesi ise FKBP12-rapamisin kompleksi için bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. FKBP12-rapamisin kompleksi mTOR'ye bağlandıktan sonra FRB bölgesi *in vivo* mTOR'nin bazı fizyolojik işlevlerini bloke etmektedir. Rapamisinin mTOR'nin intrinsik kinaz etkinliğini doğrudan inhibe ettiği kesin olarak bilinmemektedir. Rapamisinin mTOR'yi inhibe edici etkisi, bu enzime bağlanmasının ardından mTOR'nin kendi substratlarıyla etkileşimini önleyerek olabileceği gibi, rapamisin tarafından mTOR otofosforilasyonunun (intrinsik mTOR etkinliği) inhibisyonu ile de ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (18).



Şekil 2.10. mTOR'nin şematik yapısı. FAT, *The rapamycin-associated protein (FRAP)-ataxia telangiectasia mutated (ATM)-transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP)*; FATC, *FAT carboxy-terminal homology domain*; FRB, *FK506 binding protein (FKBP12)/rapamycin-binding domain*; HEAT, *Huntington, elongation factor 3, the regulatory a subunit of protein phosphatase 2A, and Tor 1p*.

mTOR'nin keşfi ve biyolojik işlevlerinin anlaşılması, mTOR'nin bazı işlevlerini inhibe eden, rapamisin kullanımı ile büyük ölçüde kolaylaştırılmıştır (18). mTOR'nin

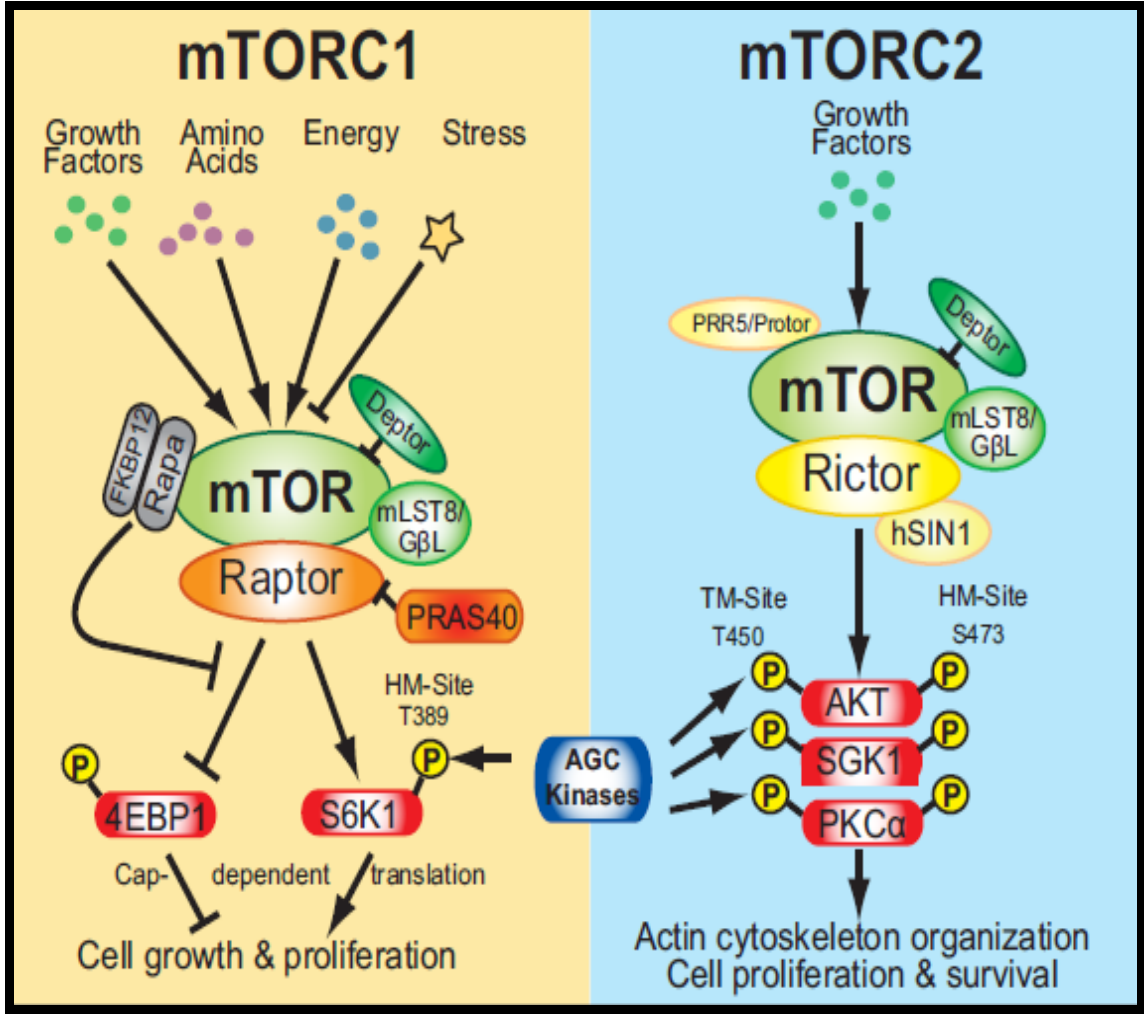
farklı düzenleyici alt birimlere bağlanarak farklı sinyal ileti yollarında yer alan ve rapamisine duyarlı farklı kompleksleri oluşturduğu bildirilmiştir (85, 86).

mTOR, raptor ve mLST8 bileşenlerini içeren mTORK1 rapamisine duyarlıdır ve Thr³⁸⁹ bölgesinden ribozomal protein S6 kinazı, translasyon baskılayıcı 4EBP1'i fosforillemektedir. mTORK1 aracılığı ile translasyon, ribozom biyogenezi, otofaji, glukoz metabolizması ve hipoksiye karşıya verilen hücresel yanıt gibi önemli biyolojik süreçler düzenlenmektedir (19, 87, 88).

mTORK1, birçok ekstraselüler ve intraselüler sinyalleri algılayıp bütünleştirerek anabolik hücresel süreçleri artırmakta ve katabolik hücresel süreçleri inhibe etmektedir. Büyüme faktörleri, amino asit gibi besin maddeleri ve enerji mTORK1'e bağımlı protein sentezini, hücre büyümesini, proliferasyonunu, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücre metabolizmasını artırmaktadır. mTORK1, biyosentez ve metabolizma yollarında yer alan genler için translasyonel olayların yanı sıra transkripsiyonel olayların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. mTORK1 mayalarda ve memelilerde hücresel protein biyosentez kapasitesini artırmak için ribozomal RNA'ların ve proteinlerin transkripsiyonlarını artıran bir süreç olan ribozom biyogenezi de artırmaktadır (89-92).

İlk tanımlanan ve en çok çalışılan mTORK1 *downstream* efektör molekülleri *p70 ribosomal protein S6 kinase 1* (S6K1) ve *eIF4E binding protein 1* (4EBP1)'dir. Dinlenme durumunda S6K1 ve 4EBP1 *eukaryotic initiation factor 3* (eIF3) proteini ile bağlı ve etkisiz durumdadır. Büyüme faktörleri ile büyümenin uyarılması sonucunda mTORK1 eIF3'e bağlanarak S6K1 ve 4EBP1 moleküllerini fosforillemektedir. S6K1'in fosforilasyonu eIF3'den ayrılarak aktivasyonuna neden olmaktadır. Etkin S6K1 ve S6 gibi hücresel substratları fosforilleyerek translasyona ve büyümeye aracılık etmektedir. 4EBP1, *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) proteinine bağlanarak *cap*'e bağımlı mRNA translasyonunu inhibe etmektedir. mTOR ile 4EBP1 fosforilasyonu 4EBP1'in eIF4E'den ayrılmasına, translasyon üzerindeki inhibitör etkinliğin azalmasına ve translasyonun uyarılmasına neden olmaktadır. Etkinleşen mTORK1, protein translasyonuna ve hücre büyümesine aracılık etmektedir (93).

mTORK2, mTOR, Rictor, mLST8 ve mSin1 bileşenlerini içermekte olup, mTORK1'den farklı olarak rapamisine duyarsız olduğu gösterilmiştir; ayrıca mTORK1 ile karşılaştırıldığında mTORK2'nin biyolojik işlevleri daha az bilinmektedir. Bununla birlikte elde edilen veriler bu kompleksin hücre yaşamını ve aktin hücre iskeleti organizasyonunu kontrol ettiğini göstermektedir. Aktin hücre iskeleti organizasyonunun kontrolü mTORK2'nin tanımlanan ilk fizyolojik işlevidir (20, 94). Ayrıca, mTORK2'nin hücre büyümesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesindeki rolü de olduğu gösterilmiştir (95). Bir serin/treonin kinaz olan ve protein kinaz B olarak da bilinen Akt, mTORK2'nin tanımlanan ilk substratıdır (96). Akt, hücre proliferasyonunu, yaşamını, migrasyonunu artırmakta, ayrıca yaşlanma ve obezite gibi çeşitli metabolik süreçleri kontrol etmektedir (97). Büyüme faktörü aracılıklı fosfotidilinozitol-3-kinaz sinyal ileti yolunda, Akt'nin etkinleşmesi için Akt üzerinde Thr³⁰⁸ bölgesinin fosfotidilinozitol 3'e bağımlı kinaz (*phosphoinositide dependent protein kinase*, PDK1) tarafından, hidrofobik motif olarak bilinen Ser⁴⁷³ (*hydrophobic motif*; HM) bölgesinin ise mTORK2 tarafından fosforile edilmesi gerekmektedir (97, 98). mTORK2, SGK1 (*serum and glucocorticoid-induced protein kinase*)'yi Ser⁴²² bölgesini ve protein kinaz Ca (*protein kinase Ca*, PKC α)'yı Ser⁶⁵⁷ üzerindeki HM bölgelerini de fosforillemektedir (99). mTORK1'in substratı olan S6K1 ile birlikte mTORK2'nin substratları olan Akt, SGK1 ve PKC α ; AGC kinazlar olarak adlandırılmaktadır. mTORK1 ve mTORK2, *subfamily of protein kinases contains 60 members, including PKA, PKG and PKC* (AGC) kinaz ailesinin üyelerini fosforillemektedir (84, 100).



Şekil 2.11. mTORC1 ve mTORC2'nin yapısı, *upstream* ve *downstream* molekülleri. *4EBP1*, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; AGC, subfamily of protein kinases contains 60 members, including PKA, PKG and PKC; Akt, Protein kinase B; Deptor, DEP domain containing mTOR-interacting protein; FKBP12, The FK506 binding protein; HM, hydrophobic motif; Raptor, regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin; mLST8, mammalian lethal with sec-13 protein 8; mTOR, mammalian target of rapamycin; PKC, protein kinase C; PRAS 40, proline-rich Akt substrate 40 kDa; Rictor, rapamycin-insensitive companion of mTOR; S6K1, S6 kinase 1; SGK1, serum and glucocorticoid-regulated kinase 1; Sin1, stress-activated map kinase-interacting protein 1.

2.2.2. Etkinliğinin Dzenlenmesi

mTOR etkinliği, insülin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (*insulin-like growth factor 1*; IGF-1), epidermal büyüme faktörü (*epidermal growth factor*; EGF), stres, enerji ve besin maddelerinin yer aldığı *upstream* sinyaller ile dzenlenmektedir (101).

Mitojen, enerji ve besin kaynaklı sinyalleri algılayan ve rapamisine duyarlı olan mTORK1'in temel işlevi hücre büyümesini, proliferasyonunu ve canlılığını dzenlemektir (101). Çok sayıda farklı sinyal ileti yolu mTORK1 etkinliğini dzenlemektedir ve üzerinde en fazla çalışılan, büyüme faktörü/PI3K/Akt sinyal ileti yoludur. Akt, mTORK1'in *upstream* molekülü ve mTORK2'nin *downstream* molekülü olarak mTOR sinyal iletiminde değişken bir rol oynamaktadır. Akt, kısmen, mTORK1'in pozitif dzenleyicisi olarak görev yapan ve küçük bir GTPaz molekülü olan *Ras-homolog enriched in brain* (Rheb)'e (102) yönelik GTPaz etkinleştirici protein (*GTPase activating protein*; GAP) etkinliğine sahip olan "tüberin" olarak da adlandırılan *tuberous sclerosis complex* (TSC) 2 aracılığıyla mTORK1 etkinliğini dzenlemektedir (103). TSC2, TSC1 (hamartin) ile fiziksel ve işlevsel bir heterodimerik kompleks oluşturmaktadır (93). TSC1 oluşan bu heterodimerik kompleksi stabilize ederken, TSC2 downstream efektör moleküllere karşı GAP etkinliği sergilemektedir. TSC1/TSC2 heterodimerinin GAP etkinliği, etkin formdaki GTP bağlı *Rheb*'i etkisiz formdaki GDP'ye bağlı duruma dönüştürerek mTOR etkinliğini baskılamaktadır (104). TSC1 veya TSC2'den herhangi birinin genetik etkisizleştirilmesi, mTORK1 etkinliğinde artma ile sonuçlanması TSC1/TSC2'nin mTORK1'in negatif dzenleyici molekülü olduğunu göstermiştir. Büyüme faktörleri varlığında etkinleşen Akt, Ser⁹⁹ ve Thr¹⁴⁶² bölgelerinden TSC2'yi fosforilleyerek onun TSC2'nin GAP etkinliğini inhibe etmektedir (105). Böylece *Rheb*, GTP'ye bağlı etkin formunu sürdürerek mTORK1 etkinliğini artırmakta ve *downstream* moleküller olan S6K ve 4EBP1'i etkinleştirmektedir (105).

Hücrenin enerji düzeylerinin yetersiz olması durumunda mTOR sinyal iletiminde bir azalmaya neden olmaktadır. Yüksek AMP miktarı veya artmış AMP/ATP oranı hücrenel enerji düzeyinin azaldığını göstermektedir ve hücrenel enerji metabolizmasının

başlıca düzenleyicisi olan, AMP ile etkinleştirilen protein kinaz (*AMP-activated protein kinase*; AMPK)'ı, *upstream* molekülü olan, *liver kinase B1* (LKB1) tarafından Thr¹⁷² bölgesinden fosforillenerek etkinleştirilmektedir. AMPK, bir serin/treonin kinaz etkinliğine sahip olup, mTORK1'in etkinliğini inhibe eden TSC2'yi Thr¹²²⁷ ve Ser¹³⁴⁵ bölgelerinden fosforillemektedir. TSC2 fosforilasyonu, fosforile edildiği bölgeye bağlı olarak, kendi işlevlerini artırmakta veya inhibe etmektedir. TSC2'nin AMPK tarafından Thr¹²²⁷ ve Ser¹³⁴⁵ bölgelerinden fosforilasyonu GAP etkinliğini artırmakta ve buna bağlı olarak mTOR etkinliğini baskılamaktadır (102, 106-110).

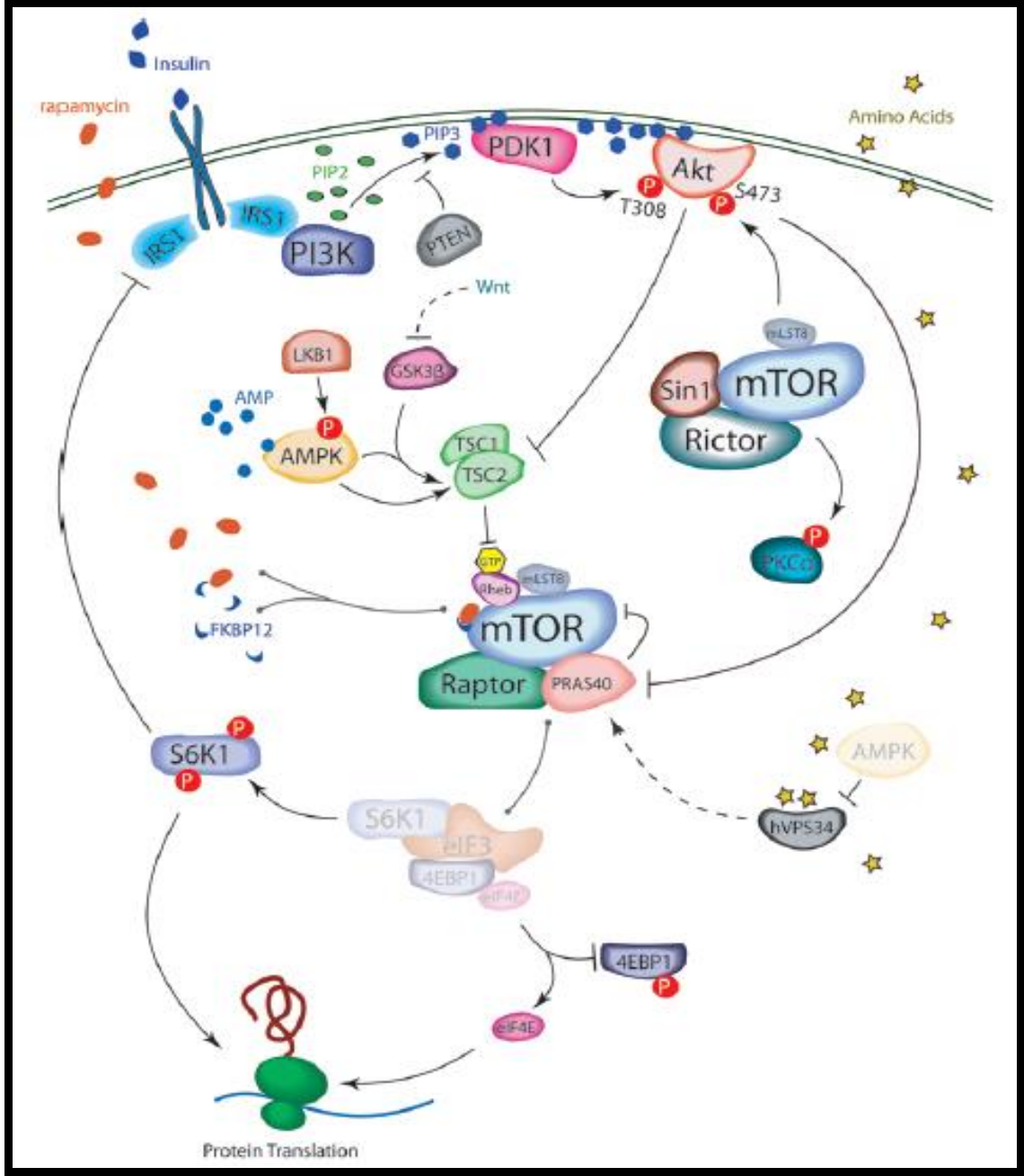
TSC2'nin doğrudan fosforilasyonuna ek olarak, Akt, mTORK1 etkinliğini hücrel enerjiyi düzenleyerek de etkilemektedir. Büyüme faktörlerine yanıt olarak Akt, Thr¹⁴⁶² bölgesinden TSC2'yi fosforillemekte ve TSC1/TSC2'nin mTOR etkinliği üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır. Ancak, yüksek ATP düzeylerinde, Akt, TSC2'nin Thr¹²²⁷ ve Ser¹³⁴⁵ bölgelerinin AMPK aracılıklı fosforilasyonunu inhibe ederek mTORK1 etkinliğini artırmaktadır. Sonuç olarak, mTORK1 etkinliğinin düzenlenmesinde, Akt'nin 2 farklı yolun *upstream*'inde yer aldığı gösterilmiştir (111).

mTORK1 sinyal iletimi hipoksi aracılığıyla da düzenlenmektedir. Hipoksi, mTORK1'in Ser²⁴⁸¹ bölgesinin hızlı ve geri dönüşümlü fosforilasyonuna neden olmaktadır. Hipoksi, ozmotik stres ve mekanik stresin de içinde bulunduğu hücrel stresin farklı formları da, TSC2'nin GAP etkinliğini artırarak mTORK1 sinyal iletimini azaltmaktadır (112-114).

mTORK1 etkinliği amino asit düzeyleri tarafından da düzenlenmektedir. Amino asit düzeyleri mTORK1 etkinliğini düzenleyici işlevi ilk tanımlanan ancak, mekanizması hakkında en az bilginin olduğu bir mTORK1 etkinleştiricisidir. TSC1/TSC2 ekspresyonunun susturulması sonucu amino asit yokluğuna direnç gelişmesi, mTORK1 etkinliğinin amino asitler tarafından düzenlenmesine TSC1/TSC2'nin dahil olduğu gösterilmiştir. mTOR etkinliği üzerine, amino asitlerin inhibe edici etkisinde kritik olan nokta *Rheb* ile mTORK1 bağlanmasının inhibisyonudur (115, 116).

mTORK1'e göre mTORK2'nin etkinliğini düzenleyen mekanizmalar henüz kesin olarak bilinmemektedir. İnsülinin PI3K aracılıklı etkilerinde Akt'nin Ser⁴⁷³ bölgesinin mTORK2 aracılıklı fosforilasyonu (100, 117, 118) artmaktadır ve PI3K'nin inhibisyonun *in vitro* mTORK2 etkinliğini azalttığı gösterilmiştir. PI3K, muhtemelen mTORK2'in *upstream* bölgesinde yer almaktadır. Rheb, mTORK1'in *upstream* etkinleştiricisi iken mTORK2 etkinliğinin düzenlenmesi üzerine negatif ve dolaylı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. mTORK2 etkinliğinin düzenlenmesinde muhtemel efektör moleküller arasında TSC1/TSC2 heterodimerik kompleksinin de yer aldığı düşünülmektedir. mTORK1 üzerine inhibitör etki gösteren TSC1/TSC2, mTORK2 sinyal iletimini artırabilmektedir (119, 120).

mTORK etkinliğinin düzenlenmesinde rol oynayan *feedback* mekanizmaları da bulunmaktadır. mTORK1/S6K yolu en az iki farklı negatif *feedback* mekanizması ile PI3K ve mTORC2 etkinliğini baskılamaktadır. mTORK1/S6K1, IRS'lerin inhibitör Ser/Thr bölgelerinin fosforilasyonuna aracılık etmekte ve IRS'lerin PI3K'den ayrılarak PI3K aracılıklı sinyal iletiminin azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca S6K1, mTORK2'nin bileşenlerinden rictor'u Thr¹¹³⁵ bölgesinden fosforillemekte ve mTORK2 sinyal iletimini baskılamaktadır (121-124).



Şekil 2.12 mTOR sinyal iletimi ve etkinliğinin düzenlenmesi. *4EBP1*, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; Akt, Protein kinase B; AMP, adenosine monophosphate; AMPK, AMP-activated protein kinase; eIF3, eukaryotic translation initiation factor 3; FKBP12, FK506 binding protein; GSK3β, glycogen synthase kinase 3β; GTP, guanosine 5'-monophosphate; hVPS34, mammalian vacuolar protein sorting 34 homologue; LKB1, liver kinase B1; mLST8, mammalian lethal with sec-13 protein 8; mTOR, mammalian target of rapamycin; PDK, phosphoinositide dependent protein kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3'kinase; PKC, protein kinase C; PRAS40, proline-rich Akt substrate 40 kDa; PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; PIP3, Phosphatidylinositol three phosphate; Raptor, regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin; Rheb, Ras-homolog enriched in brain; Rictor, rapamycin-insensitive companion of mTOR; S6K1, S6 kinase; Sin1, stress-activated map kinase-interacting protein 1; TSC, tuberous sclerosis complex.

2.2.3. Ekspresyonu ve Fizyopatolojik İşlevlerdeki Rolü

mTOR'nin immün sistemde merkezi düzenleyici olarak değeri yeni anlaşılmıştır. PI3K/Akt/mTOR yolu, hem doğal immün sistem hücrelerinin hem de kazanılmış immün sistem hücrelerinin işlevi ve canlılığının düzenlenmesinde etkin olan önemli bir sinyal ileti yoludur. mTOR, nötrofil hücreleri, mast hücreleri, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doğal immün sistemin hücreleri ile T hücreleri ve B hücrelerinin dahil olduğu kazanılmış immün sistem hücrelerinin etkinliklerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır ve immün yanıtla ile organ homeostazını düzenlemektedir.

Mast hücrelerinin işlevi ve homeostazının düzenlenmesinde mTOR'nin rolü ile ilgili çok az şey bilinmektedir. IgE reseptörü, FcεRI, aracılığıyla mast hücrelerinin uyarılması PI3K'ye bağımlı mTORK1 sinyal iletimini etkinleştirdiği bilinmektedir (125).

Nötrofiller sitokinler tarafından uyarılan ve hızla enfeksiyon alanına göç eden doğal savunma sisteminin farklılaşmış hücreleridir. PI3K-eksik nötrofillerde kemotaktik maddelere karşı verilen migrasyon yanıtında ciddi bozuklukların ortaya çıkması, nötrofil hücrelerinin işlevlerinin düzenlenmesinde PI3K ve mTOR'un önemli rol aldığını göstermiştir (126-129).

İmmün sistem hücrelerinin dışında kalp dokusunun kardiyomiyosit hücrelerinde ve damar düz kas hücreleri (DDKH)'nde mTOR ve mTOR'un *downstream* efektörü olan S6K'nin eksprese edildiği gösterilmiştir. mTOR sinyal iletiminin kardiyak hipertrofi gelişmesinde rol oynadığı, kardiyomiyosit hücrelerinde fenilefrin (*phenylephrine*; PE) ve endotelin (*endothelin*, ET)-1 gibi pro-hipertrofik maddeler tarafından indüklenen protein sentezinin rapamisin tarafından bloke edilmesiyle gösterilmiştir. DDKH'de mTOR'nin ekspresyonunun gösterilmesinin ardından, mTOR inhibitörü rapamisinin DDKH proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (130-133).

Kalp ve DDKH’de olduğu gibi böbrek dokusunda da mTOR etkinliğinin olduğu gösterilmiştir. mTOR sinyal ileti yolu akut böbrek zedelenmesi, diyabetik nefropati ve polikistik böbrek hastalıkları gibi yaygın görülen renal sistem hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. mTORK1, hücre büyümesi ve proliferasyonunu düzenleyici etkisi aracılığıyla renal tübül hücrelerinin proliferasyonuna katkıda bulunmakla birlikte tübüler hücre rejenerasyon için gerekli olduğu belirtilmiştir (134).

mTOR sinyal ileti yolu pek çok fizyolojik hücresel olaylarda yer almasının yanı sıra patofizyolojik olaylarda da yer almaktadır. Bu patofizyolojik olaylar genel olarak,

- Kanser,
 - Metabolik hastalıklar,
 - Nörodejeneratif hastalıklar,
 - Enflamasyon
- olarak tanımlanmıştır.

2.2.3.1. Kanser Patojenezinde mTOR’un rolü

mTOR, büyüme ve metabolizmanın temel düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır. mTOR sinyal iletimi büyüme, proliferasyon ve protein sentezi gibi temel hücresel işlevlerinin düzenlenmesini etkileyen bir protein kinazdır. İnsanlarda mTOR etkinliğinin bozulmasına bağlı olarak kanser, obezite, tip 2 diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve enflamasyon ortaya çıkmaktadır (135).

mTOR’un kanser patojenezindeki rolü PI3K/Akt sinyal ileti yolu ile açıklanmaktadır (135). mTOR, PI3K/Akt sinyal transdüksiyon yolunun temel bir bileşeni olup (136, 137), PI3K, mTORK1 ve mTORK2’nin *upstream* molekülüdür (135). PI3K/Akt sinyal ileti yolunda etkinleşen Akt, mTOR dahil çeşitli hücre içi proteinleri fosforilleyerek kanser gelişimine neden olan bir dizi olayı tetiklemektedir. Bu nedenle mTOR, antikanser tedavi için bir hedef olarak tanımlanmıştır. mTOR sinyal ileti yolu, rabdomiyosarkom, sinoviyal sarkom ve leyomiyosarkom gibi bazı sarkom türlerinde anormal derecede etkinleşmektedir (138, 139). mTOR yolunun kanser

patojenezindeki önemini açıklayan birkaç araştırma bulunmaktadır. mTORK1 ve mTORK2'nin *upstream*'i olan, PI3K sinyal ileti yolundaki pek çok bileşen kanserli hastalarda mutasyona uğramıştır. Tümör oluşumunun temelinde onkojenlerin etkinliği ve tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesi gibi olaylar rol oynamaktadır (140, 141). Bununla birlikte birçok ailesel kanser sendromları, mTORK1'in *Tsc1/2*, serin treonin kinaz 11 (*Lkb11*), *Pten* ve nörofibromatoz tip 1 (*neurofibromatosis type 1*; *Nf1*) gibi *upstream* proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. mTOR sinyalizasyonunun onkojenik etkinliği, kanser hücrelerinin büyümesi, yaşamı ve proliferasyonu için gerekli bazı süreçleri indüklemektedir. mTORK1'in *downstream* molekülü olan 4EBP1/eIF4E tümör oluşumunda önemli rol oynamaktadır (135). 4EBP1/eIF4E, Akt'nin mRNA translasyonu, hücre büyümesi, tümör gelişimi gibi onkojenik etkilerine neden olan sinyal ileti yolunda yer almaktadır. Bununla birlikte, mTORK1'in diğer bir *downstream* molekülü olan S6K1'in, ERK ve/veya Akt'nin onkojenik etkileri üzerine sınırlı katkısı bulunmakta olup, mTORK1'in *downstream*'i olan ve protein sentezini kontrol eden 4EBP1 aracılıklı sinyal ileti yolu ile aynı derecede onkojenik etki göstermemektedir. mTORK1/4EBP1/eIF4E yolunun kanserde nasıl bir katkısının olduğu kesin olarak bilinmemektedir. eIF4E'in, hücre yaşamını, hücre döngüsünün sürdürülmesini, anjiyogenez, enerji metabolizmasını ve metastazı düzenleyen pro-onkojenik proteinlerin translasyonunu artırarak tümör oluşumu ve hücre proliferasyonunu etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca mTOR-aracılıklı ribozom biyogenezindeki artma, muhtemelen, artan hücre büyümesinin devamı için gerekli mekanizmaları sağlayarak hücre proliferasyonunu artırmaktadır.

mTOR, aynı zamanda apoptozun düzenlenmesinde rol oynayarak kanser patojenezinde yer almaktadır. mTOR etkinliğindeki artışın, apoptozda önemli bir belirleyici olan ve DNA zedelenmesi ile düşük besin seviyeleri gibi hücrede stresi indükleyen koşullar altında etkinleşen, kritik bir tümör baskılayıcı protein, p53 molekülünün inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (136, 142, 143).

Kanser patojenezinde mTORK2'nin de rol aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Çok sayıda gliom olgularında mTORK2'nin alt birimi olan rictor'un aşırı derecede eksprese edilmektedir. Rictor'un ekspresyonundaki bu artış,

mTORK2'nin oluşumunu ve etkinliğini artırmakta, bunun sonucunda proliferasyon ve invazyon yeteneğine sahip kanser hücrelerinin oluşumu artmaktadır (143).

2.2.3.2. Metabolik Hastalıkların Patojenezinde mTOR'nin rolü

Etkinliği, besin düzeyleri ve hücrel enerji tarafından düzenlenen mTOR, enerji homeostazının ve metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (144). TSC1, TSC2 veya mTORK bileşenlerinin vücutta tamamen silinmesinin embriyo ölümü ile sonuçlanması, mTOR sinyal iletiminin embriyo gelişiminin erken dönemlerindeki önemini göstermektedir. mTORK bileşenlerinin pankreas, iskelet kası ve beyin gibi organlarda *knockout* edilmesi ile mTORK1 ve mTORK2 tüm vücut metabolizmasında düzenleyici rolünün olduğu gösterilmiştir (145-155). Metabolik hastalıklarda mTOR'nin rol oynadığı bu bilgiler doğrultusunda kanıtlanmıştır.

mTOR, memelilerde enerji depolayan başlıca doku olan adipoz doku oluşumuna aracılık eden adipojeniz olayında esas rolü oynamaktadır. mTORK1'in aşırı etkinliği adipojenizi artırırken, *in vitro* mTORK1 inhibisyonunun yağ hücrelerinin devamlılığına zarar vererek adipojenizi bloke ettiği gösterilmiştir (156). Yağ dokusu hücreleri üzerine olan etkilerin yanı sıra, mTORK1 etkinliği ile ilişkili artan protein sentezi insülin rezistansının gelişmesini indükleyebilir (157).

Kronik mTORK1 etkinliği ile artan adipojeniz, insülin direnci ve tip II diyabet gelişmesinde başlıca risk etkeni olan obezitenin gelişmesine aracılık etmektedir. İnsülin direnci hepatik glukoz üretimini ile hepatik trigliserit birikimini artırarak hiperglisemi ve hiperlipidemiye yol açmaktadır (135).

Pankreasın β hücreleri alınan besin maddelerine yanıt olarak insülin salgılamakta ve glukoz homeostazını düzenlenmektedir. Bununla birlikte alınan besin maddelerine yanıt olarak büyümeyi kontrol eden mTORK1 sinyal ileti yolu, β hücrelerinin işlevlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Farelerin β hücrelerinde yapısal mTORK1'in etkinleşmesi kan glukoz düzeyinin azaltmakta ve glukoz intoleransının

önlenmesine aracılık etmektedir (135). mTORK1, β hücrelerinin boyutu ve işlevi ile birlikte bu hücrelerden insülin salgılanmasını kontrol eden pozitif düzenleyici faktördür. mTORK1'in bu düzenleyici etkilerini *downstream* efektörü olan S6K aracılığıyla gerçekleştirdiği, S6K-eksik farelerde β hücre boyutunun küçük olması, insülin salgılanmasında bozulmanın meydana gelmesi ve bu farelerin hipoinsülinemik olmaları ile gösterilmiştir (158)

2.2.3.3. Nörolojik Hastalıkların Patojenezinde mTOR'nin Rolü

Nörodejeneratif hastalıklar nöronların kalıcı olarak yapısal ve işlevsel kaybı ile ilişkilidir. Genetik yatkınlık ve yaş nörodejeneratif hastalıklarda başlıca risk etkenidir. Nöronlarda toksik/mutant protein agregatlarının birikimi ile bunun sonucunda ortaya çıkan hücre zedelenmesi ve hücre ölümü nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde yer almaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda otofaji yolu ile hücre içi protein yıkımının düzenlenmesinde azalma olduğu gösterilmiştir (135).

mTOR sinyal ileti yolunun özellikle beyinde protein sentezi ve proteinlerin otofajik degradasyonu gibi protein homeostazında önemli olduğu bilinmektedir. mTORK1, protein sentezi aracılığıyla öğrenmeyi ve hafıza oluşumunu artırmaktadır (159). mTOR'nin otofajideki rolü ile bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar konuşma ve hafıza kaybı, nöronal kayıp, demans ve tremorlara yol açan yapısı farklılaşmış proteinlerin anormal birikimi ile karakterizedir (160). Alzheimer ve Huntington hastalıkları hayvan modellerinde rapamisin uygulanması, oluşan bu toksik proteinlerin otofaji ile yok edilmesini indüklemekte ve klinik tabloyu iyileştirmektedir (161, 162).

Nörolojik bir hastalık olan epilepsinin nöronlarda hiperaktif mTOR etkinliği ile ilişkili olabileceği PTEN veya TSC'si silinmiş epileptik fare modellerinde gösterilmiştir (163-165).

2.3.4.4. Enflamasyon Patojenezinde mTOR'nin Rolü

Rapamisin'in immün sistemi baskılayıcı bir ilaç olarak geliştirilmesi ve bu amaç ile kullanılmaya başlanması, mTOR sinyal iletiminin immün sistemde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Enfeksiyonun ardından hızla başlayan ve mast hücreleri, fagositler ile doğal öldürücü hücreler (*natural killer cells*; NK)'in rol aldığı doğal immün yanıtta mTOR, nötrofillerin ve mast hücrelerinin yaşamı, migrasyonu ve sitokin üretimi için gereklidir (166-168).

Doğal immün sistemdeki işlev bozukluğu ile karakterize olan ıvegen akciğer zedelenmesi, akciğerlerin önemli bir enflamatuvar hastalığıdır (169-171). İvegen akciğer zedelenmesi hastanede yatan, sepsis veya bakteriyel pnömoni hastaları için yüksek mortalite ve morbidite nedeni olarak görülmektedir. Nötrofil infiltrasyonu, proenflamatuvar sitokinlerin oluşumu ve epitel hücrelerinin apoptozunun yer aldığı ıvegen akciğer zedelenmesinin patojenezi karmaşıktır ve alveol epitelinin zedelenmesine, pulmoner ödem ve gaz alışverişinde anormalliklere yol açmaktadır (172). Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının majör bileşeni olan LPS, hayvanlarda, ıvegen pulmoner enflamasyona, yerel proenflamatuvar sitokin üretimine neden olmakta ve insandaki ıvegen akciğer zedelenmesinin patofizyolojisini taklit etmektedir. LPS'nin neden olduğu bu pulmoner cevapta TLR sinyal iletiminin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (173). Gram-negatif sepsis ve pnömoni modellerinde LPS-TLR4 etkileşmesi sonucunda, NF-κB gibi transkripsiyon faktörler etkinleşerek proenflamatuvar ve proapoptotik transkripsiyonel olaylar indüklenmektedir. (170). TLR4 aracılıklı NF-κB etkinliğinin düzenlenmesinde mTOR'un *upstream* molekülleri olan PI3K/Akt sinyal ileti yolunun pozitif ve negatif ters düzenleyicisi olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Memeli fibroblast hücrelerinde Akt'nin IκB kinaz (*inhibitor of κB kinase*; IKK) aracılığıyla NF-κB'yi etkinleştirdiği gösterilmişken, insan monosit THP-1 hücrelerinde PI3K/Akt sinyal iletiminin inhibisyonunun NF-κB etkinliğini artırdığı bildirilmiştir (174, 175).

mTORK1 sinyal ileti yolunun, TLR4 aracılıklı, *in vitro* olarak nötrofil hücrelerinde indüklenen proenflamatuvar yanıtta ve farelerde LPS ile indüklenen ıvegen

akciğer zedelenmesinde önemli bir katkısının bulunduğu gösterilmiştir (176-178). TLR4 ligandı, LPS'ye, maruz bırakılan nötrofil hücrelerinde PAM ve LPS konsantrasyona bağımlı ve zamana bağımlı olarak mTORK1'in *downstream* hedefi olan S6K'ın Ser^{240/244} bölgelerinden fosforilasyonunu artırmıştır. S6K1 fosforilasyonunun mTORK1 tarafından indüklendiği rapamisin kullanılarak araştırılmıştır ve rapamisin, LPS tarafından indüklenen S6K1'in Ser^{240/244} bölgelerinden fosforilasyonunu azaltmıştır. LPS uygulanan nötrofil hücre kültüründe rapamisin, konsantrasyona bağımlı olarak TNF- α ve IL-6 oluşumunu azaltmıştır. *In vivo*, farelerde LPS veya PAM ile indüklenen ıvegen akciğer zedelenmesinde rapamisinin mTORK1'i inhibe ederek, akciğer doku homojenatlarında MPO, TNF- α ve IL-6 düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgularla özgül bir mTORK1 inhibitörü olan rapamisinin nötrofil hücrelerinde proenflamatuvar sitokin üretimini ve ıvegen akciğer zedelenmesinin şiddetini azalttığı gösterilmiştir. mTORK1'in enflamatuvar yanıtların düzenlemesindeki rolü ile ilgili mekanizmalar gen transkripsiyonu üzerinden açıklanmaktadır. TNF- α ve IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, rapamisinin LPS ile artan NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu ve transkripsiyonel etkinliğini azalttığı gösterilmiştir (91). Rapamisin bu etkisini, LPS ile uyarılmanın ardından artan I κ B- α fosforilasyonu ve degradasyonunu azaltarak ve NF- κ B'nin p65 alt biriminin Ser²⁷⁶ bölgesinden fosforilasyonuna bağılı etkinliğindeki artışı inhibe ederek göstermektedir (179, 180).

Alerjik astım da ıvegen akciğer zedelenmesi gibi immün sistem hücrelerinin rol aldığı enflamatuvar bir hastalıktır. Alerjik astım en yaygın görülen, süregen eozinofilik hava yolu enflamasyonu, artmış mukus üretimi ve hava yolunun geri dönüşümlü olarak tıkanması ile karakterize solunum yolu hastalığıdır. Alerjik astım patojenezinde IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α ve IL-1 β gibi proenflamatuvar sitokinler enflamasyona aracılık etmektedir (181). Ovalbümin ile uyarılmayı takiben akciğer dokusunda ve bronkiyoalveolar sıvıda artan proenflamatuvar sitokinlerin düzeyi rapamisin ile azalmıştır. İmmün sistemi baskılayıcı bir ilaç olan rapamisinin ovalbümin ile indüklenen alerjik astım modelleri üzerine karmaşık etkilerinin olmasına karşın, B hücre yanıtını ve antikor üretimini baskılayıcı, nötrofil kemotaksisini azaltıcı ve doğal

öldürücü hücrelerin proliferasyonunu önleyici etkileri ile alerjik hava yolu hastalıklarının gelişiminde mTOR'nin uyarıcı bir etkisinin olduğunu göstermiştir (182-186).

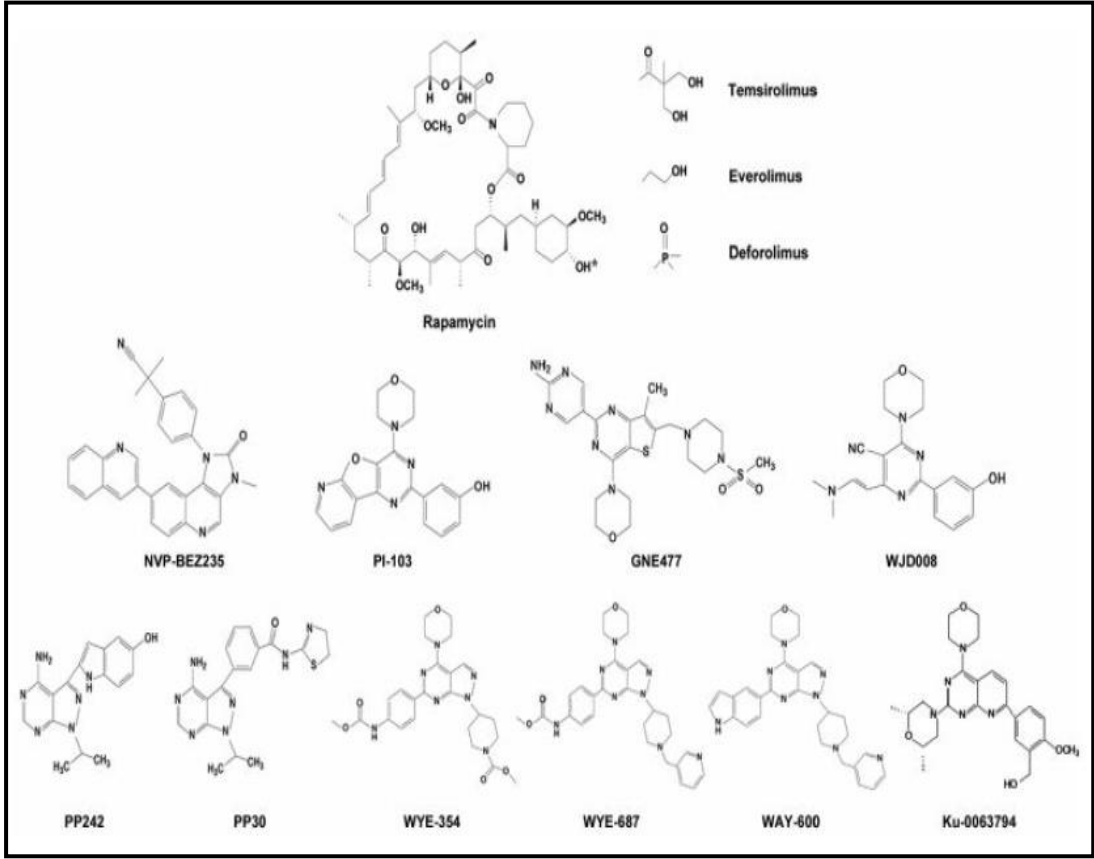
mTOR'nin immün sistemde rol aldığına ilişkin bir başka durum ise otoimmün hastalıklar ile ortaya konmuştur. İmmün sistemin aşırı etkinliği sonucu ortaya çıkan sistemik lupus eritematoz gibi otoimmün hastalıklarda T hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını uyararak, mTOR sinyal ileti yolunun etkinliğinin arttığı bilinmektedir (187).

2.2.4. mTOR İnhibitörleri

mTOR etkinliğini inhibe eden moleküller (1) rapamisin ve rapamisin analogları, (2) mTOR ve PI3K üzerinde dual etki gösteren inhibitörler, (3) seçici mTORK1/2 inhibitörleri ve (4) diyet türevi doğal ürünler olmak üzere 4 ayrı başlık altında gruplandırılmıştır. Bu gruplar içinde yalnızca rapamisin ve rapamisin analogları özgül olarak mTOR etkinliğini inhibe etmektedir. Diğer başlıklar altında bahsedilen moleküller farklı mekanizmalarla mTOR etkinliğini inhibe etmektedir (188).

2.2.4.1. Rapamisin ve Rapamisin Analogları

Rapamisin, diğer adıyla sirolimus, ilk keşfedilen mTOR inhibitörüdür. 1975 yılında, ilk defa, Güney Pasifik Okyanusunda bulunan ve *Rapa Nui* olarak da bilinen Paskalya adasından izole edilmiş olan *Streptomyces hygroscopicus* adlı bakteri tarafından üretilen makrosiklik lakton yapısında bir antibiyotiktir. Kimyasal formülü $C_{51}H_{79}NO_{13}$ olup, Şekil 2.13'te gösterilmiştir (188, 189).



Şekil 2.13. Rapamisin ve rapamisin analoglarının kimyasal yapısının şematik gösterimi.

Rapamisin ilk olarak antifungal bir madde olarak keşfedilmiştir. Bununla birlikte klinikte esas kullanıldığı alan, immünosupresif ve antiproliferatif özelliklerinin gösterilmesiyle birlikte hızla farklı bir yöne ilerlemiştir. Rapamisin ile ilgili kemoterapiden, transplante edilen organın rejeksiyonuna; kardiak cerrahide uygulanan stentlerin açık tutulmasından, kornea yanıkları tedavisine kadar pek çok alanda farklı araştırmalar ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (189). Rapamisin, 1999 yılında, Amerika'da, *Food and Drug Administration* (FDA) tarafından immünosupresif bir ilaç olarak onaylanmıştır (190).

Rapamisin, hücre içi bir reseptör olan FKBP12 proteinine bağlanarak inhibitör etkisinden sorumlu olan kompleksi oluşturmaktadır. FKBP12 proteinine bağlanarak inhibitör etkili kompleks oluşturan rapamisin, mTOR'nin C-terminal ucundaki FRB bölgesine bağlanarak hücre büyümesini inhibe edici ve sitotoksik etkilerini meydana

getirmektedir (191-194). FRB bölgesi aracılığıyla mTORK1 inhibisyonunun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, FKBP12-rapamisin protein kompleksi bu bölgeye bağlanarak mTOR'nin otofosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etkilerin FRB bölgesi ile katalitik kinaz bölgesi arasındaki allosterik etkileşme sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (195). Bununla birlikte, rapamisinin, FKBP12 proteini ile kompleks oluşturmadan da FRB bölgesine düşük afinite ile bağlandığı gösterilmiştir. (196). Ayrıca, rapamisinin mTOR'nin otofosforilasyonunu inhibe edici etkisinin yanı sıra, mTOR-raptor kompleksini destabilize ederek de mTORK1 etkinliğini inhibe ettiği ileri sürülmektedir (197).

Rapamisine ek olarak temsirolimus, everolimus ve deforolimus olmak üzere 3 adet rapamisin analogu (rapaloglar) günümüzde insanlarda kullanılmaktadır. Bu rapaloglar, rapamisin ile aynı etki mekanizmasına sahip olup FKBP12 proteinine bağlanarak mTOR'nin FRB bölgesi ile etkileşmektedir. Temsirolimus (CCI779) bir ön ilaç olup, rapamisinin dihidroksimetil-propiyonik asit esteridir. Bu modifikasyon, bileşiği, suda çözünebilir yapmakla birlikte damar içi uygulamaya olanak sağlamaktadır. Temsirolimus vücutta rapamisine dönüşerek benzer farmakolojik etkiler oluşturmaktadır. Everolimus (RAD001), C-40 konumunda O-(2-hidroksietil) zincirine sahiptir. Deforolimus (AP23573) ise lakton halkasının C-40 konumunda fosfin oksit sübsitüsyonuna sahiptir (197).

Rapamisin ve analogları, mTOR inhibisyonuna neden olan diğer ilaç gruplarından farklı olarak mTORK1 için oldukça spesifiktir. Hücre biyolojisinde mTORK1'in işlevinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan rapamisin, mTORK1'in potent ve spesifik bir inhibitörü olarak bilinmektedir (198). Rapamisinin mTORK1'e seçicilik oranı mTORK2'e göre oldukça yüksek olup, yaklaşık 500 katı kadardır (189).

2.2.4.2. mTOR ve PI3K Üzerinde Dual Etki Gösteren İnhibitörler

GNE477, NVP-BEZ235, PI-103, XL765 ve WJD008 gibi moleküllerin yer aldığı, mTOR kinaz inhibisyonu ile ilişkili bu grup moleküller, mTOR ve PI3K inhibitörleridir.

Bu moleküller mTOR ve PI3K'ın ATP bağlayan bölgelerini hedeflemektedirler. mTOR ve PI3K üzerine benzer etkililik göstermekte ve bu nedenle seçici olarak mTOR etkinliğini inhibe etmek için kullanılmamaktadırlar (199-203). mTOR'nin işlevleri ve etkinliğinin düzenlenmesi ile ilgili çalışmalarda araştırma aracı olarak kullanılmaya genellikle uygun değildirler. PI3K sinyal iletimi yolunda yer alan PI3K, Akt ve mTOR gibi en az 3 enzimi hedef aldıklarından dolayı belirli hastalık durumlarında rapamisin ve analogları gibi tek hedefli inhibitörlere karşı avantajlı sayılmaktadırlar. Rapamisin ve analogları ile yalnızca mTORK1 etkinliğinin inhibisyonu, mTOR-S6K-IRS1 negatif *feedback* mekanizması nedeniyle PI3K etkinliğinde artma meydana getirebilmektedirler (204). Böylelikle, mTOR ve PI3K üzerine dual etkili inhibitörler, PI3K yolunun *feedback* mekanizmalar ile yeniden etkinleşmesini önlemek için yeterli olabilmektedirler.

2.2.4.3. Seçici mTORK1/2 İnhibitörleri

mTOR'nin katalitik bölgesi için ATP ile yarışan yeni nesil mTOR inhibitörleri mTOR üzerine potent ve seçici inhibitör etki göstermektedirler. Bu inhibitörler PP242, PP30, Torin1, Ku-0063794, WAY-600, WYE-687 ve WYE-354 molekülleridir. PI3K/mTOR dual etkili inhibitörlerden farklı olarak, mTORK1 ve mTORK2'yi diğer protein kinazları etkilemeden, seçici olarak inhibe etmektedirler. Bu bileşiklerin nanomolar düzeydeki konsantrasyonlarında mTORK1 ve 2'yi etkili bir şekilde inhibe ettiği S6K fosforilasyonu ve Akt'nin Ser⁴⁷³ bölgesinden fosforilasyonu kullanılarak gösterilmiştir. Rapamisin ile karşılaştırıldığında PP242 ve Torin1 primer hücrelerin proliferasyonunu çok daha yüksek bir dereceye kadar engellediği saptanmıştır. PP242 ve Torin1'in, rapamisinden daha etkili bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe etme özelliği, mTORK1'in yanında mTORK2'yi de inhibe etmesinin sonucu olduğu varsayılmaktadır (205-208).

Ku-0063794, WAY-600, WYE-687 and WYE-354, en son bildirilen ATP ile yarışmalı mTOR inhibitörleri olup mTORK1 ve mTORK2'yi etkili bir şekilde inhibe etmektedirler (207, 208).

2.2.4.4. Diyet Türevi Doğal Ürünler

Resveratrol, kurkumin, epigallocateşin gallat (*epigallocatechin gallate*, EGCG), genistein, 3,3-diindolmetan ve kafein gibi diyet-türevi doğal bileşikler, doğrudan veya dolaylı olarak mTOR sinyal ileti yolunu inhibe edebilmektedirler (209-216).

EGCG, yeşil çay içeriğinde de bulunan polifenolik bileşik, potent antioksidan etkiye sahiptir. Keloit fibroblast ve HMC-1 hücre kültüründe EGCG uygulaması Akt, S6K ve 4E-BP12'nin artan fosforilasyonunu konsantrasyona bağımlı olarak azaltmıştır (212).

Resveratrol, üzüm çekirdeği ve kırmızı şarapta bulunan, potansiyel antiinflamatuvar, antioksidan, nöroprotektif ve antikanser özelliği olan polifenolik bileşiktir (217). Resveratrol, insan U251 gliom hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR aracılı sinyal ileti yolunu baskılamakta ve rapamisin ile kombine edildiğinde, resveratrol ile indüklenen hücre ölümünü artırmaktadır. Aynı zamanda düz kas hücrelerinde proaterojenik okside-LDL ile indüklenen PI3K/Akt/mTOR/S6K etkinliğini inhibe etmekte ve düz kas hücrelerinde belirgin bir şekilde DNA sentezini ve proliferasyonu baskılamaktadır (210, 211).

Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinin rizomundan elde edilen polifenolik bir bileşiktir. Kurkumin, antiproliferatif etkisini mTOR sinyal ileti yolunu inhibe ederek gösterebileceğine ilişkin bulgular gittikçe artmaktadır. Bu nedenle mTOR inhibitörlerinin yeni bir grubunu temsil etmektedir (218). Kurkumin'in, mTOR'den raptor (mTOR-raptor kompleksini destabilize ederek) proteinini ayırarak mTORK1 etkinliğinin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (209).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanı

Deneylerde 200-300 g ağırlığında ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda senkronize edilen 34 adet erişkin, erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezinden sağlanmıştır. Sıçanlara su ve yem kısıtlaması yapılmamıştır. Bu çalışmada sıçanlar üzerinde yapılan tüm deneysel işlemler için Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır (Kurulun 04/03/2014 tarihli ve 8 protokol numaralı kararı).

3.1.2. Sarf Malzemesi

β -Aktin için primer antikor (SC-47778, Santa Cruz, Amerika)

β -Gliserofosfat (G9891, Sigma, Amerika)

β -Merkaptoetanol (A1108, AppliChem, Almanya)

6-Keto Prostaglandin F_{1 α} ELISA Kit (515211, Cayman)

Akrilamit 4K çözeltisi (%30) (161-0157, Bio-Rad, Amerika)

Amonyum persülfat (A2941, AppliChem, Almanya)

Aprotinin (A2132, AppliChem, Almanya)

Asetik asit (64-197, Climax, Türkiye)

Ayırıcı cam (*spacer plate*) (1.0 mm) (165-3312, Bio-Rad, Amerika)

Benzamidin (B6506, Sigma, Amerika)

Bradford rejanı (B6916, Sigma, Amerika)

Bromfenol mavisi (A3640, AppliChem, Almanya)

Coomassie mavisi (1.12553, Merck, Almanya)

COX-2 proteini için primer antikor (SC-19999, Santa Cruz, Amerika)

Ditiyotreytol (A2948, AppliChem, Almanya)

DNA saklama kutusu (81 gözlü) (3122278, Greiner, Almanya)

Düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plakları (655160, Greiner, Almanya)

Lipopolisakkarit (*Escherichia coli* lipopolisakkaridi, O111:B4) (L4130, Sigma, Türkiye)

Enzim proteinlerini görüntüleme çözeltisi (*ECL prime western blotting detection reagents*) (RPN2236, Amersham, İngiltere)

Eppendorf tüp (0.5 ml) (667201, Greiner, Almanya)

Eppendorf tüp (1.5 ml) (616201, Greiner, Almanya)

Etanol (Riedel-de-Haën, Almanya)

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (A2937, AppliChem, Almanya)

Fenilmetansülfonilflorit (PMSF) (A0999, AppliChem, Almanya)

Filtre kağıdı (*blot absorbent filter paper, thin*) (162-0118, Bio-Rad, Amerika)

Fosforile S6 ribozomal proteini için primer antikor (#5364; Cell Signalling, Amerika)

Fosforile I κ B- α proteini için primer antikor (SC-7977, Santa Cruz, Amerika)

Fosforile NF- κ B p65 proteini için primer antikor (SC-33020, Santa Cruz, Amerika)

Gliserol (A2926, AppliChem, Almanya)

Glisin (A1067, AppliChem, Almanya)

HCl (100314, Merck, Almanya)

HEPES (A3724, AppliChem, Almanya)

I κ B- α proteini için primer antikor (SC-1643, Santa Cruz, Amerika)

iNOS proteini için primer antikor (610432, BD Transduction Lab., Amerika)

İzobütanol (A1150, AppliChem, Almanya)

KCl (1.04936, Merck, Almanya)

Kısa cam (*short plate*) (10.1 x 7.3 cm) (165-3308, Bio-Rad, Amerika)

Kriyopreservasyon tüpü (*Cryo's sterile, 1 ml, 12, 5/38 mm, skirt*) (3123278, Greiner, Almanya)

Kriyopreservasyon tüpü (*Cryo's sterile, 2 ml, 12, 5/38 mm, skirt*) (3122278, Greiner, Almanya)

Kültür plağı için yapışkanlı kapak (676001, Greiner, Almanya)
Löpeptin (L9783, Sigma, Amerika)
Metanol (1.06008, Merck, Almanya)
Molekül ağırlığı belirteci (*Rainbow marker, full-range*) (RPN 800E, Amersham, İngiltere)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (A1148, AppliChem, Almanya)
N-1-Naftiletildiamin dihidroklorür (NED) (N9125, Sigma, Amerika)
NaCl (1.06404, Merck, Almanya)
NF-κB p65 proteini için primer antikor (SC-8008, Santa Cruz, Amerika)
Nitroselüloz membran (*nitrocellulose membrane*) (162-0112, Bio-Rad, Amerika)
Nitrotyrosine ELISA Kit (HK501, Hycult, Hollanda)
Orto-fosforik asit (H₃PO₄) (100564, Merck, Almanya)
Otomatik pipet (100-1000 µl) (Socorex, İsveç)
Otomatik pipet (2-20 µl) (Socorex, İsveç)
Otomatik pipet (50-200 µl) (Socorex, İsveç)
Otomatik pipet (*Stepper 411, Adjustable Repeater Pipette*) (411.5000, Socorex, İsveç)
Pipet ucu (3686290, Greiner, Almanya)
Pipet Ucu (770291)
Pipet Ucu (mavi) (686290, Greiner, Almanya)
Pipet ucu (sarı) (3685290, Greiner, Almanya)
Polistiren tüp (15 ml) (188271, Greiner, Almanya)
Polistiren tüp (50 ml) (227261, Greiner, Almanya)
Ponceau S (A1405, AppliChem, Almanya)
Primer antikorlara özgü sekonder antikor (*goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4301, Amersham, İngiltere)
Primer antikorlara özgü sekonder antikor (*sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4201, Amersham, İngiltere)
S6 ribozomal proteini için primer (#2217; Cell Signalling, Amerika)
Serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye)

Sıçan (Wistar, Erkek, Türkiye)
Sığır serum albümini (SSA) (A7906, Sigma, Amerika)
Sıvı azot
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (A2263, AppliChem, Almanya)
Sodyum nitrit (S2252, Sigma, Amerika)
Sodyum ortovanadat (A2196, AppliChem, Almanya)
Sodyum pirofosfat (A2197, AppliChem, Almanya)
Sülfanilamit (SA) (1.11799, Merck, Almanya)
Sülfosalisilik asit (A0416, AppliChem, Almanya)
TNF- α ELISA Kit (BMS622, Bendermed, Amerika)
Trikloroasetik asit (A1431, AppliChem, Almanya)
Tris (A2264, AppliChem, Almanya)
Tris baz (A2264, AppliChem, Almanya)
Tween 20 (A4974, AppliChem, Almanya)
Yağsız kurutulmuş süt tozu (YKST) (*non-fat dry milk*) (A0830, AppliChem, Almanya)

3.1.3. Teçhizat

- Çalkalayıcı (*red rotor orbital shaker*) (PR500-176, Hoefler, Almanya)
- Çalkalayıcı (*Rocker-shaker*) (MR-12, Biosan, Letonya)
- Derin dondurucu (dik tip, -80 °C) (Ilshin, Kore)
- Derin dondurucu (dikey, 240 L, -20 °C) (2041 ND, Arçelik) (1 adet)
- Derin donduruculu buzdolabı (Model 1060 T, Arçelik, Türkiye)
- Derin donduruculu buzdolabı (Model 4240 T FH, Arçelik, Türkiye)
- Elektroforez sistemi (*mini-protean tetra 1 mm*) (165-8001, Biorad, Amerika)
- Güç desteği (*power supply*) (*EV 265 consort power supply, 230 VAC*) (PS265-230V, Hoefler, Almanya)
- Hassas terazi (Model APX 200, Denver, Almanya)
- Homojenizatör (Ultra-Turrax, T25, Ika, Almanya)
- Jel dökümantasyon ve analiz sistemi (*EC3-CHEMI HR imaging system*) (Ultra-Violet Products, UVP, İngiltere)
- Kan basıncı kayıt sistemi ve ısıtıcılı bölme (*Indirect Blood Pressure Recorder System*, Model BPHR 9610, Commat İletişim Ltd., Türkiye)
- Kesintisiz güç kaynağı (AC/DC, 1 kVA)
- Kesintisiz güç kaynağı (AC/DC, 3 kVA)
- Manyetik karıştırıcı (*BOE 8056500 magnetic stirrer*) (MMS-3000, ACAdapter 220V, Boeco, Almanya)
- pH metre (Orion 3 Star, Thermo, Amerika)
- Plak okuma cihazı (405, 450, 490, 550 ve 630 nm olmak üzere beş adet filtrelili) (ELX800, Biotek, Türkiye)
- Sıvı azot tankı (2 L) (Isotherm, Almanya)
- Sıvı azot tankı (21.5 L) (TR 21, Air Liquide, Fransa)
- Soğutmalı santrifüj (Model Mikro 22R, Hettich, Almanya)
- Soğutmalı Santrifüj (Model H1850R, Cence, Almanya)
- Tarak (*Comb*) (10 wells, 1 mm) (165-3365, Bio-Rad, Amerika)
- Ultrasonik banyo (ısıtmalı, frekans ayarlı) (Elmasonic S 40 / (H), Elma, Almanya)
- Üstten kefeli terazi (Model SPB 52, Scaltec, Almanya)

Yarı-kuru transfer birimi (*TE 77X semi-dry transfer unit*) (TE77X, Hoefer, Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. *In Vivo* Çalışmalar

LPS uygulanmasının ardından oluşan hipotansiyon ve enflamasyon durumlarında mTOR'nin rolünü araştırmak amacıyla aşağıdaki deney grupları belirlenmiş ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır:

Grup 1. Serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) (n= 8)

Grup 2. LPS (10 mg/kg, i.p.) (219) (septik şok grubu) (n= 8)

Grup 3. Serum fizyolojik+Rapamisin (1 mg/kg, i.p.) (n= 8)

Grup 4. LPS+Rapamisin (n= 8)

Ortalama arter basıncı (OAB) ve kalp hızı (KH) ölçümleri için, invazif olmayan bir yöntem olan ve sıçanların kuyruğundan ölçüm yapılmasına olanak veren *tail-cuff* kan basıncı kayıt sistemi kullanılmıştır. Sıçanlara serum fizyolojik veya LPS enjeksiyonundan hemen önce (0. saat) ile serum fizyolojik veya LPS enjeksiyonundan sonraki 1., 2., 3. ve 4. saatlerde OAB ve KH kayıtları alınmıştır.

Rapamisinin etkili dozunu belirlemek amacıyla yapılan ön deneylerde 0.1, 0.3, 1, 3 ve 10 mg/kg doz aralığı belirlenmiştir ve yapılan ön deneyler sonucunda, 1 mg/kg hipotansiyonu geri çeviren en düşük etkili doz olarak tespit edilmiştir. Rapamisin, serum fizyolojik veya LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır ve ardından 1., 2. ve 3. saatlerde OAB ve KH kayıtları alınmıştır.

OAB ve KH kayıtları alınan sıçanların başları sert bir zemine hızla vurularak sersemletildikten sonra boyunlarından kanatılarak ötanazi işlemi yapılmasının ardından, kan, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterleri izole edilmiştir. Alınan kanlar oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletildikten sonra cam bir baget yardımıyla

defibrinize edildikten sonra +4°C'de 23.910 x g'de 15 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum örnekleri nitrit düzeyleri ölçülmesine dek *ependorf* tüpler içerisinde -20°C'de dondurularak saklanmıştır. İzole edilen dokular ise kriyoprezervatif tüpler içine alınıp sıvı azot ile muamele edildikten sonra nitrit, 6-keto-PGF_{1α}, nitrotirozin, TNF-α ve toplam protein düzeyleri ile MPO etkinliği, ayrıca ribozomal protein S6, fosforile ribozomal protein S6, IκB-α, fosforile IκB-α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, iNOS, COX-2 ve aktin protein ekspresyon düzeylerinin ölçümü amacı ile doku homojenatları hazırlanincaya kadar -80°C'de dondurularak saklanmıştır.

3.2.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması, Dokuların Homojenize Edilmesi ve Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması

Toplanan kanlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra cam bir baget yardımı ile defibrinize edilip, 23.910 x g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir (219). Santrifüj işleminin ardından elde edilen serum örnekleri kullanıncaya dek -20°C'de *ependorf* tüplerde dondurularak saklanmıştır. -80°C'de dondurulmuş dokular porselen havan içerisinde sıvı azot ile dondurulup toz haline getirildikten sonra üzerine kalp ve böbrek için 2 ml, TA ve SMA için 1 ml HEPES tamponu (mM: HEPES 20 [pH 7.5], β-gliserofosfat 20, sodyum pirofosfat 20, benzamidin 10, ditiyotreitil 1, sodyum ortovanadat 0.2, sodyum florür 20, EDTA 2, löpeptin 20 ve aprotinin 10) eklenerek örnekler homojenize edilmiştir (219).

Homojenatlar 23.910 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar toplanmış, üzerlerine kalp ve böbrek gibi görece büyük dokular için 100 µl, TA ve SMA gibi görece küçük dokular için ise 50 µl tris (50 mM, pH 8.0)+KCl (0.5 M) çözeltisi eklenmiştir. Bunu takiben, homojenatlar ardarda iki kez 15 saniye su banyosu sonikatöründe bekletilmiş ve 4°C'de, 23.910 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Homojenizasyon işlemi sırasında kullanılan bütün çözeltiler aynı gün içerisinde taze olarak hazırlanmıştır. Homojenizasyon işlemi ile elde edilen doku

homojenatı süpernatantları 100 µl'lik hacimlerde kriyoprezervatif tüplere bölünmüş ve ölçümler yapıncaya dek -80°C 'de dondurularak saklanmıştır.

3.2.3. Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi

Doku homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda toplam protein miktarı Coomassie mavisi yöntemi ile ölçülmüştür (219, 220). Standart protein olarak SSA kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan SSA'nın %1 ağırlık/hacim (a/h) derişimde olacak biçimde taze distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, 0'dan 50 µl'ye kadar 5'er µl aralıklarla SSA içeren seri dilüsyonları (0-50 µg/ml) hazırlanmış ve toplam hacimleri distile su ile 800 µl'ye tamamlanmıştır. Protein miktarı ölçülecek olan örnekler için, doku homojenatlarından elde edilen süpernatanttan 5 µl alınıp, üzerine 795 µl distile su eklenerek 800 µl hacimde çözeltiler hazırlanmıştır. 800 µl'lik bu çözeltilerin üzerine 200 µl Bradford reajanı eklenmiştir. 1 ml hacimde hazırlanmış olan stok ve örnek çözeltilerinden 100'er µl alınarak (tüm çözeltilerinden iki kez olmak üzere) kültür plağına pipet ile aktarılmıştır. Örneklerin 630 nm'de verdikleri absorbanslar ELISA okuyucuda okunmuştur. Derişimleri bilinen stok çözeltilerin derişimlerine karşı elde edilen absorbanslarından yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, SSA'nın kalibrasyon doğru denklemi oluşturulmuştur. Bu denklem üzerinden, örneklerin absorbans değerleri ile toplam protein miktarları hesaplanarak bulunmuştur.

3.2.4. Serum ve/veya Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Nitrit, 6-keto-PGF_{1α}, Nitrotirozin ve TNF-α Düzeyleri ile MPO Etkinliğinin Ölçülmesi

Serumda ve doku homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda iNOS enziminin etkinliğinin bir göstergesi olarak nitrit düzeyleri, ortamda nitrit varlığında oluşan pembe rengin spektrofotometrik olarak 550 nm'de ölçülmesi prensibine dayanan diazotizasyon yöntemi (Griess reaksiyonu) ile ölçülmüştür (221, 222). Serum örnekleri ölçümden

hemen önce 1:5 oranında taze distile su ile seyreltilmiştir. Standart olarak sodyum nitrit kullanılmıştır ve sodyum nitritin 2 mM konsantrasyonda distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, 1 ml hacimde seri dilüsyonlar (0.25-100 µM) hazırlanmıştır. Bu çözeltiler ile serum ya da doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlardan alınan 25 µl örnek, 25 µl SA (12,5 µl) ve NED (12,5 µl) reaktifi ile düz tabanlı 96 kuyucuklu kültür plağında karıştırılmıştır. Plak oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra standart ve örneklerin verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda 550 nm'de okunmuştur. Derişimleri bilinen sodyum nitritin stok çözeltilerinde derişime karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, sodyum nitritin kalibrasyon doğru denklemi oluşturulmuştur. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerin okunan absorbans değerlerinden nitrit derişimleri hesaplanmıştır.

ELISA kiti kullanılarak indüklenebilir bir enzim olan COX-2 enziminin etkinliğinin bir göstergesi olarak 6-keto-PGF_{1α}, doku zedelenmesine neden olan peroksinitritin oluşumunun bir göstergesi olarak nitrotirozin ve güçlü bir proenflamatuvar sitokin olan TNF-α düzeyleri kit prospektüslerinde önerilen biçimde ölçülmüştür.

Enflamasyonun ve doku zedelenmesinin bir göstergesi olarak kabul edilen MPO etkinliği Golowich ve ark.'nın geliştirmiş oldukları yöntemle göre ölçülmüştür. Hidrojen peroksitin doku homojenatı tarafından oksitlenerek o-dianozidini indirgemesi ve indirgenmiş olan o-diazonidininin 410 nm'de vermiş olduğu absorbansın ölçülmesi prensibine dayanan spektrofotometrik yöntem ile MPO etkinliği ölçülmüştür (223).

3.2.5. Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Ribozomal Protein S6, Fosforile Ribozomal Protein S6, IκB-α, Fosforile IκB-α, NF-κB p65, Fosforile NF-κB p65, iNOS, COX-2 ve Beta Aktin Protein Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Dokularda ribozomal protein S6, fosforile ribozomal protein S6, IκB-α, fosforile IκB-α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, iNOS, COX-2 ve β-aktin protein ekspresyonları daha önce tanımlanan yöntemlere göre ölçülmüştür (224). Çalışmalarda alt jel olarak 6.7 ml %30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 5 ml tris çözeltisi (1.5 M, pH 8.8), 0.2 ml %10'luk SDS çözeltisi, 7.9 ml distile su, 0.2 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.008 ml TEMED, üst jel olarak da 1.7 ml %30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 1.25 ml tris çözeltisi (1 M, pH 6.8), 0.1 ml %10'luk SDS çözeltisi, 6.8 mL distile su, 0.1 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.01 ml TEMED kullanılmıştır. Üst jelde oluşturulan çukurlardan birinci çukura 5 µL molekül ağırlığı belirteci, onuncu çukura 10 µl Laemmler örnek tamponu, diğer çukurlara ise 30 µl örnek eklenmiştir. Elektroforez tampon çözeltisi olarak 500 ml distile su içinde 15 g tris, 72 g glisin ve 5 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında seyreltilerek pH değeri 8.3'e ayarlanmıştır.

40 µl HEPES tamponu içinde 100 µg toplam protein ve 5 µl Laemmler örnek tamponu (5 ml tris çözeltisi [0.5 M, pH 6.8], 4 ml gliserol, 40 mg bromfenol mavisi, 0.8 g SDS ve 0.8 ml β-merkaptoetanol 10 ml distile su içinde) içeren doku homojenatlarından hazırlanan ve -80°C'de dondurulmuş olan süpernatantlar çözündükten sonra 2 dakika kaynar su içinde bekletilmiş, 4°C'de 23.810 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, 30 µl'de kalp ve böbrek için 129 µg; torasik aort için 90 µg; süperiyor mezenterik arter için 75 µg toplam protein olacak biçimde üst jelde oluşturulan kuyucuklara eklenmiş ve %10 SDS-poliakrilamit jel elektroforez yöntemi ile yaklaşık olarak 2 saatlik bir sürede molekül büyüklüklerine göre ayrılmıştır.

Jelde molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler yarı-kuru aktarma (*semi-dry transfer*) yöntemi ile nitroselüloz membrana aktarılmıştır. Bu işlem için 80 ml distile su içinde 0.58 g tris, 0.29 g glisin ve 0.037 g SDS içeren ve pH'si 8.3'e ayarlanmış transfer

çözelti hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce üzerine 20 ml metanol (%20) eklenmiştir

Jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için jeller, proteinleri özgül olmayan bir biçimde geri dönüşümsüz olarak bağlayan Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanmıştır (225). Coomassie mavisi çözeltisi (1 litre distile su içinde 0.25 g Coomassie *brilliant blue* R 250, 400 ml metanol ve 70 ml asetik asit) içinde 4°C'de 12 saat inkübe edilen jeller, boyasızlaştırma çözeltisi I (*destaining solution I*) (20 ml metanol, 3.5 ml asetik asit ve 26.5 ml distile su) içinde 30 dakika inkübe edildikten sonra, boyasızlaştırma çözeltisi II (*destaining solution II*) (3.5 ml asetik asit, 2.5 ml metanol, 44 ml distile su ve 0.5 ml gliserol) içinde inkübe edilmiştir. Jelin zeminindeki mavi renk açılıncaya dek boyasızlaştırma çözeltisi II 1 veya 2 kez değiştirilmiştir. Bununla birlikte, jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için kullanılan bir diğer yöntem de Ponceau S boyama yöntemidir. Membranlar, proteinleri geri dönüşümlü olarak bağlayan Ponceau S boyası (100 ml distile su içinde 2 g Ponceau S, 30 g trikloroasetik asit, 30 g sülfosalisilik asit ile hazırlanan stok çözeltiden 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir) ile boyanmış ve ardından distile su ile yıkanmıştır (226).

Proteinlerin jelden membrana aktarımının sağlandığı görüldükten sonra, membranlar TTÇ (3 g tris, 8 g NaCl, 2 g KCl ve 0.5 mL *Tween* 20 [%0.05] 1 litre distile su içinde, pH 7.4) ile yıkanmıştır. YKST içeren TTÇ ile membranlar bloke edilmiş ve ekspresyonu araştırılacak olan proteine özgü primer antikolar ile 4°C'de *overnight* (12 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Membranlar üzerindeki proteinlere bağlanmamış olan antikolar 3 kez 5 dakika TTÇ ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bunu takiben membranlar, primer antikolara özgü sekonder antikolar ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir ve ardından 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkanmışlardır. Bazı deneylerde kullanılan membranlar, 3 kez 5 dakika TTÇ ile yıkandıktan sonra, %2 YKST + %2 SSA karışımı ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiş, 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkanmış ve β -aktin protein için primer ve sekonder antikolar ile inkübe edilmeye hazır duruma getirilmiştir. β -aktin, hazırlanan protein lizatlarının jelle eşit miktarlarda yüklenip yüklenmediğini kontrol etmek için kullanılmıştır.

Protein bantlarının görelî ekspresyonu dansitometrik analiz yapan *Image J* programı ile hesaplanmıştır. Dansitometrik analizlerde β -aktin düzeyleri standart olarak kullanılmış ve sonuçlar kontrol grubunun yüzdesi olarak hesaplanmış ve bu şekilde grafiklere aktarılmıştır.

3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. Kullanılan sıçan sayısı *n* ile ifade edilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek-yönlü varyans analizi (*analysis of variance*; ANOVA) ve ardından *Student-Newman-Keuls* çoklu karşılaştırmalar testi veya *Kruskal-Wallis* testi ve ardından *Dunns* çoklu karşılaştırmalar testi ile *Student t* testi veya *Mann-Whitney U* testleri kullanılmıştır. Bu testler *GraphPad Prism version 5.01 for Windows* (*GraphPad Software*, San Diego California USA, <http://www.graphpad.com>) programı kullanılarak yapılmıştır. İstatiksel olarak 0.05'ten küçük *P* değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *In Vivo* Çalışmalar

4.1.1. LPS'nin OAB ve KH Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS uygulanmasının ardından OAB ve KH'de 4 saat boyunca meydana gelen değişikliklere ilişkin elde edilen bulgular Çizelge 4.1 ile Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Kontrol grubundaki sıçanlarda serum fizyolojik enjeksiyonun ardından OAB ve KH değerleri 4 saat boyunca izlenmiştir ve 4 saat boyunca OAB ve KH değerlerinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir ($P > 0.05$). Öte yandan, septik şok grubundaki sıçanlarda LPS enjeksiyonun ardından, OAB, birinci saatten itibaren düşmeye başlamış ve 4 saat boyunca bu düşme devam etmiştir. OAB'deki azalmaya paralel olarak KH'de artma görülmüştür ($P < 0.05$). Rapamisinin çözücüsü olarak kullanılan %3.75 etanol içeren serum fizyolojik çözeltilisi sıçanların OAB ve KH değerlerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır (OAB: 125 ± 0.33 ; 125 ± 0.33 ; 125 ± 0.58 ; 124 ± 0.88 ve 124 ± 0.67 mmHg; KH: 311 ± 4.16 ; 314 ± 4.70 ; 314 ± 3.76 ; 312 ± 4.62 ve 312 ± 3.06 atım hızı/dakika, sırasıyla 0., 1., 2., 3. ve 4. saatler, $P > 0.05$).

OAB ve KH'de gözlenen bu değişiklikler ile LPS uygulanan sıçanlarda birinci saatten itibaren septik şok modelinin oluştuğu görülmektedir.

4.1.2. LPS ile Azalan OAB ve Artan KH Üzerinde Rapamisinin Etkisi

Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanan rapamisinin OAB ve KH üzerinde olan etkilerine ilişkin bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

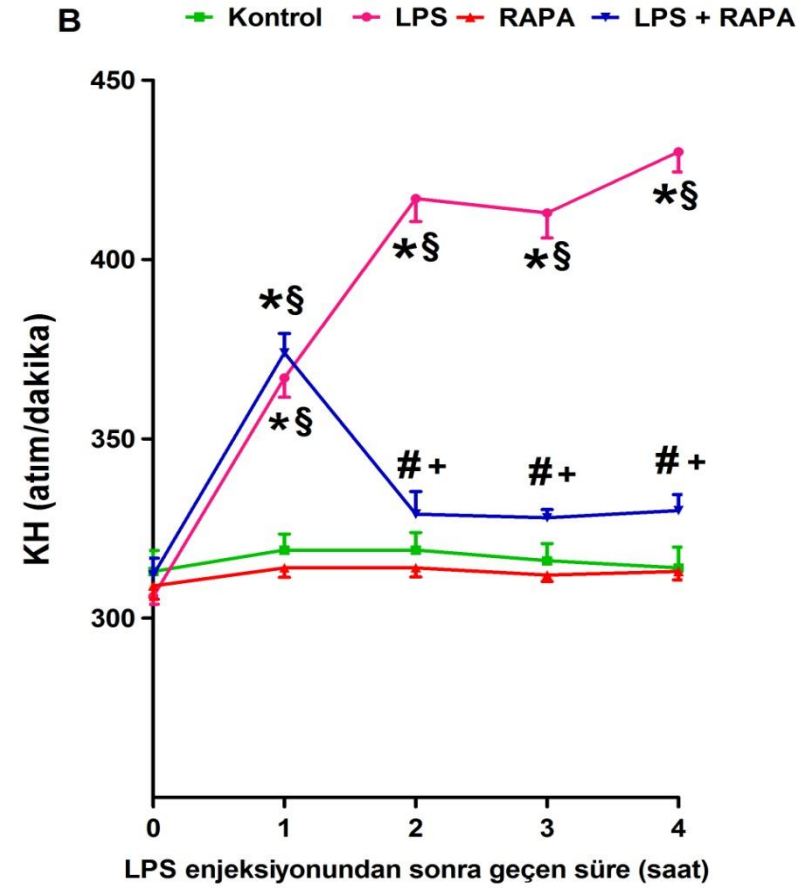
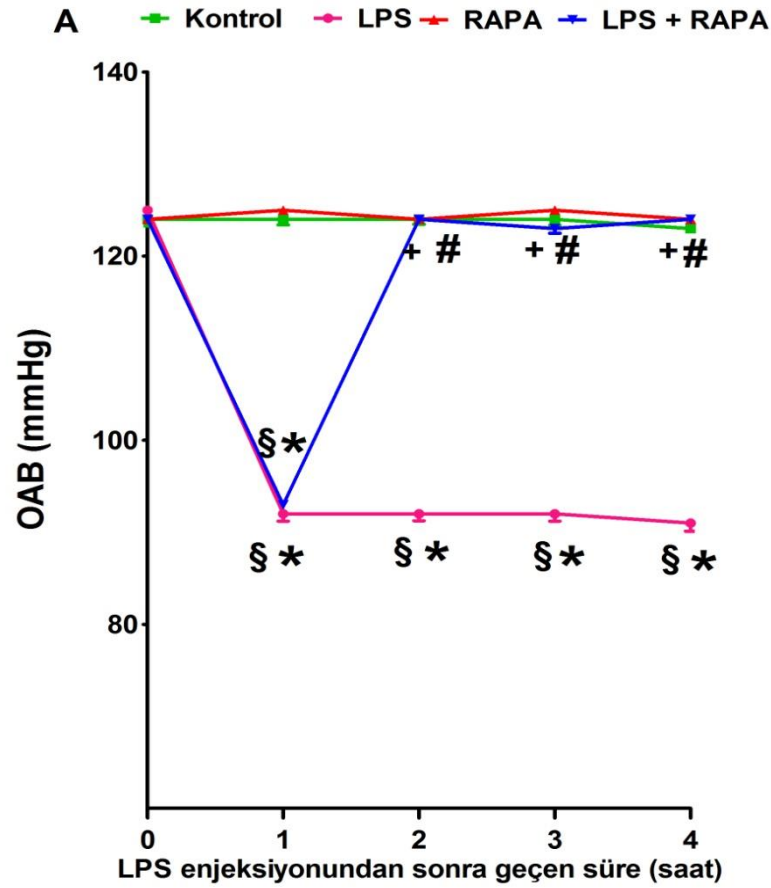
LPS uygulamasından 1 saat sonra OAB’de oluşan azalma ve KH’deki artma, rapamisin uygulanmasından sonraki birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). LPS birlikte rapamisin uygulanan gruptaki OAB ve KH değerleri, birinci saat dışında, kontrol ve rapamisin gruplarından farklı değildir ($P > 0.05$). Rapamisin tek başına uygulandığında OAB ve KH değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Elde ettiğimiz bu bulgular, LPS uygulamasından 1 saat sonra ortaya çıkan, OAB’deki azalma ve KH’deki artmaya mTOR’nin katkısının olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanlarda LPS ve/veya rapamisinin OAB ve KH üzerindeki etkisi.

	LPS uygulanmasından sonra geçen süre (saat)				
	0	1	2	3	4
Kontrol					
OAB	124±0.73 (n= 8)	124±0.59 (n= 8)	124±0.53 (n= 8)	124±0.63 (n= 8)	123±0.46 (n= 8)
KH	313±5.88 (n= 8)	319±4.43 (n= 8)	319±4.84 (n= 8)	316±4.79 (n= 8)	314±5.77 (n= 8)
LPS					
OAB	125±0.46 (n= 8)	92±0.78 ^{*0} (n= 8)	92±0.74 ^{*0} (n= 8)	92±0.78 ^{*0} (n= 8)	91±0.87 ^{*0} (n= 8)
KH	306±2.09 (n= 8)	367±5.43 ^{*0} (n= 8)	417±6.38 ^{*0} (n= 8)	413±6.99 ^{*0} (n= 8)	430±5.61 ^{*0} (n= 8)
RAPA					
OAB	124±0.30 (n= 8)	125±0.22 (n= 8)	124±0.27 (n= 8)	125±0.38 (n= 8)	124±0.31 (n= 8)
KH	309±3.74 (n= 8)	314±2.64 (n= 8)	314±2.55 (n= 8)	312±1.78 (n= 8)	313±2.31 (n= 8)
LPS+RAPA					
OAB	124±0.46 (n= 8)	93±0.45 ^{*0} (n= 8)	124±0.44 ^{#+} (n= 8)	123±0.49 ^{#+} (n= 8)	124±0.30 ^{#+} (n= 8)
KH	312±4.73 (n= 8)	374±5.39 ^{*0} (n= 8)	329±6.29 ^{#+} (n= 8)	328±2.25 ^{#+} (n= 8)	330±4.42 ^{#+} (n= 8)

RAPA, Rapamisin; KH, kalp hızı; LPS, lipopolisakkarit; OAB, ortalama arter basıncı. RAPA (1 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım/dakika olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı ($P < 0.05$). ⁰ 0. ve ⁺ 1. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı ($P < 0.05$) (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman Keul çoklu karşılaştırmalar testi).



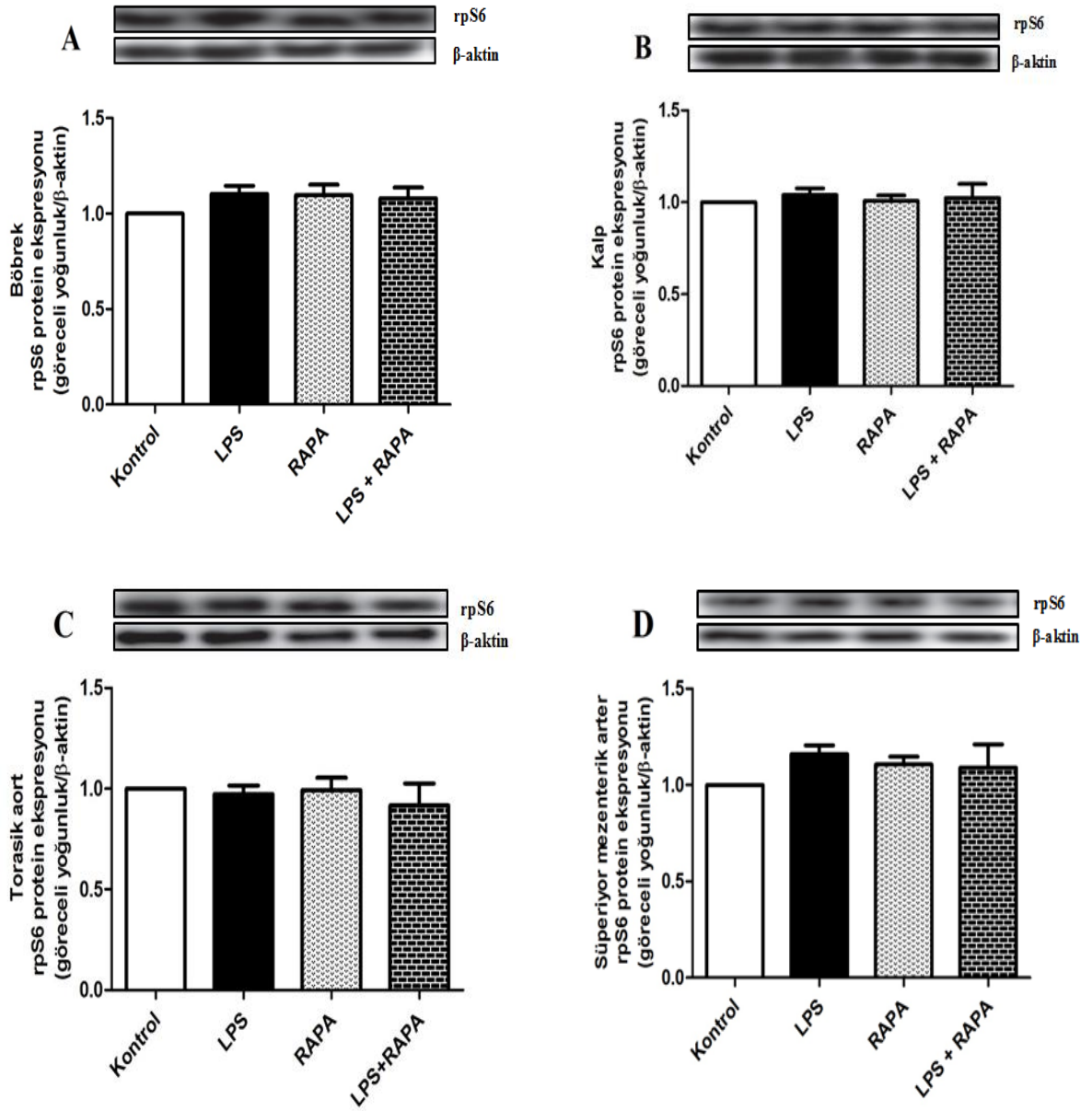
Şekil 4.1. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanlarda rapamisinin (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi. RAPA (1 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım/dakika olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir (n=8). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; $P < 0.05$). ^θ 0. ve ⁺ 1. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; $P < 0.05$).

4.2. LPS ve/veya Rapamisinin rpS6 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi

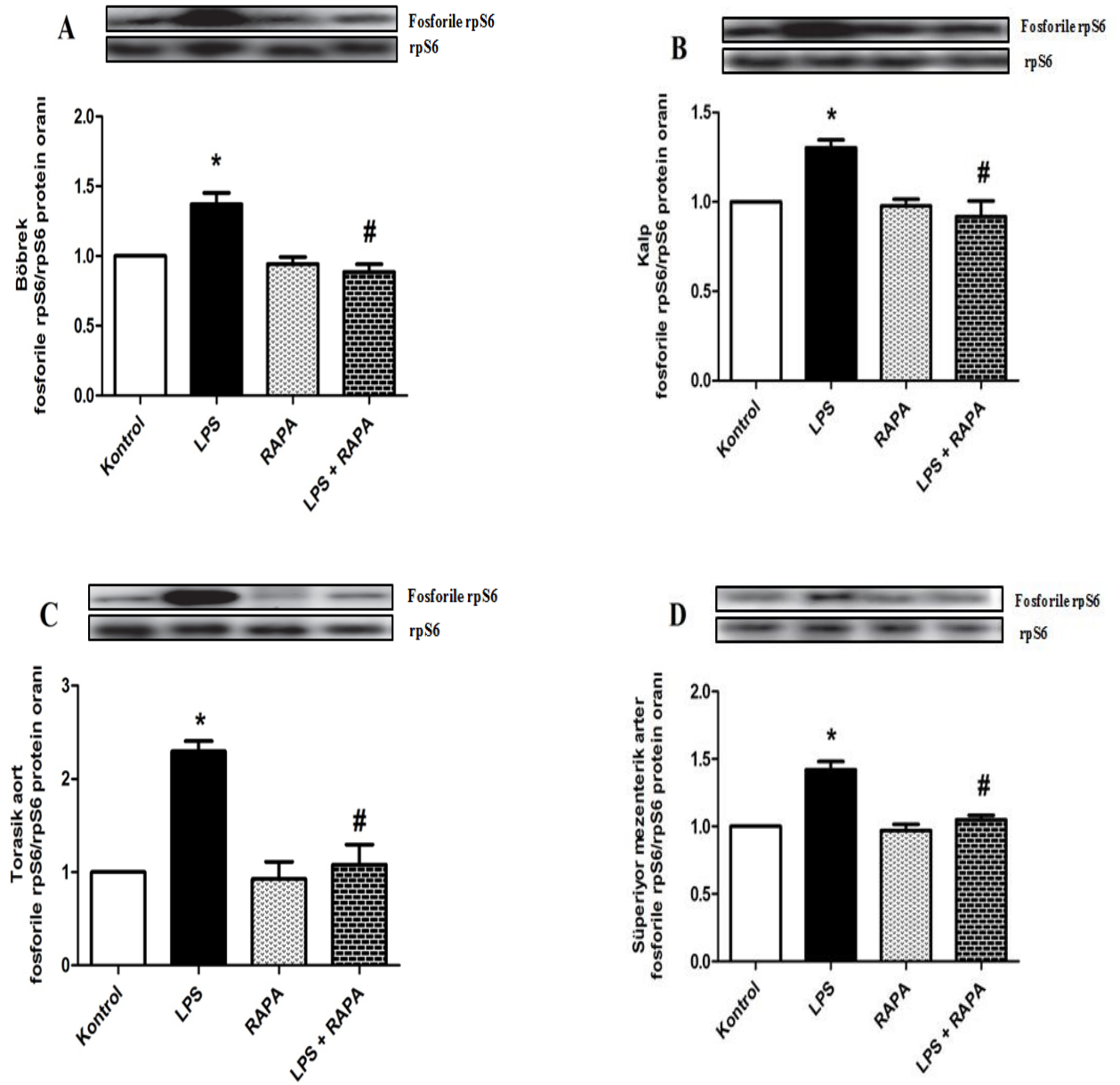
Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aorta ve süperiyor mezenterik arterlerde rpS6 protein ekspresyonu ve fosforilasyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanlardan izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde rpS6 protein ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmezken ($P > 0.05$), fosforile rpS6/rpS6 protein oranında artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu fosforile rpS6/rpS6 protein oranındaki artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde rpS6 protein ekspresyonu ve fosforile rpS6/ rpS6 protein oranında herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde rpS6 protein ekspresyonunun değişmediğini, mTOR etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen rpS6 fosforilasyonunun arttığını ve LPS'nin neden olduğu rpS6 fosforilasyonundaki bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.2. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde rpS6 protein ekspresyonu üzerinde LPS ve/veya rapamisininin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



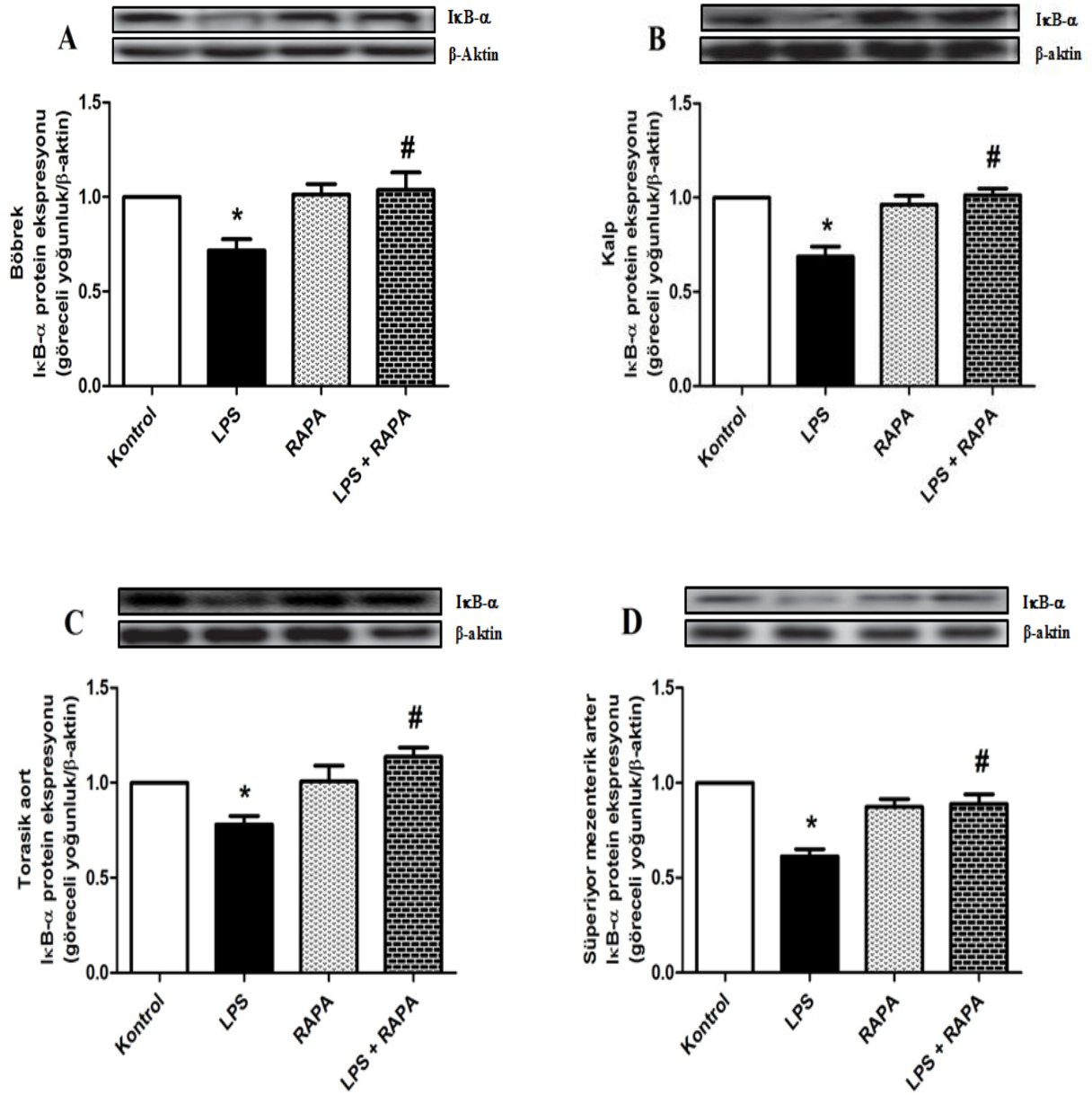
Şekil 4.3. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde rpS6 protein fosforilasyonu üzerinde LPS ve/veya rapamisininin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.3. LPS ve/veya Rapamisinin IκB-α Protein Ekspresyon ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi

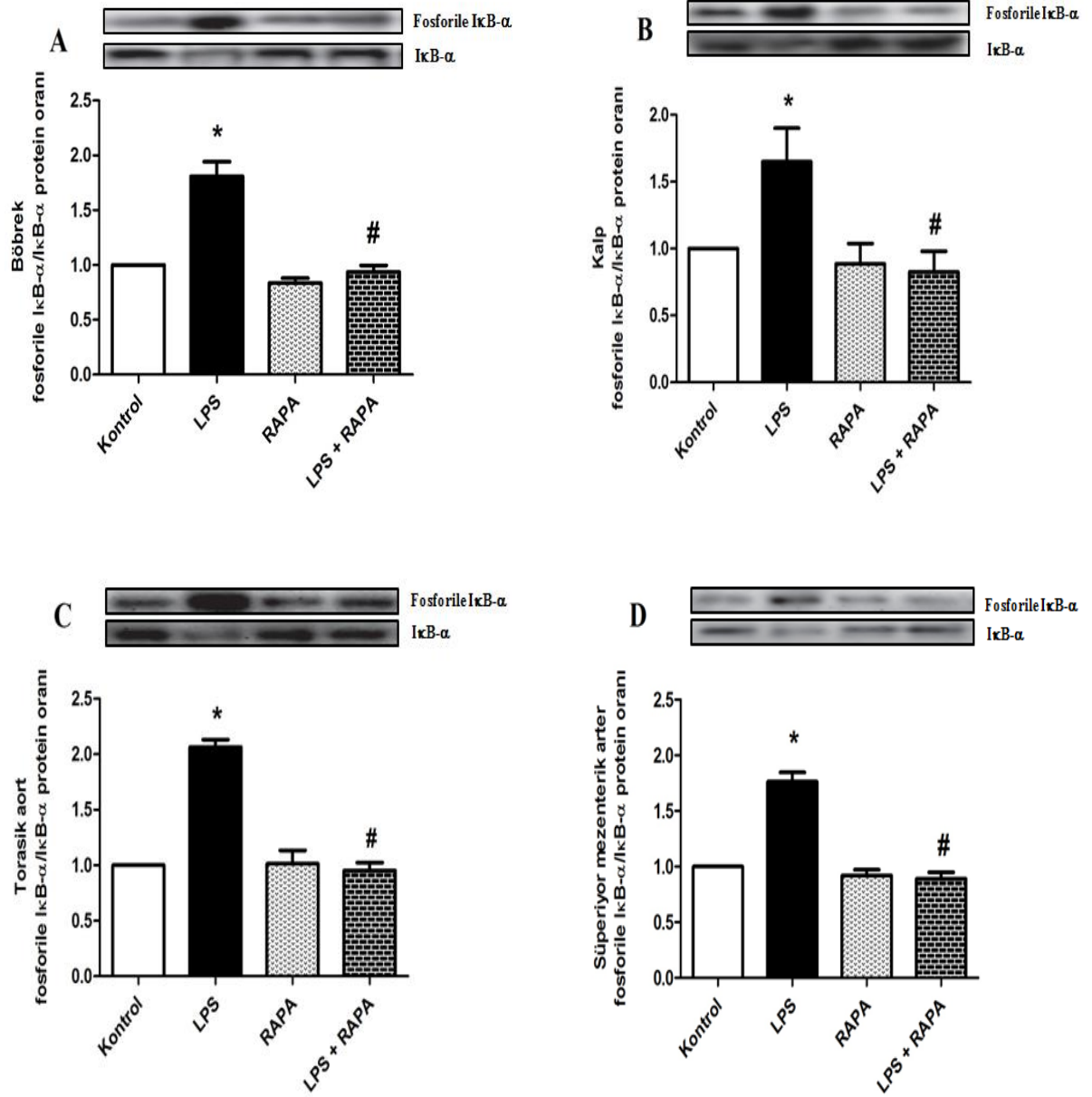
Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde IκB-α protein ekspresyonuna ilişkin bulgular Şekil 4.4'te, IκB-α fosforilasyonuna ilişkin bulgular ise Şekil 4.5'te verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde IκB-α protein ekspresyonu azalırken, fosforile IκB-α/IκB-α protein oranında artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu IκB-α protein ekspresyonundaki azalmayı ve fosforile IκB-α/IκB-α protein oranındaki artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein ekspresyonu ve fosforile IκB-α/IκB-α protein oranında herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein ekspresyonun azaldığını, IκB-α etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımız, LPS'nin neden olduğu IκB-α protein ekspresyonundaki azalmanın ve IκB-α etkinliğindeki artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.4. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde IκB-α protein ekspresyonu üzerinde LPS ve/veya rapamisininin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).



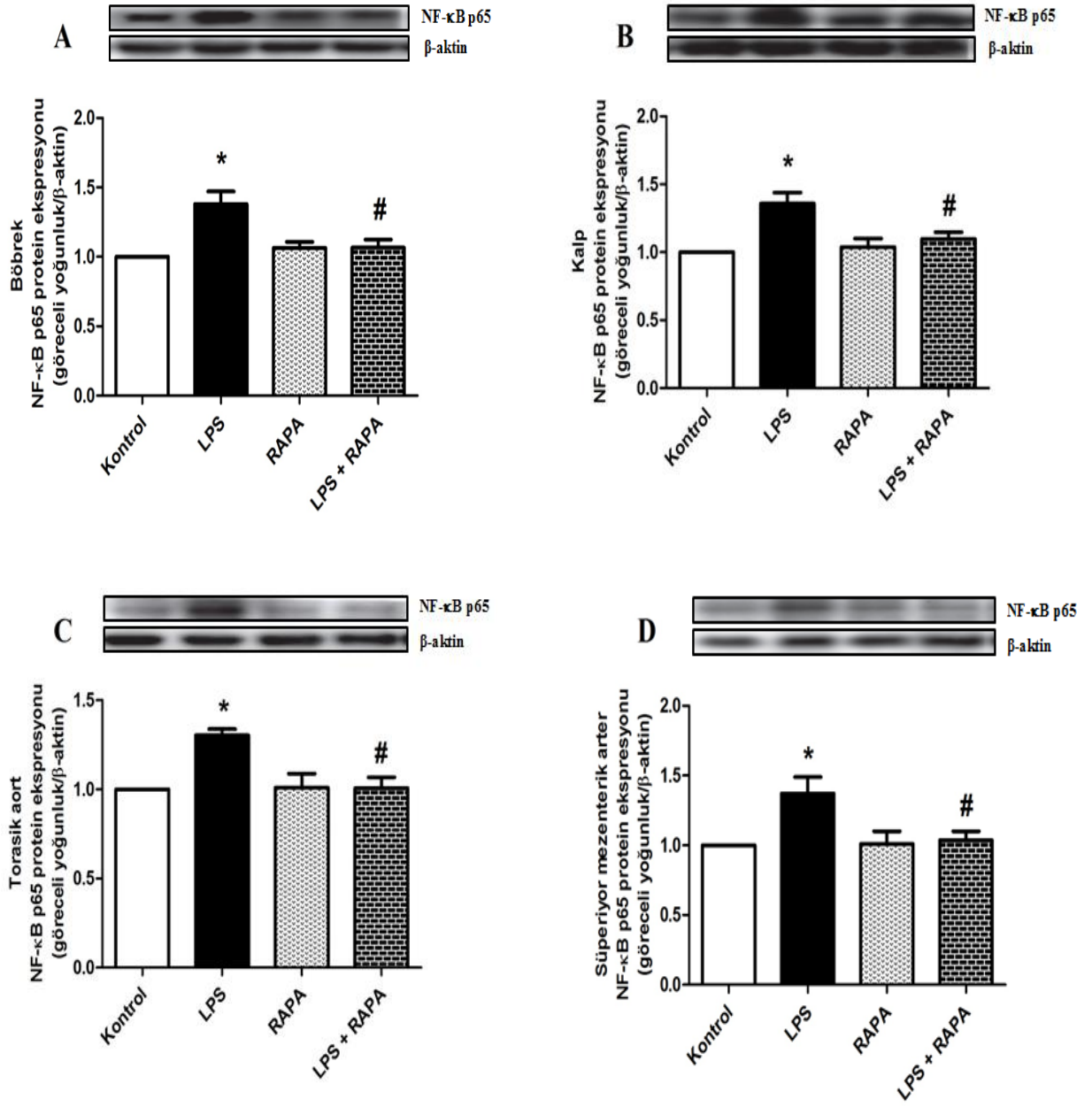
Şekil 4.5. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde IκB-α protein fosforilasyonu ve fosforile IκB-α/IκB-α üzerinde LPS ve/veya rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.4. LPS ve/veya Rapamisinin NF-κB p65 Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi

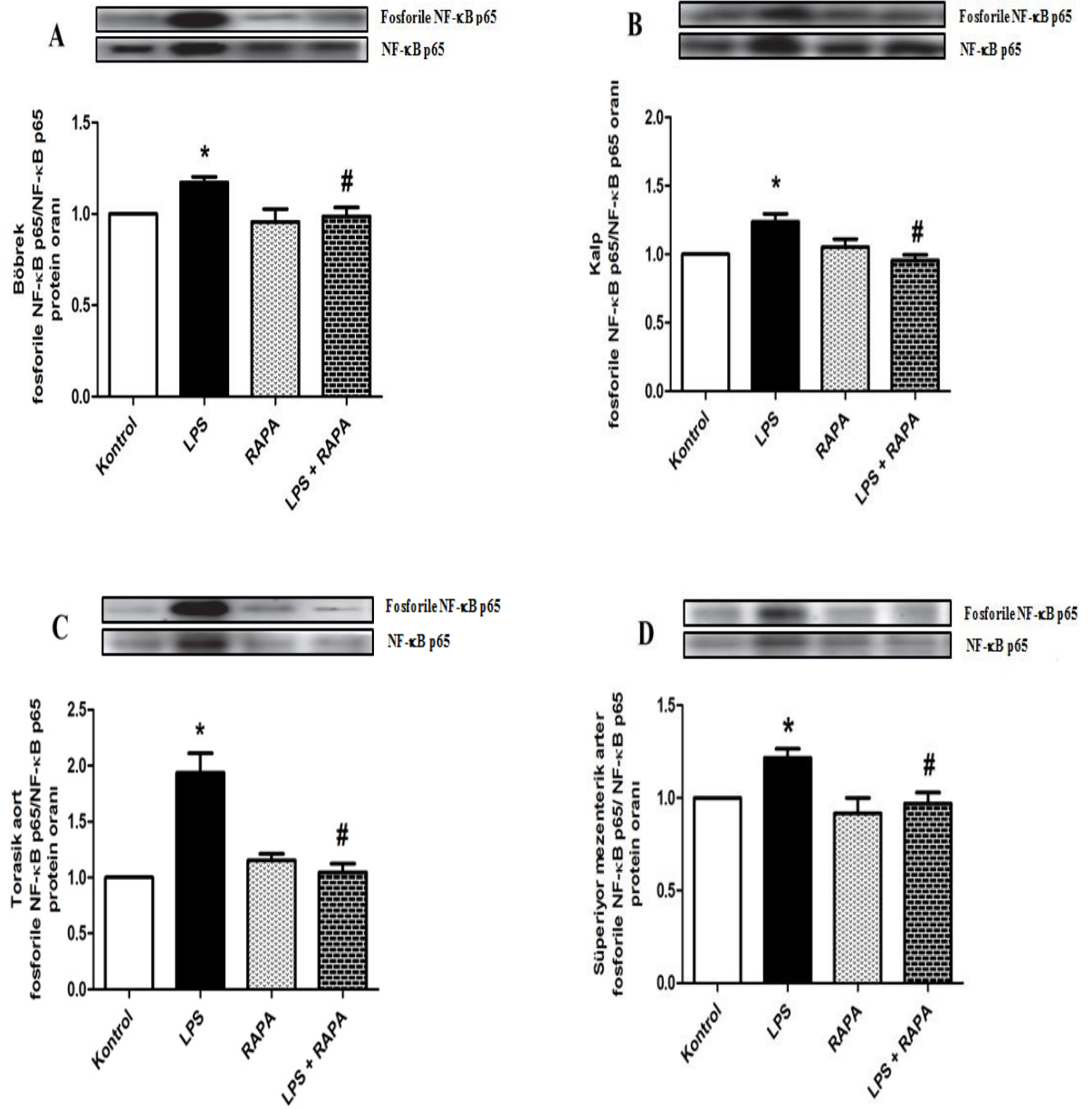
Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde NF-κB p65 protein ekspresyonuna ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.6'da, NF-κB p65 fosforilasyonuna ilişkin elde edilen bulgular ise Şekil 4.7'de verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde NF-κB p65 protein ekspresyonunda ve fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu NF-κB p65 protein ekspresyonu ve fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranındaki artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB p65 protein ekspresyonu ve fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB p65 ekspresyonu ve etkinliğinin arttığını ve LPS'nin neden olduğu NF-κB p65 ekspresyonu ve etkinliğindeki bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.6. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların böbrek (A), kalp (B), torasik aort (C) ve süperiyör mezenterik arterlerinde (D) NF-κB p65 protein ekspresyonu üzerinde LPS ve/veya rapamisininin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).



Şekil 4.7. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların böbrek (A), kalp (B), torasik aort (C) ve süperiyor mezenterik arterlerinde (D) NF-κB p65 protein fosforilasyonu ve fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranı üzerinde LPS ve/veya rapamisinin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

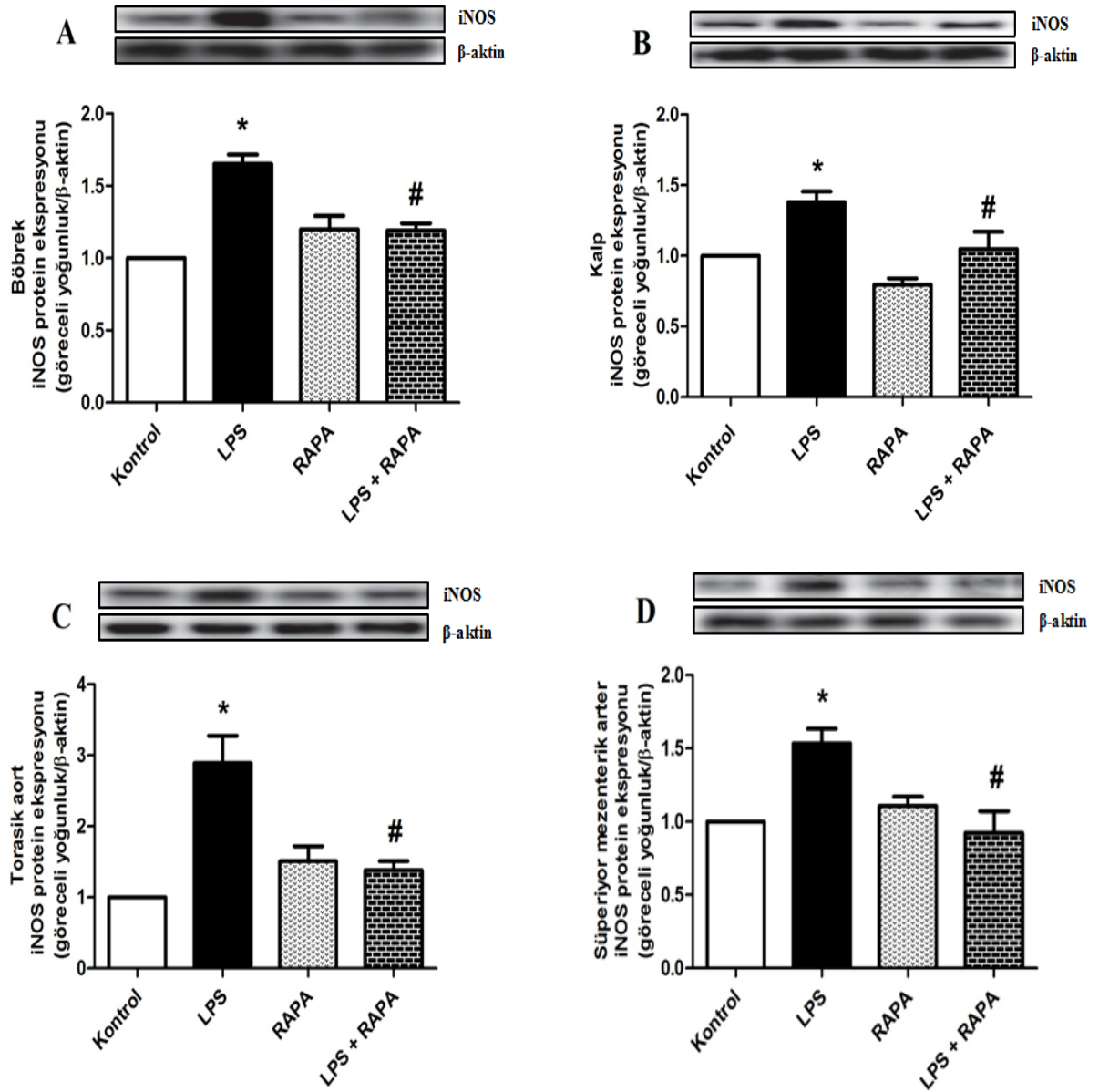
4.5. LPS ve/veya Rapamisinin iNOS Protein Ekspresyon ile Nitrit ve Nitrotirozin Düzeyi Üzerindeki Etkisi

4.5.1. LPS ve/veya Rapamisinin iNOS Protein Ekspresyon Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde iNOS enziminin protein ekspresyonuna ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.8'de verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanlardan izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde iNOS protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu iNOS protein ekspresyonundaki artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde iNOS protein ekspresyonunda herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde iNOS protein ekspresyonunun arttığını ve LPS'nin neden olduğu iNOS protein ekspresyonundaki bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



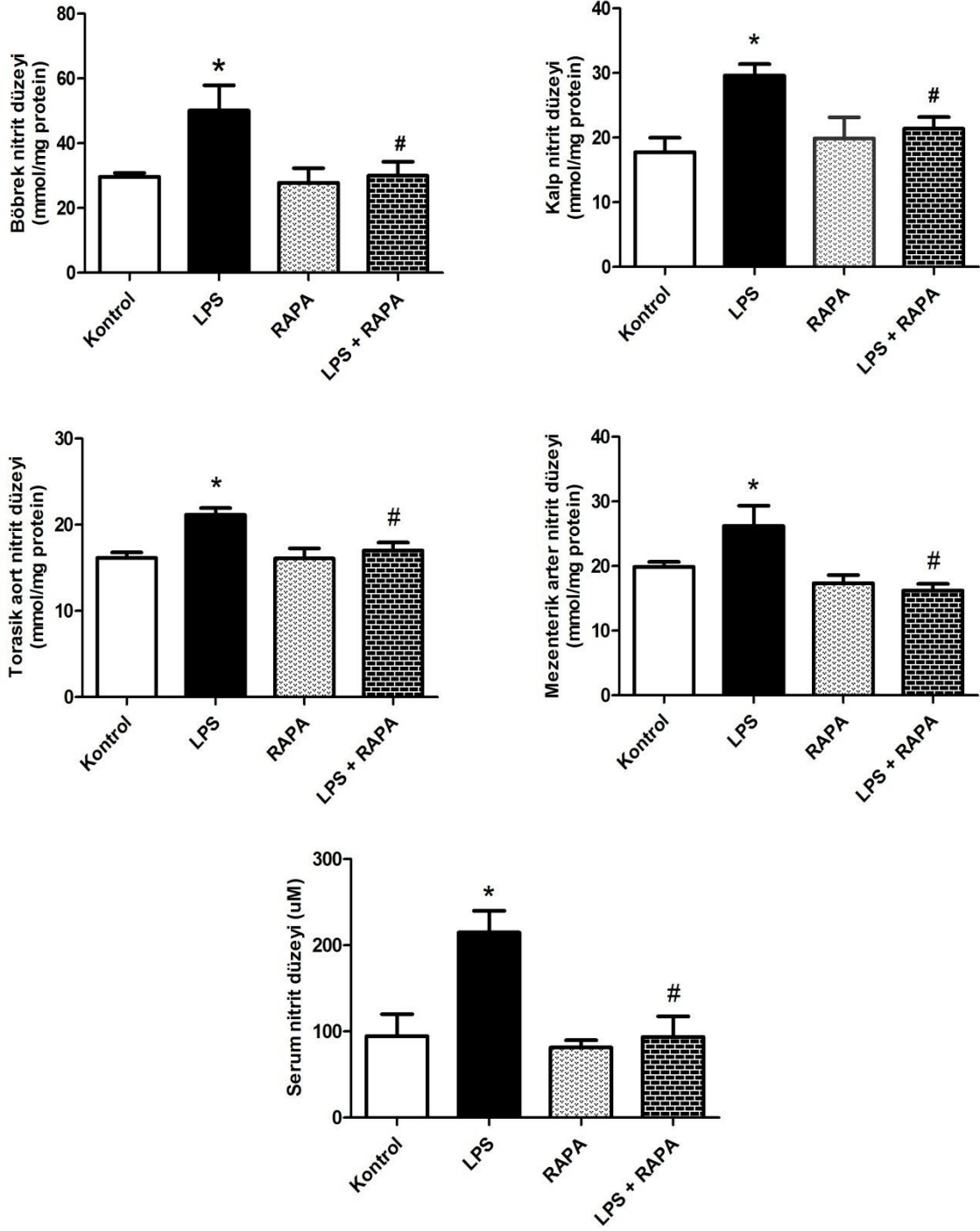
Şekil 4.8. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde iNOS protein ekspresyonu üzerinde LPS ve/veya rapamisin'in etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.5.2. LPS ve/veya Rapamisinin Serum ve Doku Nitrit Düzeyi Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte ayrılan serum, ve izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde nitrit düzeylerine ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.9'da verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların serum, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nitrit düzeylerinde artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu nitrit düzeylerindeki artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması serum, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nitrit düzeylerinde herhangi bir oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların kalp, böbrek, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde NO oluşumunun bir göstergesi olarak ölçülen nitrit düzeylerinin arttığını ve LPS'nin neden olduğu nitrit düzeylerinde bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



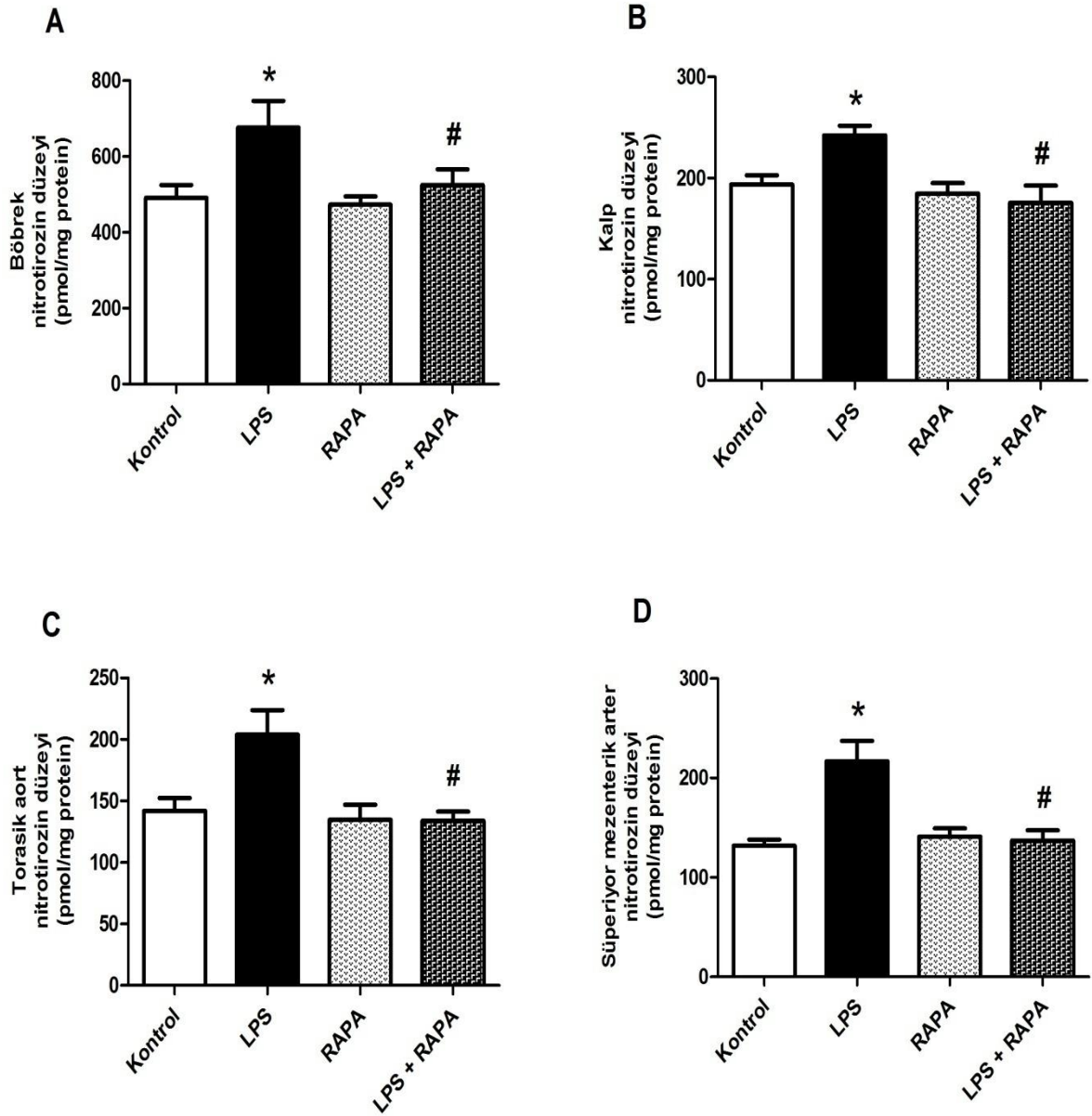
Şekil 4.9. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort, (D) süperiyör mezenterik arter ve (E) serumlarında nitrit düzeyleri üzerinde LPS ve/veya rapamisinin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların kanları, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri alınmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.5.3. LPS ve/veya Rapamisinin Doku Nitrotirozin Düzeyi Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde nitrotirozin düzeylerine ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.10'da verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanlardan izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde nitrotirozin düzeylerinde artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu nitrotirozin düzeylerindeki artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nitrotirozin düzeylerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde peroksinitrit oluşumunun bir göstergesi olarak ölçülen nitrotirozin düzeylerinin arttığını ve LPS'nin neden olduğu nitrotirozin düzeylerindeki bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde ölçülen nitrotyrosin düzeyleri üzerinde LPS ve/veya rapamisin'in etkisi. *Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).*

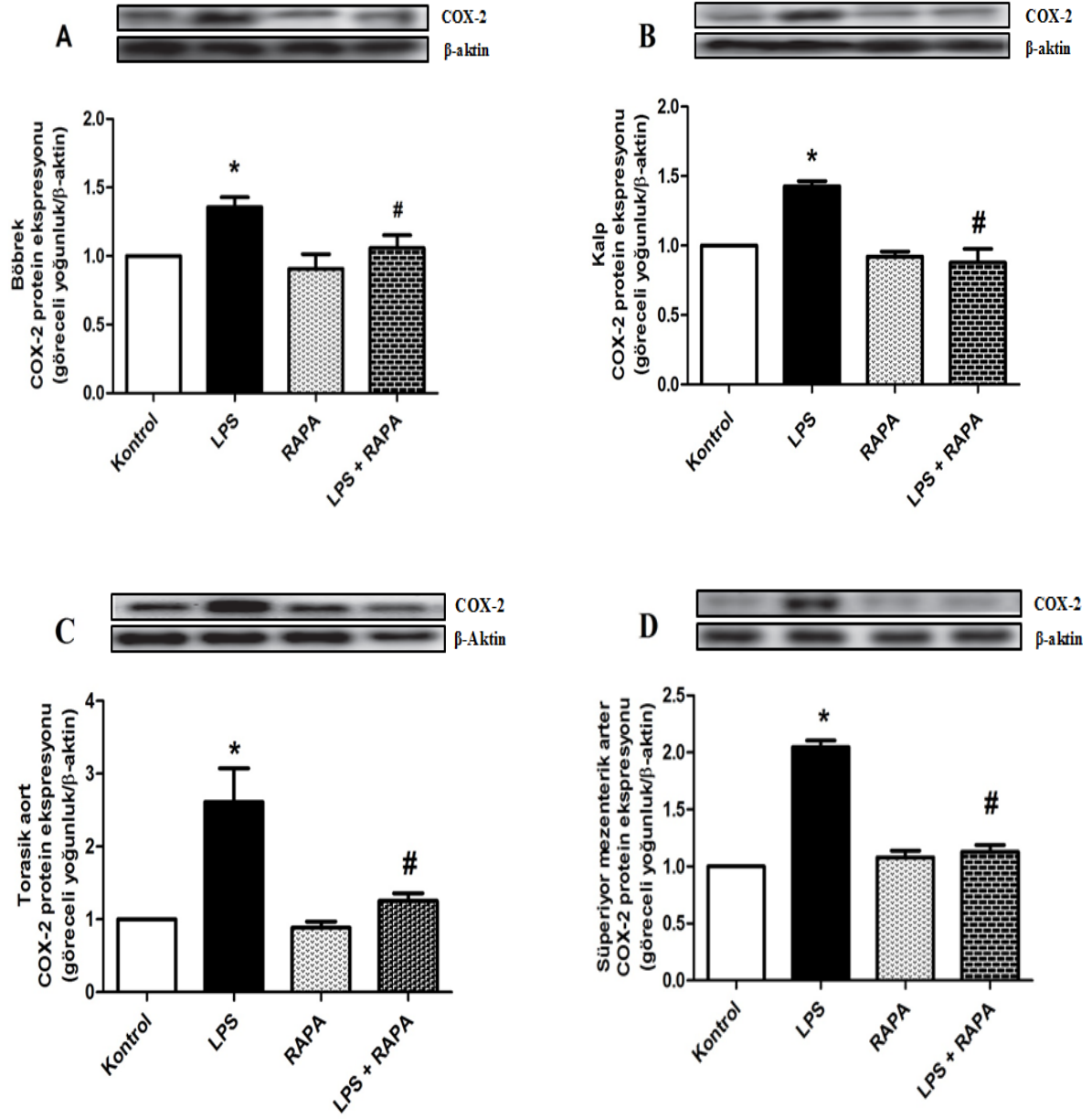
4.6. LPS ve/veya Rapamisinin COX-2 Protein Ekspresyonu ve 6-Keto-PGF_{1α} Düzeyi Üzerindeki Etkisi

4.6.1. LPS ve/veya Rapamisinin COX-2 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde COX-2 protein ekspresyonuna ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.11'de verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanlardan izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde COX-2 protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu COX-2 protein ekspresyonundaki bu artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde COX-2 protein ekspresyonunda herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde indüklenebilir bir enzim olan COX-2 protein ekspresyonunun arttığını ve LPS'nin neden olduğu COX-2 protein ekspresyonundaki bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



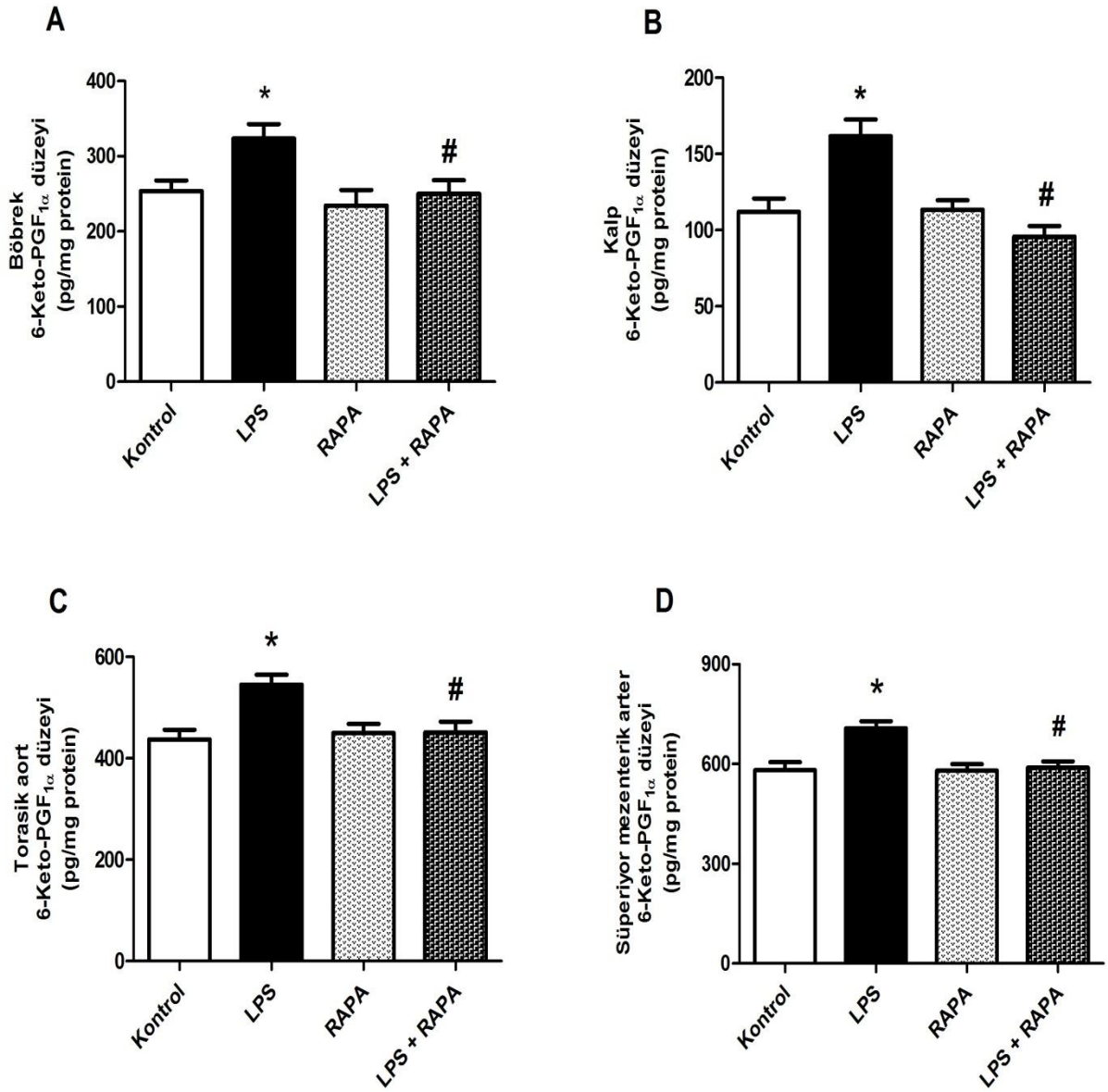
Şekil 4.11. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde COX-2 protein ekspresyonu üzerinde LPS ve/veya rapamisinin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklılık (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.6.2. LPS ve/veya Rapamisinin Doku 6- Keto-PGF_{1α} Düzeyi Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde 6-keto-PGF_{1α} düzeylerine ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.12’de verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanlardan izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde 6-keto-PGF_{1α} düzeylerinde artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS’nin neden olduğu 6-keto-PGF_{1α} düzeylerindeki bu artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde 6-keto-PGF_{1α} düzeylerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde COX-2 enziminin etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen 6-keto-PGF_{1α} düzeylerinin arttığını ve LPS’nin neden olduğu 6-keto-PGF_{1α} düzeylerindeki bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



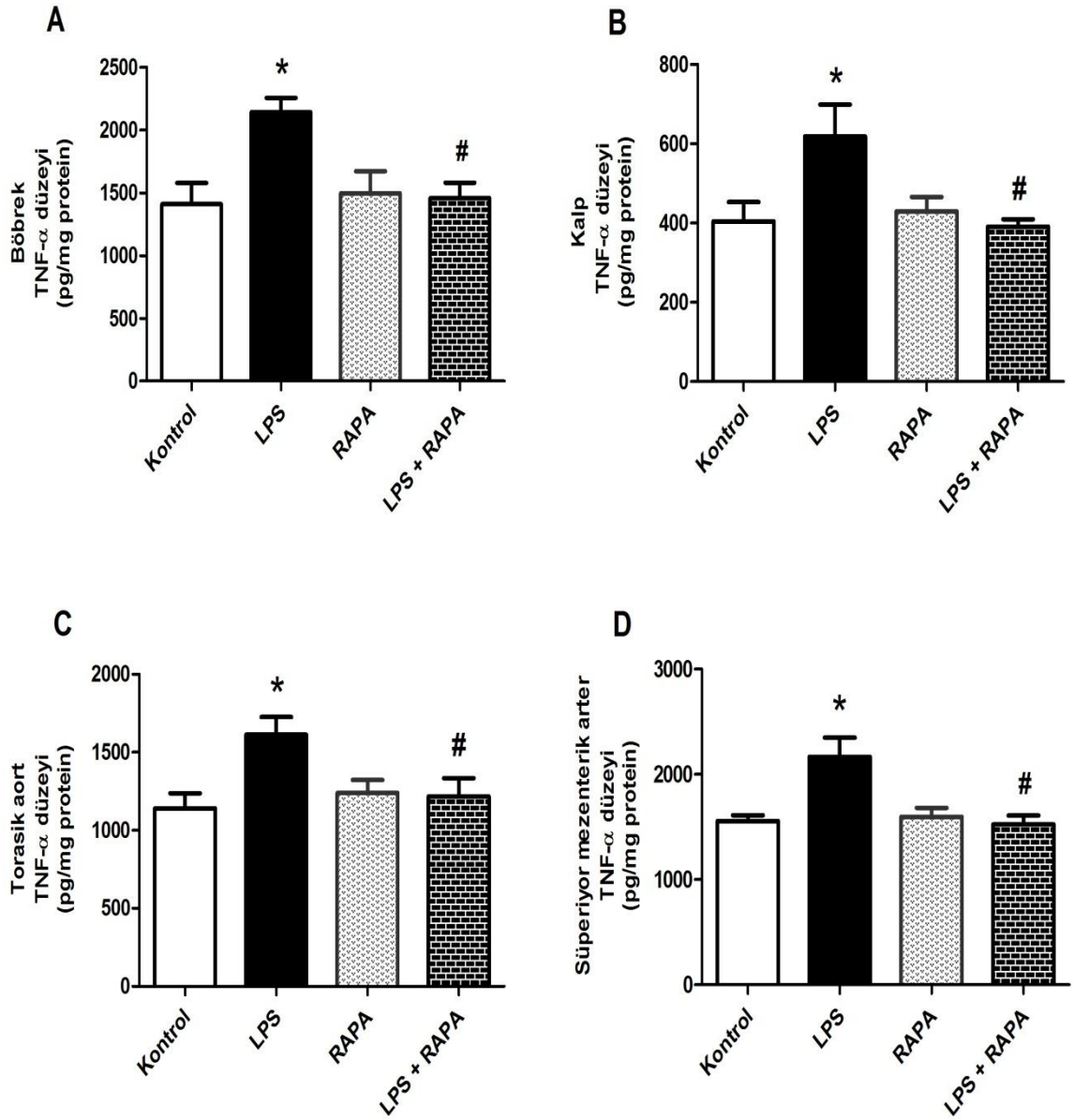
Şekil 4.12. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen 6-keto-PGF_{1α} düzeyleri üzerinde LPS ve/veya rapamisinin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=4-5). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.7. LPS ve/veya Rapamisinin Doku TNF- α Düzeyi Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde TNF- α düzeylerine ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.13'te verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanlardan izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde TNF- α düzeylerinde artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu TNF- α düzeylerindeki bu artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde TNF- α düzeylerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulamasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde güçlü bir proenflamatuvar sitokin olan TNF- α oluşumunun arttığını ve LPS'nin neden olduğu TNF- α düzeylerindeki bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



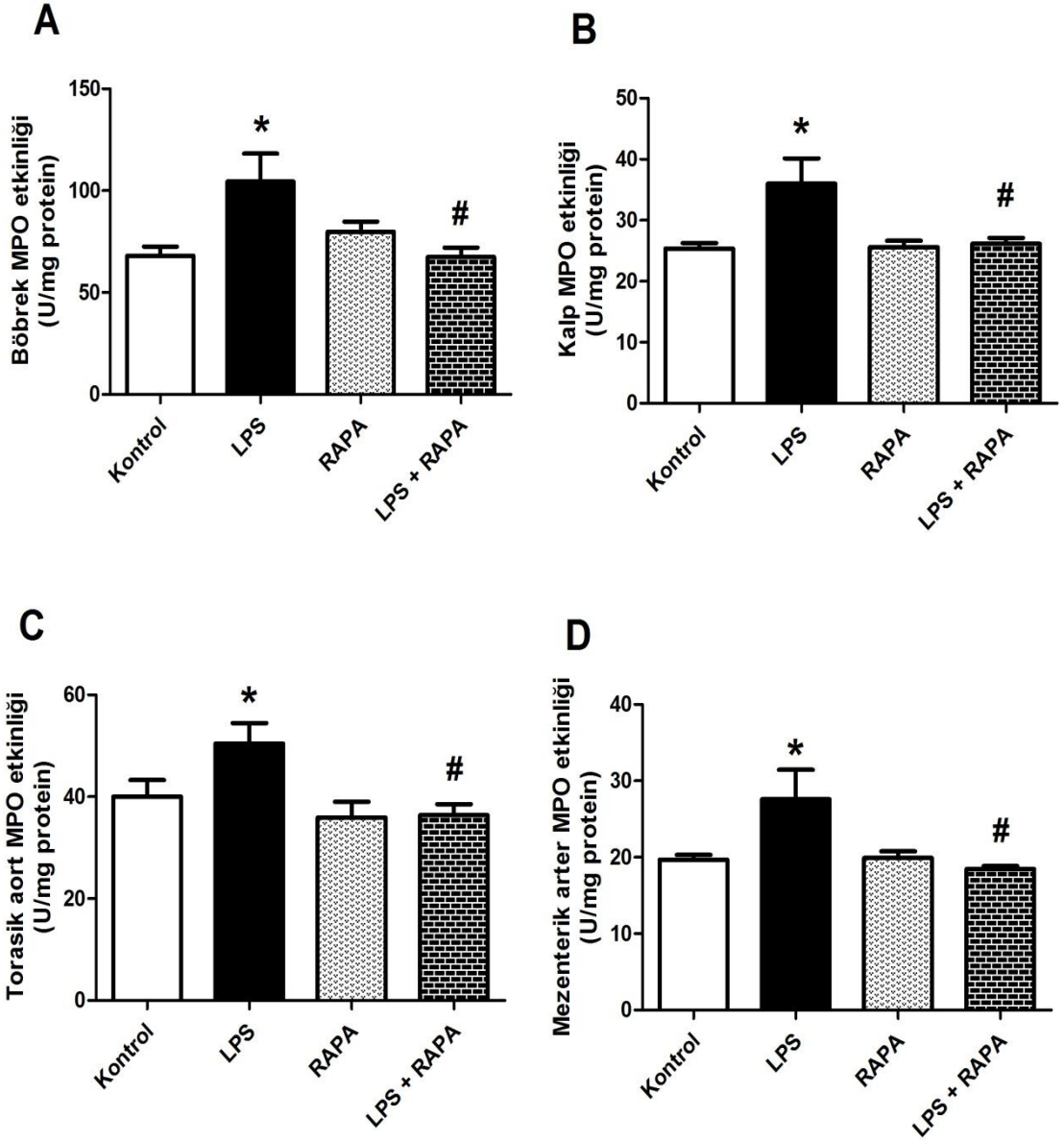
Şekil 4.13. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde ölçülen TNF- α düzeyleri üzerinde LPS ve/veya rapamisininin etkisi. Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.8. LPS ve/veya Rapamisinin Doku MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasının ardından dördüncü saatte izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde MPO etkinliğine ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.10'da verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanlardan izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde MPO etkinliğinde artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu MPO etkinliğindeki bu artmayı rapamisin geri çevirmiştir ($P < 0.05$). Tek başına rapamisin uygulaması böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde MPO etkinliğinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nötrofil infiltrasyonu ve enflamasyonun bir göstergesi olarak ölçülen MPO etkinliğinin arttığını ve LPS'nin neden olduğu MPO etkinliğindeki bu artmanın rapamisin ile geri çevrilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.14. Kontrol ve septik şok grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde MPO düzeyleri üzerinde LPS ve/veya rapamisininin etkisi. *Rapamisin (RAPA) (1 mg/kg, i.p.) ve/veya serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (septik şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterleri izole edilmiştir. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=5). * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).*

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyona mTOR'nin katkısı, spesifik mTOR inhibitörü rapamisin kullanılarak, mTOR/I κ B- α /NF- κ B p65 yolu etkinliğinin artması sonucu oluşumları artan proenflamatuvar ve aynı zamanda vazodilatör etkili mediyatörler üzerinde oluşturabileceği değişiklikler ile ilişkilendirilerek araştırılmıştır. Bu çalışmanın bulguları, rapamisin ile mTOR inhibisyonunun LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyona karşı koruyucu etkisine, mTOR/I κ B- α /NF- κ B p65 yolu etkinliğinin azalması ile birlikte, TNF- α , iNOS kaynaklı NO, COX-2 kaynaklı prostasiklin ve peroksinitrit oluşumu ile MPO etkinliğindeki azalmanın katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte rapamisin uygulanmasından dördüncü saatte sakrifiye edilen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arter dokuları alınmış ve bu dokularda rpS6, NF- κ B p65, I κ B- α , iNOS ve COX-2 ekspresyon ve/veya etkinliklerinin mTOR inhibitörü rapamisin ile ne yönde değiştiği araştırılmıştır. Bununla birlikte, serum ve dokularda nitrit ile dokularda nitrotirozin, 6-keto PGF $_{1\alpha}$, TNF- α düzeyleri ve MPO etkinliği de araştırılmıştır. Çalışmamızın bulguları, sıçanlarda LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyonda, proenflamatuvar ve vazodilatör özellikteki mediyatörlerin oluşum ve etkinliklerindeki artmaya mTOR'nin katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Septik şok, kalpte işlev bozukluğu ve değişen vasküler tonüsten kaynaklanan, vazopresör ilaçlara yanıt vermeyen hipotansiyon ile belirgin kardiyovasküler bozukluklar ile karakterizedir (227-229). Çalışmamızda LPS'nin kardiyovasküler işlevler üzerine olan etkisi, LPS enjeksiyonundan sonra dört saat boyunca OAB ve KH değerleri ölçülerek gösterilmiştir. LPS uygulanmasının ardından birinci saatte OAB'de azalma ve buna paralel olarak KH'de artma gözlenmiş olup, OAB'de ve KH'de gözlenen bu değişiklikler, LPS ile sıçanlarda deneysel septik şok modelinin oluşturulduğunu göstermektedir (219). Daha önce yaptığımız çalışmalarda, Wistar sıçanlara i.p. subletal dozda (10 mg/kg) uygulanan LPS'nin, OAB ve KH üzerine olan

etkilerine bakıldığında, LPS uygulamasının ardından 1 saat içinde OAB'de yaklaşık 28 mmHg bir azalma ve KH'de 47 atım/dakika'lık bir artmanın olduğunu göstermiştik. OAB ve KH'deki bu değişiklikler, LPS uygulanmasından 4 saat sonra maksimum düzeye ulaşmaktadır (230, 231). Benzer şekilde, Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde 20 mg/kg i.v. LPS uygulanmasının ardından 1 saat sonra maksimum hipotansif etkinin ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (232). Bununla birlikte, Wistar sıçanlara i.v. infüzyon ile 10 mg/kg dozda LPS uygulanmasından 30 dakika sonra OAB'de bifazik azalma ve KH'de anlamlı bir artma görülmektedir. LPS'nin OAB'de meydana getirdiği bu azalma altıncı saate dek devam etmektedir (233).

Çalışmamızda, LPS uygulanmasının ardından 1 saat sonra gözlenen OAB'deki azalma ve KH'deki artma, rapamisin uygulanmasından sonraki 1 saat içinde geri çevrilmiş ve rapamisinin bu etkisi 3 saat boyunca devam etmiştir. Bu bulgular, PI3K ile ilişkili kinaz ailesinin bir üyesi olan ve bir serin/treonin kinaz enzimi olan mTOR'nin spesifik inhibitörü olan rapamisinin, LPS'ye bağlı olarak kardiyovasküler sistemde meydana gelen değişiklikleri geri çevirdiğini, LPS uygulanması sonucu ortaya çıkan bu etkilere mTOR'nin aracılık edebileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, hücre büyümesi ve protein sentezi gibi yaşamsal işlevlerde önemli role sahip olduğu gösterilen mTOR'nin kardiyovasküler sistemdeki etkileri ise henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (155). Süregen glomerüloskleroz oluşturulmuş sıçanlarda düşük dozda uygulanan mTOR inhibitörlerinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, rapamisinin (2.5 mg/kg/gün) artmış olan kan basıncını geri çevirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre, rapamisin kan basıncı üzerine olan bu etkisini, glomerüloskleroz nedeniyle oluşan renal zedelenmeyi ve fibrozu azaltarak meydana getirmektedir (234-236). Bulgularımız ayrıca, mTOR inhibitörü rapamisinin tek başına OAB ve KH üzerine bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Kramer ve ark. (234)'nın çalışmasında da mTOR inhibitörü olan rapamisinin kan basıncı üzerine doğrudan bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir.

LPS'nin OAB ve KH üzerindeki etkilerinin temelinde proenflamatuvar ve aynı zamanda vazodilatör nitelikteki sitokinlerin ve enzimlerin yer aldığı bilinmektedir. Septik şok ve benzeri enflamatuvar durumlarda NOS ve COX enzimlerinin

indüklenebilir izoformları olan iNOS ve COX-2 enzimlerinin etkinliklerinde görülen artış, aşırı miktarda NO ve prostanoit sentezlenmesine neden olmaktadır (237-239). Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre, LPS'nin neden olduğu OAB'deki azalma ve KH'deki artmaya, böbrek, kalp, torasik aort ve mezenterik arterlerde proenflamatuvar ve aynı zamanda vazodilatör özellikteki iNOS protein ekspresyonu ile birlikte, serum ve doku nitrit düzeyleri ile doku nitrotirozin düzeylerindeki artma eşlik etmektedir. LPS'nin neden olduğu, vazokonstriktör ilaçlara karşı gelişen vasküler hiporeaktivite, damarlarda artmış NO oluşumu ile ilişkilidir (240, 241). NO, çözünebilir guanilil siklaz (*soluble guanylyl cyclase*; sGC) ve protein kinaz G (*protein kinase G*; PKG) enzimleri ile düz kaslar üzerinde gevşetici etkiye sahiptir (224). iNOS etkinliği sonucu oluşumu artan NO, kalp miyosit hücrelerinde kalsiyum metabolizmasına engel olarak kalp kasında kontraksiyonu azaltmaktadır. Bununla birlikte NO'nun süperoksit iyonu ile etkileşmesi sonucunda oluşan peroksinitrit, miyositler üzerindeki doğrudan toksik etkisi ile septik şokta gözlenen kardivasküler olaylarda önemli rol oynamaktadır (47). Septik şokta gözlenen miyokart işlev bozukluğunda NO'nun rolünü gösteren çalışmalar, iNOS geni eksik farelerde LPS uygulanmasının ardından kardiyak işlevlerin devam ettiğini göstermektedir (76). NO'nun, septik şok patojenezinde, kardiyak miyositlerin yanı sıra, DDKH ve damar endotel hücrelerinin işlevleri üzerine olan etkileri de açıklanmıştır. NO, DDKH'lerinin membranlarında hiperpolarizasyona neden olarak bu hücrelerin vazokonsriktör özellikteki katekolaminlere duyarlılığını ortadan kaldırmaktadır ve bu mekanizma ile vazodilatasyonun sürdürülmesine ve refrakter şok tablosunun gelişmesine neden olmaktadır (47). Yukarıdaki bilgilere ek olarak, iNOS kaynaklı NO'nun kardiyovasküler işlevler üzerine olan etkisi, COX-2 enzimi üzerine olan etkisiyle de ilişkilendirilmiştir. NO, COX-2 enzim etkinliğini artırarak aşırı miktarda vazodilatör özellikteki PGI₂ ve PGE₂ sentezini artırmaktadır (237). Daha önceki çalışmalarımızda, COX-2 enzimi aracılığıyla sentezlenen vazodilatör özellikteki prostanoitlerin septik şokta ortaya çıkan OAB'deki azalmaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir (237).

Rapamisin ile bir rapamisin analogu olan RAD001, proenflamatuvar sitokinler ile uyarılan mikroglial hücrelerde iNOS protein ekspresyonunu ve etkinliğini azaltmaktadır (242). Bununla birlikte, rapamisinin fare RAW264.7 makrofaj

hücrelerinde LPS'nin neden olduğu iNOS protein ekspresyonundaki artmayı konsantrasyona bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Rapamisinin, mTOR inhibisyonu ile iNOS protein ekspresyonunu azaltıcı etkisinin mTOR'ye bağımlı proteozomal etkinlik aracılığıyla olduğu varsayılmaktadır (243). Aynı zamanda rapamisin, *in vitro*, RAW264.7 makrofaj hücrelerinde LPS ile artmış olan ve iNOS etkinliğinin bir göstergesi olarak kabul edilen, nitrit oluşumunu konsantrasyona bağlı olarak azaltmaktadır (243). mTOR inhibitörlerinin, iNOS protein ekspresyonu ve etkinliği üzerine olan etkilerini gösteren çalışmalara ek olarak, iNOS mRNA ekspresyonu üzerine olan etkilerini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. RAW264.7 makrofaj hücre dizisinde yapılan benzer bir başka çalışmada, 4 saat boyunca LPS'ye maruz bırakılmış makrofaj hücrelerinde, rapamisinin, iNOS protein ekspresyonun ve nitrit oluşumunun yanı sıra, iNOS mRNA ekspresyonunu da azalttığı gösterilmiştir (244). LPS'nin, iNOS geni promotor bölgelerini etkinleştirmesinde sekizli oligomer dizilerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bir histon deasetilaz inhibitörü olan trikostatın A (*trichostatin A*; TSA) ve bir PI3K inhibitörü olan LY294002 ile yapılan çalışmada, bu iki bileşiğin LPS'ye maruz bırakılmış makrofaj hücrelerinde bir sekizli oligomer dizisi olan Oct-2 ekspresyonunu inhibe ettiği ve böylece Oct-2'nin hedef genlerinden biri olan iNOS ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. LPS'ye maruz bırakılmış RAW264.7 makrofaj hücrelerinde, mTOR inhibitörü olan rapamisin Oct-2 ekspresyonunu inhibe etmekte ve Oct-2'nin hedef genlerinden biri olan iNOS gen ekspresyonunu ve protein ekspresyonunu azaltmaktadır (244-248).

Septik şokta görülen kan basıncı azalmasına ve vasküler hiporeaktiviteye neden olan NO, oksidatif stres durumlarında süperoksit radikali ile tepkimeye girerek oksidan özelliğe sahip oldukça reaktif peroksinitrit molekülünü oluşturmaktadır. Oldukça reaktif ve oksidan özellikte olan peroksinitritin lipid ve proteinler gibi çeşitli biyomoleküllerle tepkimeye girmesi nedeniyle serum ve dokularda peroksinitrit düzeyleri belirlenememektedir. Bu nedenle, dokularda peroksinitrit oluşumunun bir göstergesi olarak peroksinitritin dayanıklı son ürünü, 3-nitrotirozin düzeyleri ölçülmektedir (249-252). Peroksinitrit oluşumu, şok veya enflamasyonun yer aldığı hastalık durumlarında NO'ya bağımlı tepkimeleri göstermektedir. Çalışmamızda LPS uygulanması sonucu böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde iNOS protein

ekspresyonundaki ve nitrit oluşumundaki artış ile birlikte nitrotirozin düzeylerindeki artmanın mTOR inhibitörü rapamisin ile önlenmesi LPS'nin neden olduğu ve mTOR'un katkıda bulunduğu hipotansiyon ve enflamasyonda NO ve süperoksit radikalının rol oynadığını göstermektedir. Ana Bilim Dalımızda yapılan önceki çalışmalarda, LPS uygulanması ile septik şok oluşturulmuş Wistar sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde LPS uygulanmasından 4 saat sonra nitrotirozin protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Protein ekspresyonunun yanı sıra, serum ile renal ve kardiyovasküler dokularda nitrotirozin düzeylerinin de arttığı aynı çalışmalarla bildirilmiştir (230, 231). Literatürde, mTOR/S6K/ıps6 sinyal ileti yolunun redoksa duyarlı olduğunu ve artan oksidatif stres ile bu sinyal ileti yolunun etkinliğinin arttığına ilişkin bilgiler bulunmaktadır (253, 254). Connel ve ark. (253) böbrek proksimal tübül hücrelerinde oksidatif stres artışına bağlı olarak gelişebilecek zedelenmede oksidatif ve nitrozatif stresin bir göstergesi olan 3-nitrotirozin düzeylerinde artışın ve artan bu redoks tepkimelerine bağlı olarak da mTOR/S6K etkinliğinin yer alabileceğini göstermişlerdir.

Rapamisinin de içinde yer aldığı immün sistemi baskılayıcı ilaçların, sahip oldukları antienflamatuvar etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, LPS ile uyarılmış RAW264.7 makrofaj hücrelerinde, rapamisin ile birlikte siklosporin ve FK506'nın antienflamatuvar etkinlikleri, sitotoksik ve proenflamatuvar etkilere sahip olan iNOS ve COX-2 enzimleri üzerine olan etkileri ile açıklanmaya çalışılmıştır. Rapamisinin iNOS ve COX-2 enzimlerinin mRNA ve protein ekspresyonları ile birlikte, bu enzimlerin etkinlikleri üzerine olan etkileri, Attur ve ark. (255) tarafından araştırılmıştır. mTOR inhibitörünün, LPS uygulanmasının ardından on altıncı saatte iNOS ve COX-2 mRNA ekspresyonu azalttığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra rapamisinin, bu iki proenflamatuvar enziminin protein ekspresyonlarını anlamlı şekilde azaltıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. LPS'ye maruz bırakılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde COX-2 enzim etkinliğinin bir göstergesi olarak PGE₂, iNOS enzimin etkinliğinin göstergeleri olarak da NO ve nitrit oluşumu incelenmiştir. Rapamisin (10 nM) ile proenflamatuvar mediyatörlerin oluşumundan sorumlu olan bu enzimlerin etkinliklerinin azaldığı gösterilmiştir. Rapamisin, siklosporin ve FK506 ile benzer etkiler göstermesine karşın iNOS ve COX-2 protein ekspresyonu ve etkinliği üzerine birbirlerinden farklı inhibitör

etki göstermişlerdir. Rapamisinin, siklosporine göre, iNOS ve COX-2 enzimleri üzerinde, daha düşük konsantrasyonda daha yüksek inhibitör etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Rapamisinin bu etkisinin S6K ve rpS6 gibi *downstream* efektör proteinleri ile protein traslasyonunu ve hücre döngüsünü inhibe etmesi ile açıklanabilmektedir (255). Bizim çalışmamızda, sıçanlara LPS uygulanmasından 4 saat sonra, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde COX-2 protein ekspresyonu ve COX-2 etkinliğinin bir göstergesi olarak 6-keto PGF_{1α} düzeylerinin arttığı ve LPS'nin neden olduğu bu artmanın da rapamisin ile önlendiği gösterilmiştir.

Çalışmamızın bulgularına göre, LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyonda mTOR enziminin etkinliğinde artma gözlenmektedir. mTOR etkinliğinin bir göstergesi olan, *downstream* efektör moleküllerinden rpS6'nın Ser^{240/244} bölgelerinden üzerinden fosforilasyonu, LPS uygulanmasının ardından 4 saat sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde artmıştır. Artan rpS6 fosforilasyonu, mTOR inhibitörü olan rapamisin kullanıldığında geri çevrilmiştir. rpS6 ekspresyonunda bir değişiklik görülmemiştir. Bu veriler, sıçanlarda LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyonda mTOR enziminin katkısının olduğunu göstermektedir. *In vitro* koşullarda yapılan bir çalışmada kemik iliği nötrofil hücrelerinin bir TLR4 ligandı olan LPS'ye maruz bırakılması ile mTOR sinyal ileti yolunun majör *downstream* hedef molekülü olan rpS6'nın Ser^{240/244} bölgelerinden fosforilasyonu, konsantrasyona ve zamana bağımlı olarak artmıştır. LPS uygulanması ile artan rpS6 fosforilasyonu mTOR inhibitörü rapamisin ile inhibe edilmiştir. (91). Lorne ve ark. (91), *in vivo* mTOR etkinliğini göstermek amacıyla farelerde, intratrakeal LPS (1 mg/kg) uygulanmasının ardından akciğer doku homojenatlarında rpS6'nın Ser^{240/244} bölgelerinden fosforilasyonunun arttığını ve rapamisin ile bu artmanın geri çevrildiğini göstermişlerdir. Bunlara ek olarak, *in vivo*, farelerde LPS uygulanması karaciğer, akciğer ve böbrek dokusunda mTOR etkinliğini (Ser^{240/244}) artırmaktadır (256). LPS'nin mTOR etkinliğinde artmaya neden olması, PI3K/Akt sinyal ileti yolu ile olabileceği gibi bu sinyal ileti yolundan bağımsız da olabileceği gösterilmiştir. LPS ile oluşumu artan ve güçlü bir proenflamatuvar sitokin olan TNF- α , IKK β fosforilasyonu ile PI3K/Akt yolundan bağımsız olarak mTOR etkinliğini artırmaktadır (257). TNF- α 'nın bu etkisinin geç dönem mTOR etkinliğinde artmaya neden olabileceği

düşünülmektedir.

Çalışmamızda, LPS sinyal iletilisinde, rpS6 fosforilasyonundaki artma ile etkinliği gösterilen mTOR'nin, IκB-α ve NF-κB ekspresyon ve etkinliği üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla IκB-α ve NF-κB p65 protein ekspresyonları ve fosforilasyonu incelenmiştir. LPS uygulanması, NF-κB p65 ekspresyonunu ve Ser⁵³⁶ üzerinden fosforilasyonunu artırırken, NF-κB'nin etkinleşmesinde rol oynayan IκB-α'nın Ser³² üzerinden fosforilasyonunu artırmış, ekspresyonunu ise azaltmıştır. LPS ile NF-κB ve IκB-α'da ortaya çıkan bu değişiklikler rapamisin ile geri çevrilmiştir. Bulgularımıza göre LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyonda katkısını araştırdığımız mTOR'nin etkisini IκB-α ve NF-κB etkinliği aracılık etmektedir. Daha önceki çalışmalarımızda da, LPS'nin IκB-α ve NF-κB p65 etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (15, 54). IKKβ, TNF-α gibi proenflamatuvar sitokinler ve LPS gibi bakteriyel ürünler tarafından (91) etkinleştirilen ve NF-κB sinyal ileti yolunda rol alan kilit bir kinaz enzimidir (258, 259). Etkinleşen IKKβ, IκB-α enzimini fosforile etmekte ve IκB-α'nın βTrCP aracılıklı ubikütinasyonuna ve proteozomal parçalanmasına neden olmaktadır (260, 261). IκB-α'nın parçalanması ile NF-κB serbest duruma gelmekte ve ardından nükleusa transloke olarak proenflamatuvar gen ekspresyonunu artırmaktadır (262). Çalışmamızın bulgularına göre, LPS uygulanmasının ardından 4 saat sonra, böbrek, kalp, torasik aorta ve süperiyor mezenterik arterlerde, IκB-α protein ekspresyonu azalırken, fosforilasyonunda artma gözlenmiştir. Lorne ve ark. (91), rapamisinin, LPS'nin IκB-α ekspresyonu ve fosforilasyonunda oluşturduğu değişiklikleri geri çevirdiğini göstermiştir. *In vitro*, kolon kanser hücreleri ve hepatositlerde, rapamisin TLR4 aracılıklı IκB-α degradasyonunu azaltmıştır (263, 264). IκB-α'nın fosforilasyonu, mTOR etkinliğini düzenleyen ve negatif bir düzenleyici olarak kabul edilen TSC1'in fosforilasyonuna da aracılık etmektedir. TSC1'in fosforilasyonu ile azalan etkinliği sonucu, mTOR sinyal ileti yolu üzerindeki inhibitör etkisi ortadan kalkmaktadır (265-267). Bu veriler, mTOR ve IκB-α etkinlikleri arasında bir *feedback* mekanizması olabileceğini düşündürmektedir.

NF-κB, şiddetli sepsis ve septik şok patojenezinde yer alan enflamatuvar

mediyatörlerin pek çoğunun ekspresyonunu düzenleyen, prototipik bir transkripsiyon faktörüdür. Enflamasyonda pivotal bir rol oynayan NF- κ B aktive olmadığı durumlarda, sitoplazmada inhibitör özellikteki I κ B protein ailesi üyeleri (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3, p100, p105) ile etkileşerek dinlenme durumunda bulunmaktadır. LPS gibi bakteriyel ürünler ile TNF- α gibi sitokinler gibi farklı uyarıların TLR ile etkileşmelerinin ardından etkinleşen MyD88'e bağımlı ve MyD88'den bağımsız sinyal ileti yolları ile I κ B'nin degradasyonu ve fosforilasyonu artmaktadır. Bu şekilde serbest duruma gelen ve etkinleşen NF- κ B, nükleusa transloke olmaktadır. (47). Nükleusa transloke olarak hedef genlerin promotör bölgelerine bağlanan NF- κ B, enflamatuvar mediyatörlerin etkinleşmesini, TNF- α , iNOS ve COX-2 gibi proenflamatuvar sitokin ve enzimlerin oluşumunu artırmaktadır. NF- κ B inhibisyonunun, bu nedenle enflamasyonun tedavisinde bir hedef olduğu düşünülmektedir (268, 269). mTOR etkinliğinde artma proenflamatuvar yanıtların artışı ile sonuçlanmaktadır. mTOR'nin proenflamatuvar etkisi, TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonu için gerekli olan NF- κ B'nin p65 alt biriminin Ser²⁷⁶ rezidülerinin fosforilasyonunu artırması sonucu ortaya çıkmaktadır. *In vitro*, nötrofil hücre kültüründe ve *in vivo* iyege akciğer zedelenmesi oluşturulmuş farelerin akciğer doku homojenatlarında, LPS uygulanması ile artan proenflamatuvar sitokin oluşumu rapamisin ile azalmaktadır. Rapamisinin bu etkisi, proenflamatuvar etkinliğe sahip mTOR aracılığı ile NF- κ B p65'in optimal transkripsiyonel etkinliği için gerekli olan Ser²⁷⁶ fosforilasyonunun inhibisyonu ile açıklanmaktadır (179, 180). Çalışmamızda, rapamisinin LPS ile böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde, NF- κ B p65'in ekspresyon ve etkinliğindeki artmayı önlediği gösterilmiştir. Wistar sıçanlarda, *status epilepticus* (SE)'nin neden olduğu enflamatuvar durumlarda, rapamisin, NF- κ B p65'in DNA'ya bağlanma etkinliğini anlamlı biçimde azaltmaktadır. SE sonrası sıçan hipokampusünde artmış olan fosforile I κ B- α düzeyleri de mTOR inhibitörleri ile azaltılmıştır (270). Kumar ve ark. (271) resveratrolün, mTOR sinyal ileti yolunun inhibisyonunun resveratrolün olası antienflamatuvar etki mekanizmalarından biri olabileceğini bildirmişlerdir.

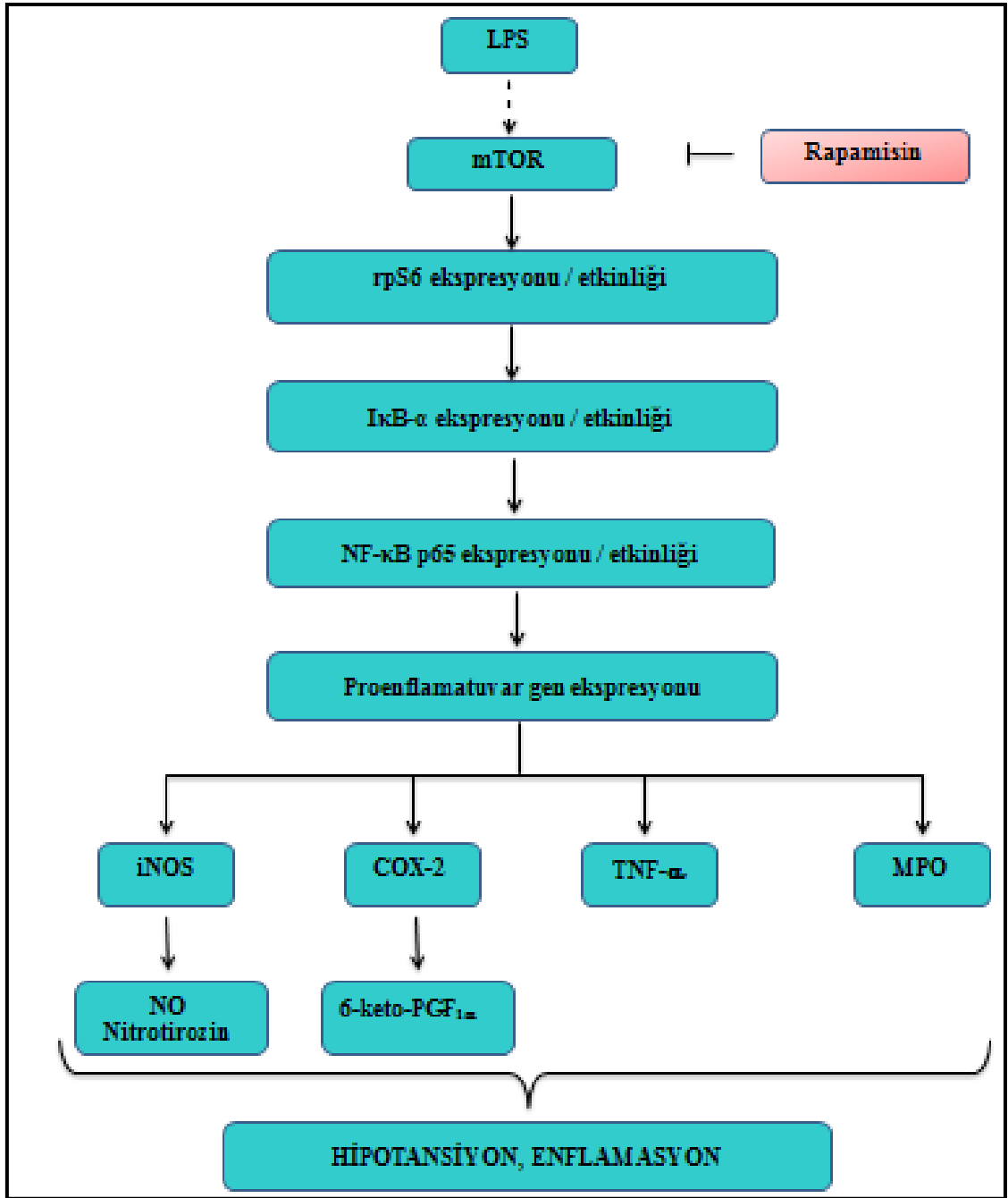
NF- κ B, birçok proenflamatuvar genin ekspresyonunda yer alan *upstream* moleküllerden biridir. Bu proenflamatuvar genlerin arasında NF- κ B tarafından

düzenlenen iNOS ve COX-2 enzimleriyle birlikte TNF- α da yer almaktadır. Çalışmamızda, LPS uygulanması ile ortaya çıkan hipotansiyon ve enflamasyonda mTOR'nin katkısını incelemek amacıyla proenflamatuvar bir sitokin olan ve septik şokta rol oynadığı gösterilen TNF- α protein düzeyleri de araştırılmıştır. LPS uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde arttığı gösterilen TNF- α düzeyleri rapamisin uygulaması ile geri çevrilmiştir. Bulgularımıza göre, LPS uygulanması ile oluşan hipotansiyon ve enflamasyona katkıda bulunduğunu düşündüğümüz ve etkinliğinin arttığını gösterdiğimiz mTOR'nin etkisine I κ B- α etkinliği ile birlikte NF- κ B etkinliği sonucu oluşumu artan TNF- α aracılık etmektedir. TNF- α , şok durumlarında ve şoka bağlı gelişen doku zedelenmesinde yer alan önemli bir sitokindir (10). Aynı zamanda bakteriyel bir enfeksiyona karşı etkinleşen gerek doğal gerekse kazanılmış bağışıklık sisteminde önemli rol oynayan güçlü bir proenflamatuvar sitokindir (272). Endotoksemik fare modellerinde ve kardiyomiyosit hücre kültüründe LPS ile etkinliği artan mTOR, TNF- α oluşumunu artırarak miyokardiyal işlev bozukluğuna neden olmaktadır (273). Zhang ve ark. (273), farelere LPS uygulanmasının, kardiyomiyosit hücrelerinde, Na/K-ATPaz etkinliğinin inhibisyonu ile kalsiyuma duyarlı olan mTOR enziminin etkinliğinde ve TNF- α protein oluşumunda artmaya neden olarak kardiyak işlev bozukluğuna neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca farelerde, LPS'nin neden olduğu ivergen akciğer zedelenmesinde, mTOR inhibitörü rapamisin, LPS ile artan TNF- α protein oluşumunu azaltmıştır. Fielhaber ve ark (274), farelerde, LPS'nin neden olduğu ivergen akciğer zedelenmesinde, mTOR inhibisyonu ile, etkinliği artan sinyal ileti yollarının içerisinde MyD88'den bağımsız sinyal ileti yolunun tersine NF- κ B'nin, nötrofil birikimi ve TNF- α 'nın da yer aldığı MyD88'e bağımlı sinyal ileti yolunu önlediğini göstermişlerdir. Bakteriyel bir ürün olan LPS'nin yanı sıra, farklı uyaranlar aracılığı ile başlatılan enflamatuvar süreçlerde de mTOR etkinliği incelenmiştir. Güçlü bir proenflamatuvar olan TNF- α aracılığı ile etkinleştirilen enflamasyonda ve ilişkili hastalık modellerinde, mTOR etkinliğinin yer aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (91, 275, 276). TNF- α , mTOR ve mTOR'nin *downstream* efektör molekülleri olan S6K ve rpS6'nin fosforilasyonunu artırmaktadır (277-279). Rapamisin, mTOR inhibisyonu ile proenflamatuvar sitokin ve kemokinlerin ekspresyonunu azaltarak enflamasyonu azaltmakta ve enflamasyon ile ilişkili renal fibroz ve nefropati gibi hastalık

modellerinde iyileşmeye neden olmaktadır (280, 281). Zhu ve ark. (275), TNF- α 'ya maruz bırakılmış fibroblast hücrelerinde ortaya çıkan enflamasyonda, mTOR ve efektörü rpS6'nın fosforilasyonunun arttığını ve resveratrolün bu proteinlerin fosforilasyonundaki artmayı inhibe ederek antiinflamatuvar etki oluşturduğunu göstermişlerdir. Bunun yanı sıra, TNF- α , iNOS enziminin de potent bir indükleyicisidir. Bu indükleyici etki ile septik şokta ortaya çıkan proenflamatuvar olayların pek çoğunda rol oynamaktadır (47).

Çalışmamızda, mTOR, I κ B- α ve NF- κ B'de gözlenen etkinlik artışına paralel olarak iNOS ve COX-2 enzimlerinin ekspresyonları ile birlikte etkinliklerinin birer göstergesi olan nitrit ve 6-keto PGF $_{1\alpha}$ düzeyleri ile TNF- α 'nın yanı sıra, enflamasyonun ve doku zedelenmesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilen MPO etkinliğinin de LPS ile arttığı gösterilmiştir. Rapamisin ise mTOR inhibisyonu ile, ortaya çıkan bu artmaları geri çevirmiştir. Nötrofil hücrelerinin sitoplazmik granüllerinde bulunan ve önemli bir bileşen olarak kabul edilen MPO enziminin etkinliği, dokulara polimorfonükleer nötrofil hücrelerin birikmesinin, dolayısıyla doku ve organ zedelenmesinin temel bir göstergesi olarak ölçülmektedir (282). Farelerde, LPS'nin neden olduğu i ve gen akciğer zedelenmesinde, akciğer doku homojenatlarında MPO etkinliği incelenmiş olup, intratrakeal LPS uygulanmasının ardından 4 saat sonra akciğer doku homojenatlarında artan MPO düzeylerinin, rapamisin uygulanması ile anlamlı biçimde azaldığı gösterilmiştir (91).

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, LPS'nin sıçanlarda neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyona mTOR'nin mTOR/I κ B- α /NF- κ B yolu etkinliğinde artışa neden olarak katkıda bulunduğunu göstermektedir. LPS'nin mTOR aracılığı ile ortaya çıkan bu etkisi rapamisin ile geri çevrilmektedir. Bununla birlikte, mTOR'nin inhibisyonu sonucu, kardiyovasküler ve renal dokularda, proenflamatuvar ve aynı zamanda vazodilatör etkili mediyatörlerin oluşumlarının önlenmesi rapamisinin septik şokta koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyonda mTOR inhibisyonunun olası bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5.1. LPS'nin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyona mTOR'nin katkısı için önerilen mekanizma. COX-2 indüklenebilir siklooksijenaz; IκB-α, inhibitör kappa B alfa; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; LPS, lipopolisakkarit; MPO, miyeloperoksidaz; mTOR, rapamisinin memelilerdeki hedefi; NF-κB, nükleer faktör kappa B; NO, nitrik oksit; rpS6, ribozomal protein S6; TNF-α, tümör nekrozlaştırıcı faktör alfa.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Septik şokta hedefe yönelik, daha özgül bir tedavi yaklaşımının geliştirilebilmesi için moleküler düzeyde etkinliği artan sinyal ileti yollarında yer alan moleküllerin işlevlerinin tam anlamıyla aydınlatılması önem taşımaktadır. Spesifik mTOR inhibitörü rapamisinin LPS'nin neden olduğu hipotansiyonu ve enflamasyonu önleyici etki mekanizmasının, mTOR etkinliği aracılığıyla I κ B- α /NF- κ B ekspresyon ve etkinliğinde meydana getirdiği değişiklikler ile ilişkilendirilerek araştırıldığı bu çalışmada, rapamisinin, LPS'nin neden olduğu enflamasyonu ve hipotansiyonu önleyici etkisine mTOR inhibisyonu sonucu katkıda bulunduğu gösterilmiştir. mTOR etkinliğinin inhibisyonu sonucu mTOR/I κ B- α /NF- κ B yolu etkinliği ile iNOS, COX-2, MPO ve TNF- α ekspresyon ve/veya etkinliklerindeki artış ve NO, peroksinitrit ile PGI₂ oluşumundaki artış da geri çevrilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, septik şok tedavisinde, rapamisinin, mTOR ve buna bağlı olarak proenflamatuvar ve vazodilatör mediyatörler üzerindeki inhibe edici etkisi ile septik şokta uygulanan tedavi stratejileri içerisinde yer alabileceğini düşündürmektedir.

Daha çok metabolik ve nörodejeneratif hastalıklardaki rolleri araştırılmış olan mTOR enziminin enflamasyon patojenezindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Çalışmamızda, mTOR'nin enflamasyon ve ilişkili hipotansiyondaki rolü, kardiyovasküler ve renal dokularda proenflamatuvar I κ B- α /NF- κ B kompleksinin etkinliğini ve ilişkili proenflamatuvar mediyatörlerin oluşumunu artırması ile ilişkilendirilerek açıklanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, mTOR etkinliğindeki artışla seyreden hipotansiyon ve enflamasyonla belirgin kardiyovasküler ve renal hastalıkların tedavisinde mTOR inhibitörlerinin antienflamatuvar etkisinin önemli rolünün bulunabileceğini göstermektedir.

LPS sinyal iletilerinde mTOR'nin kullandığı sinyal ileti yollarının aydınlatılabilmesi için, aynı sinyal ileti yolunda yer alan ve mTOR'nin çeşitli tirozin kinaz enzimleriyle olan etkileşimleri tirozin kinaz inhibitörleri kullanılarak incelenebilir. Bunun yanı sıra mTOR enziminin *upstream* moleküllerinden Akt veya

PI3K gibi enzimlerle olan etkileşimleri de araştırılarak LPS sinyal iletilişinde mTOR'nin izlediği yol daha ileri düzeyde aydınlatılabilir. Bununla birlikte, bakteriyel bir ürün olan ve septik şok oluşturmak amacıyla kullandığımız LPS'nin dışında, laboratuvarımızda çalışılan zimosan gibi bakteriyel ve endotoksik olmayan etkenlerin neden olduğu septik olmayan şok durumlarında da mTOR etkinliğinin ne yönde değiştiği daha sonra yapmayı düşündüğümüz çalışmalar arasında yer almaktadır. Ayrıca, mTOR inhibitörü olarak kullandığımız rapamisin'in dışında mTOR katalitik alt birimini içeren, fizyolojik ve patofizyolojik etkileri henüz tam olarak aydınlatılmamış olan mTORK2 üzerine de etki gösteren, Torin 1 gibi diğer inhibitörler kullanılarak, LPS ile oluşturulan septik şok modeli ve zimosan ile oluşturulan septik olmayan şok modellerinde bu kompleksin de rolü araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Girgin S. Sepsis ve septik şok. Erişim: <http://www.dicle.edu.tr/Contents/.pdf>. Erişim tarihi: 07.12.2014.
2. Akpir K, Telci L, Pembeci K, Esen F. Sepsis ve septik şokun günümüzdeki tanımlaması ve tedavisi. *Ankem*, **1994**; 8(3):185-91.
3. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med*, **2003**; 168:165-72.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, **2003**; 348:1546-54.
5. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*, **2002**; 28:108-21.
6. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med*, **1988**; 318:727-32.
7. Hubacek JA, Stüber F, Fröhlich D. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med*, **2001**; 29:557-61.
8. Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med*, **2004**; 32:569-79.
9. Aksu F. Septik şok. Erişim: web.firat.edu.tr/myildiz/files/septisok.pdf. Erişim tarihi: 07.12.2014.
10. Akın BV. Septik Şok. Erişim: www.cerrahisayfasi.com/SeptikSokBaris.ppt. Erişim tarihi: 07.12.2014.
11. Kang-Birken SL, Dipiro JT. Sepsis and septic shock. In: Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. Eds. *Pharmacotherapy*, 7nd Ed., ABD:McGraw-Hill Medical Publishing, **2008**:1943-4.
12. Palsson-Mcdermott EM, O'neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, **2004**; 113:153-62.
13. Kitchens RL, Wang PY, Munford RS. Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways. *J Immunol*, **1998**; 161:5534-45.

14. **Kawai T, Akira S.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: up date on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* **2010**; 11:373-84.
15. **Kaçan M.** Sıçanlarda endotoksin ile oluşan hipotansiyona dalak tirozin kinazının katkısının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2013**.
16. **Ünsal D.** Sıçanlarda zimosan ile oluşan hipotansiyona dalak tirozin kinazının katkısının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2013**.
- 17 **Cybulski N, Hall MN.** TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci*, **2009**; 34(12): 620-7.
18. **Ballou LM, Lin RZ.** Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol*, **2008**; 1:27-36.
19. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **2005**; 307:1098-101.
20. **Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument- Bromage H, Tempst P, Sabatini DM.** Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **2004**; 14:1296-302.
21. **Guyton AC, Hall JE.** Circulatory Shock and Physiology of Its Treatment. *Text book of Medicinal Physiology*, 11nd Ed., Elsevier, **2006**: 278-300.
22. **Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM.** Septic shock. *Lancet*, **2005**; 365:63-78.
23. **Levine B, Kalman J, Mayer I, Fillit HM, Packer M.** Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chotonic heart failure. *N Engl J Med*, **1990**; 323:236.
- 24 **King EG, Bauza GJ, Mella JR, Remick DG.** Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Laboratory Investigation*, **2014**; 94:4-12.
25. **Latto C, RN, MSN.** An overview of sepsis. *Dimens Crit Care Nurs*, **2008**; 27(5):195-200.
26. **Levy M, Fink M, Marshall J, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G.** 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Intensive Care Med*, **2003**; 29:530-8.
27. **Rivers E, McIntyre L, Morro D, Rivers K.** Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *Can Med Assoc J*, **2005**; 173(9):1-25.

28. **Bone RC, Balk RA, Cerra FB.** American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, **1992**; 101:1644-55.
29. **Tunctan B, Korkmaz B, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Serin MS, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Schunck WH, Falck JR, Malik KU.** A novel treatment strategy for sepsis and septic shock based on the interactions between prostanoids, nitric oxide, and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, **2012**; 11:121-50.
30. **Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.** Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, **2001**; 29:1303-10.
31. **Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD.** Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*, **2010**; 376:1339-46.
32. **Rangel-Frausto MS, Pittet D, Hwang T, Woolson RF, Wenzel RP.** The dynamics of disease progression in sepsis: Markov modeling describing the natural history and the likely impact of effective antiseptics agents. *Clin Infect Dis*, **1998**; 27:185-90.
33. **Ramírez M.** Multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, **2013**; 43:273-7.
34. **Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ.** Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*, **2011**; 62:1-8.
35. **Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ.** Benchmarking the Incidence and Mortality of Severe Sepsis in the United States. *Crit Care Med*, **2013**; 41:1167-74.
36. **Hoyert DaJX.** Deaths: Preliminary data for 2011, Hyattsville, MD, USA, 10 October 2011, 2012.
37. **Luce WA, Hoffman TM, Bauer JA.** Bench-to-bedside review: developmental influences on the mechanisms, treatment and outcomes of cardiovascular dysfunction in neonatal versus adult sepsis. *Crit Care*, **2007**; 11:228.
38. **Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS.** Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*, **2012**; 40:754-61.
39. **Morrell MR, Micek ST, Kollef MH.** The Management of severe sepsis and septic shock. *Infect Dis Clin N Am*, **2009**; 23:485-501.
40. **Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H.** Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*, **2002**; 28(2):108-21.

41. **Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.** Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, **2001**; 29:1303-10.
42. **Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK.** Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*, **2012**; 40:754-6.
43. **Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS.** Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*, **2012**; 366:2055-64.
44. **Vincent JL, Rello J, Marshall J.** International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, **2009**; 302:2323-9.
45. **Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M.** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, **2003**; 348:1546-54.
46. **Opal SM, Garber GE, LaRosa SP.** Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis*, **2003**; 37:50-8.
47. **Nduka OO, Parrillo JE.** The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Clin*, **2009**; 25:677-702.
48. **Rangel-Frausto M, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis C, Wenzel R.** The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *JAMA*, **1995**; 273:117-23.
49. **Kellum J, Lan K, Fink M.** Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis. *Arch Intern Med*, **2007**; 167(15):1655-63.
50. **Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P.** Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, **2013**; 43:260-3.
51. **Maeshima N, Fernandez RC.** Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2013**; 3: doi: 10.3389/fcimb.2013.00003
52. **Raetz CR, Whitfield C.** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, **2002**; 71:635-700.
53. **Ulevitch RJ, Tobias PS.** Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*, **1995**; 13:437-57.
54. **Sari AN, Belma Korkmaz B, Serin MS, Kacan M, Unsal D, Buharalioglu CK, Sahan Firat S, Manthathi VL, Falck JR, Malik KU, Tunctan B.** Effects of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, on lipopolysaccharide-induced changes in MyD88/TAK1/IKKb/IjB-a/NF-jB pathway and circulating miR-150, miR-223, and miR-297 levels in a rat model of septic shock. *Inflamm. Res*, **2014**; 63:741-56.

55. **Gangloff M, Gay NJ.** MD-2: the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, **2004**; 29(6):294-300.
56. **Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Fürll B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter F, Schütt C.** Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature*, **1997**; 389:742-5.
57. **Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ.** Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem*, **1995**; 270:10482-8.
58. **Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ.** Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, **1990**; 249:1429-31.
59. **Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC.** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, **1990**; 249:1431-3.
60. **Kang JY, Lee JO.** Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem*, **2011**; 80:917-41.
61. **Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM.** Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of Gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*, **1996**; 4:407-14.
62. **Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M.** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, **1999**; 189:1777-82.
63. **Inohara N, Nunez G.** ML a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends Biochem Sci*, **2002**; 27:219-21.
64. **Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B.** Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2000**; 97:2163-7.
65. **Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K.** Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, **2002**; 3:667-72.
66. **Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y, Kosugi A, Miyake K.** Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4–MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med*, **2003**; 198:1035-42.

67. **Visintin A, Latz E, Monks BG, Espevik T, Golenbock DT.** Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem*, **2003**; 278:48313-20.

68. **Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT.** Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med*, **2001**; 194:79-88.

69. **Re F, Strominger JL.** Monomeric recombinant MD-2 binds Toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. *J Biol Chem*, **2002**; 277:23427-32.

70. **Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS.** LPS/TLR4 signal Transduction pathway. *Cytokine*, **2008**; 42:145-51

71. **Kagan JC, Medzhitov R.** Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, **2006**; 125:943-55.

72. **Cristofaro P, Opal SM.** Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs*, **2006**; 66:15-29.

73. **Reitsma PH, Branger J, Van Den Blink B, Weijer S, van der Poll T, Meijers JC.** Procoagulant protein levels are differentially increased during human endotoxemia. *J Thromb Haemost*, **2003**; 1:1019-23.

74. **Takeuchi O, Akira S.** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, **2010**; 140:805-20.

75. **Kawai T, Akira S.** Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, **2011**; 34:637-50.

76. **Ullrich R, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Ichinose F, Nakajima H, Picard MH, Zapol WM, Quezado ZM.** Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circulation*, **2000**; 102:1440-6.

77. **Kumar A, Thota V, Dee L, Uretz E, Parrillo JE.** Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta are responsible for depression of in vitro myocardial cell contractility induced by serum from humans with septic shock. *J Exp Med*, **1996**; 183:949-58.

78. **Angus DC, van der Poll T.** Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, **2013**; 369:840-51.

79. **Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubinfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R.** The surviving sepsis campaign guidelines committee including the pediatric subgroup, surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*, **2013**; 41:580-637.

80. **Bhaskar PT, Hay N.** The Two TORCs and Akt. *Dev. Cell*, **2007**;12 (4): 487-502.
81. **Jacinto E, Lorberg A.** TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem. J.* **2008**; 410(1):19-37.
82. **Dunlop EA, Tee AR.** Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell. Signal.* **2009**; 21:827-35.
83. **Laplante M, Sabatini DM.** mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci*, **2009**; 122 (20):3589-94.
84. **Alessi DR, Pearce LR, García-Martínez JM.** New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal*, **2009**; 2(67):27.
85. **Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K.** Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, **2002**; 110:177-89.
86. **Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM.** Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, **2004**; 14:1296-302.
87. **Guertin DA, Sabatini DM.** An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med*, **2005**; 11:353-61.
88. **Wullschleger S, Loewith R, Hall MN.** TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, **2006**; 124:471-48.
89. **Ma XM, Blenis J.** Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**;10: 307-18.
90. **Dunlop EA, Tee AR.** Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal*, **2009**; 21:827-35.
91. **Lorne E, Zhao X, Zmijewski JW, Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E.** Participation of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 in Toll-Like Receptor 2- and 4-Induced Neutrophil Activation and Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **2009**; 41:237-45.
92. **Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL.** Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2005**; 69:79-100.
93. **Yang Q, Guan KL.** Expanding mTOR signaling. *Cell Research*, **2007**; 17:666-81.
94. **Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg, MA, Hall A, Hall MN.** Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, **2004**; 6:1122-8.

95. **Rosner M, Fuchs C, Siegel N, Valli A, Hengstschaöger M.** Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle. *Hum Mol Genet*, **2009**; 18:3298-310.
96. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **2005**; 307 (5712):1098-101.
97. **Manning BD, Cantley LC.** AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, **2007**; 129(7):1261-74.
98. **Laplante M, Sabatini DM.** mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, **2009**; 122 (20):3589-94.
99. **García-Martínez JM, Alessi DR.** mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*, **2008**; 416(3):375-85.
100. **Jacinto E, Lorberg A.** TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J*, **2008**; 410 (1):19-37.
101. **Fingar DC, Blenis J.** Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, **2004**;23:3151–3171.
102. **Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, Breuer S, Thomas G, Hafen E.** Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nat Cell Biol*, **2003**; 5:559-65.
103. **Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL.** TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci*, **2004**; 29:32-8.
104. **Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J.** Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**; 99:13571-6.
105. **Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC.** Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*, **2002**; 10:151-62.
106. **Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL.** TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, **2002**; 4:648-57.
107. **Inoki K, Zhu T, Guan KL.** TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, **2003**; 115:577-90.
108. **Shaw RJ.** LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol*, **2009**; 196(1):65-80.

- 109. Huang J, Manning BD.** The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*, **2008**; 412(2):179-90.
- 110. Inoki K, Zhu T, Guan KL.** TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, **2003**; 115(5):577-90.
- 111. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N.** Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem*, **2005**; 280:32081-9.
- 112. Arsham AM, Howell JJ, Simon MC.** A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem*, **2003**; 278:29655-60.
- 113. Schneider A, Younis RH, Gutkind JS.** Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*, **2008**; 10:1295-302.
- 114. Reiling JH, Sabatini DM.** Stress and mTOR signaling. *Oncogene*, **2006**; 25(48):6373-83.
- 115. Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D.** Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol*, **2002**; 4:699-704.
- 116. Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J.** Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem*, **2005**; 280:23433-6.
- 117. Guertin DA, Sabatini DM.** Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, **2007**; 12(1):9-22.
- 118. Manning BD, Cantley LC.** AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, **2007**; 129(7), 1261-74.
- 119. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD.** The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol*, **2008**; 28(12):4104-15.
- 120. Zhou H, Huang S.** The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr Protein Pept Sci*, **2010**; 11(6):409-24.
- 121. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF.** Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci*, **2005**; 30(1):35-42.
- 122. Dibble CC, Asara JM, Manning BD.** Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol*, **2009**; 29(21):5657-70.

- 123. Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP.** mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol*, **2010**; 30(4):908-21.
- 124. Treins C, Warne PH, Magnuson MA, Pende M, Downward J.** Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene*, **2010**; 29(7):1003-16.
- 125. Kim MS, Kuehn HS, Metcalfe DD, Gilfillan AM.** Activation and function of the mTORC1 pathway in mast cells. *J Immunol*, **2008**; 180:4586-95.
- 126. Nathan C.** Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, **2006**; 6:173-82.
- 127. Hannigan MO, Huang CK, Wu DQ.** Roles of PI3K in neutrophil function. *Curr Top Microbiol Immunol*, **2004**; 282:165-75.
- 128. Lindemann SW, Yost CC, Denis MM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA.** Neutrophils alter the inflammatory milieu by signal-dependent translation of constitutive messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**; 101:7076-81.
- 129. Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B.** Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*, **2000**; 287:1040-6.
- 130. Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T.** Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*, **2002**; 110:737-49.
- 131. Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ.** Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*, **2003**; 107:1664-70.
- 132. Boluyt MO, Zheng JS, Younes A.** Rapamycin inhibits α 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte hypertrophy but not activation of hypertrophy-associated genes. Evidence for involvement of p70 S6 kinase. *Circ Res*, **1997**; 81:176-86.
- 133. Wang L, Proud CG.** Ras/Erk signalling is required for regulation of translation factors linked to mTOR and protein synthesis by hypertrophic agents in cardiomyocytes. *Circ Res*, **2002**; 91:821-9.
- 134. Lieberthal W, Levine JS.** Mammalian target of rapamycin and the kidney. II. Pathophysiology and therapeutic implications. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2012**; 303:180-91.
- 135. Laplante M, Sabatini DM.** mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*, **2012**; 149(2):274-93.
- 136. Faivre S, Kroemer G, Raymond E.** Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev*, **2006**; 5:671-8.

137. **Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN.** Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*, **1998**; 17:313-25.
138. **Dancey J.** mTOR signaling and drug development in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, **2010**; 7:209-19.
139. **Xie Y, Skytting B, Nilsson G.** Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma: association with an aggressive phenotype. *Cancer Res*, **1999**; 59:3588-91.
140. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell*, **2000**; 100:57-70.
141. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **2011**; 144:646-74.
142. **Zhou H, Huang S.** mTOR signaling in cancer cell motility and tumor metastasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **2010**; 20:1-16.
143. **Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S.** The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci*, **2005**; 102:8204-9.
144. **Cornu MaMNH.** mTORC1 and mTORC2 in energy homeostasis. In *The Enzymes: Structure, Function and Regulation of TOR Complexes from Yeasts to Mammals*, vol 28. Edited by Tamanoi F, Hall MN. *Academic Press, Elsevier Inc*; **2010**:263-78.
145. **Rachdi L, Balcazar N, Osorio-Duque F, Elghazi L, Weiss A, Gould A, Chang-Chen KJ, Gambello MJ, Bernal-Mizrachi E.** Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1- dependent manner. *In Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **2008**; 105:9250-5.
146. **Bentzinger CF, Romanino K, Cloetta D, Lin S, Mascarenhas JB, Oliveri F, Xia J, Casanova E, Costa CF, Brink M.** Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metabolism*, **2008**; 8:411-24.
147. **Polak P, Cybulski N, Feige JN, Auwerx J, Ruegg MA, Hall MN.** Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. *Cell Metabolism*, **2008**; 8:399-410.
148. **Mori H, Inoki K, Munzberg H, Opland D, Faouzi M, Villanueva EC, Ikenoue T, Kwiatkowski D, MacDougald OA, Myers MG Jr.** Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metabolism*, **2009**; 9:362-74.
149. **Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, Gorgun C, Kwiatkowski DJ, Hotamisligil GS, Lee CH.** Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metabolism*, **2011**; 14:21-32.
150. **Kenerson HL, Yeh MM, Yeung RS.** Tuberous sclerosis complex-1 deficiency attenuates diet-induced hepatic lipid accumulation. *Plos One*, **2011**; 6:e18075.

151. **Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM.** mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature*, **2010**; 468:1100-4.
152. **Cybulski N, Polak P, Auwerx J, Ruegg MA, Hall MN.** mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2009**; 106:9902-7.
153. **Kumar A, Lawrence JC Jr, Jung DY, Ko HJ, Keller SR, Kim JK, Magnuson MA, Harris TE.** Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism. *Diabetes*, **2010**; 59:1397-406.
154. **Le Bacquer O, Petroulakis E, Pagliarunga S, Poulin F, Richard D, Cianflone K, Sonenberg N.** Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *The Journal of Clinical Investigation*, **2007**; 117:387-96.
155. **Catania C, Binder E, Cota D.** mTORC1 signaling in energy balance and metabolic disease. *International Journal of Obesity*, **2011**; 35:751-61.
156. **Gagnon A, Lau S, Sorisky A.** Rapamycin-sensitive phase of 3T3-L1 preadipocyte differentiation after clonal expansion. *J Cell Physiol*, **2001**; 189:14-22.
157. **Ozcan U, Ozcan L, Yilmaz E, Duvel K, Sahin M, Manning BD, Hotamisligil GS.** Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol Cell*, **2008**; 29:541-51.
158. **Pende M, Kozma SC, Jaquet M, Oorschot V, Burcelin R, Le Marchand- Brustel Y, Klumperman J, Thorens B, Thomas G.** Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*, **2000**; 408:994-7.
159. **Hoefler CA, Klann E.** mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences*, **2010**; 33:67-75.
160. **Garelick MG, Kennedy BK.** TOR on the brain. *Experimental Gerontology*, **2011**; 46:155-63.
161. **Spilman P, Podlitskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R, Galvan V.** Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *Plos One*, **2010**; 5:e9979.
162. **Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ.** Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*, **2004**; 36:585-95.
163. **Pitkanen A.** Therapeutic approaches to epileptogenesis – hope on the horizon. *Epilepsia*, **2010**; 51(Suppl. 3):2-17.

- 164. Ljungberg MC, Sunnen CN, Lugo JN, Anderson AE, D'Arcangelo G.** Rapamycin suppresses seizures and neuronal hypertrophy in a mouse model of cortical dysplasia. *Disease Models & Mechanisms*, **2009**; 2:389-98.
- 165. Uhlmann EJ, Wong M, Baldwin RL, Bajenaru ML, Onda H, Kwiatkowski DJ, Yamada K, Gutmann DH.** Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures. *Annals of Neurology*, **2002**; 52:285-96.
- 166. Saemann MD, Haidinger M, Hecking M, Horl WH, Weichhart T.** The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, **2009**; 9:2655-61.
- 167. Gomez-Cambronero J, Horn J, Paul CC, Baumann MA.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *Journal of Immunology*, **2003**; 171:6846-55.
- 168. Kim MS, Kuehn HS, Metcalfe DD, Gilfillan AM.** Activation and function of the mTORC1 pathway in mast cells. *Journal of Immunology*, **2008**; 180:4586-95.
- 169. Ware LB, Matthay MA.** The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, **2000**; 342:1334-49.
- 170. Vincent JL, Sakr Y, Ranieri VM.** Epidemiology and outcome of acute respiratory failure in intensive care unit patients. *Crit Care Med*, **2003**; 31(4 Suppl):296-9.
- 171. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ.** Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, **1995**; 151:293-301.
- 172. Martin TR, Hagimoto N, Nakamura M, Matute-Bello G.** Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proc Am Thorac Soc*, **2005**; 2:214-220.
- 173. Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Doz E, Noulin N, Janot L.** Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Exp Pathol*, **2007**; 88:387-91.
- 174. Guha M, Mackman N.** The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem*, **2002**; 277:32124-32.
- 175. Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Frei B.** Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2007**; 104:4077-82.
- 176. Yang KY, Arcaroli JJ, Abraham E.** Early alterations in neutrophil activation are associated with outcome in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, **2003**; 167:1567-74.

177. **Abraham E.** Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med*, **2003**; 31(4):195-9.
178. **Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Doz E, Noulin N, Janot L, Secher T, Gasse P, Lima C, Coelho FR.** Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Exp Pathol*, **2007**; 88:387-91.
179. **Dong J, Jimi E, Zhong H, Hayden MS, Ghosh S.** Repression of gene expression by unphosphorylated NF-kappaB p65 through epigenetic mechanisms. *Genes Dev*, **2008**; 22:1159-73.
180. **Nowak DE, Tian B, Jamaluddin M, Boldogh I, Vergara LA, Choudhary S, Brasier AR.** RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclindependent kinase 9/cyclin T1 complexes. *Mol Cell Biol*, **2008**; 28:3623-38.
181. **Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM.** The development of allergic inflammation. *Nature*, **2008**; 454:445-54.
182. **Mushaben EM, Kramer EL, Brandt EB, Khurana Hershey GK, Le Cras TD.** Rapamycin attenuates airway hyperreactivity, goblet cells, and IgE in experimental allergic asthma. *J Immunol*, **2011**; 187:5756-63.
183. **Nagai H, Maeda Y, Tanaka H.** The effect of anti-IL-4 monoclonal antibody, rapamycin and interferon-gamma on airway hyperreactivity to acetylcholine in mice. *Clin Exp Allergy*, **1997**; 27:218-24.
184. **Fujitani Y, Trifilieff A.** In vivo and in vitro effects of SAR 943, a rapamycin analogue, on airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, **2003**; 167:193-8.
185. **Eynott PR, Salmon M, Huang TJ, Oates T, Nicklin PL.** Effects of cyclosporin A and a rapamycin derivative (SAR943) on chronic allergic inflammation in sensitized rats. *Immunology*, **2003**; 109:461-7.
186. **Choi YH, Jin GY, Li LC, Yan GH.** Inhibition of Protein Kinase C Delta Attenuates Allergic Airway Inflammation through Suppression of PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 Alpha/VEGF Pathway. *Plos One*, **2013**; 8(11):e81773. doi: 10.1371/journal.pone.0081773.
187. **Fernandez D, Perl A.** mTOR signaling: a central pathway to pathogenesis in systemic lupus erythematosus? *Discovery Medicine*, **2010**; 9:173-8.
188. **Yang Q, Guan KL.** Expanding mTOR signaling. *Cell Research*, **2007**; 17:666-81.
189. **Akbaba P.** Rapamisin'in Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan İntraabdominal Adezyonların Gelişimi Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, **2006**.

190. **Huang S, Houghton PJ.** Resistance to rapamycin: a novel anticancer drug. *Cancer Metastasis Rev*, **2001**; 20:69-78.
191. **Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL.** Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1995**; 92:4947-51.
192. **Kunz J, Hall MN.** Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci*, **1993**; 18:334-8.
193. **Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J.** Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*, **1996**; 273:239-42.
194. **Helliwell SB, Wagner P, Kunz J, Deuter-Reinhard M, Henriquez R, Hall MN.** TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell*, **1994**; 5:105-18.
195. **Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN.** Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, **2004**; 6:1122-8.
196. **Banaszynski LA, Liu CW, Wandless TJ.** Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *J Am Chem Soc*, **2005**; 127:4715-21.
197. **Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM.** mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, **2002**; 110:163-75.
198. **Zhou H, Luo Y, Huang S.** Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem*, **2010**; 10(7):571-81.
199. **Heffron TP, Berry M, Castanedo G, Chang C, Chuckowree I, Dotson J, Folkes A, Gunzner J, Lesnick JD, Lewis C, Mathieu S, Nonomiya J, Olivero A, Pang J, Peterson D, Salphati L, Sampath D, Sideris S, Sutherlin DP, Tsui V, Wan NC, Wang S, Wong S, Zhu BY.** Identification of GNE-477, a potent and efficacious dual PI3K/mTOR inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**; 20(8):2408-11.
200. **Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chene P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, Garcia-Echeverria C.** Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, **2008**; 7:1851-63.
201. **Zou ZQ, Zhang XH, Wang F, Shen QJ, Xu J, Zhang LN, Xing WH, Zhuo RJ, Li D.** A novel dual PI3K α /mTOR inhibitor PI-103 with high antitumor activity in non-small cell lung cancer cells. *Int J Mol Med*, **2009**; 24:97-101.

202. **Molckovsky A, Siu LL.** First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: Highlights of the 2008 American Society of Clinical Oncology meeting. *J Hematol Oncol*, **2008**; 1:20 doi: 10.1186/1756-8722-1-20.
203. **Li T, Jia W, Wang X, Yang N, Chen SM, Tong LJ, Yang CH, Meng LH, Ding J.** WJD008, a Dual PI3K/mTOR inhibitor, Prevents PI3K Signaling and Inhibits the Proliferation of Transformed Cells with Oncogenic PI3K mutant. *J Pharmacol Exp Ther*, **2010**; 334:830-8.
204. **O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N.** mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, **2006**; 66:1500-8.
205. **Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM.** Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*, **2009**; 7:e38.
206. **Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS.** An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*, **2009**; 284:8023-32.
207. **Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang WG, Lucas J, Shor B, Kim J, Verheijen J, Curran K, Malwitz DJ, Cole DC, Ilingboe J, Ayril-Kaloustian S, Mansour TS, Gibbons JJ, Abraham RT, Nowak P, Zask A.** Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res*, **2009**; 69:6232-40.
208. **Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, Alessi DR.** Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J*, **2009**; 421:29-42.
209. **Beevers CS, Chen L, Liu L, Luo Y, Webster NJ, Huang S.** Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex. *Cancer Res*, **2009**; 69:1000-8.
210. **Jiang H, Shang X, Wu H, Gautam SC, Al-Holou S, Li C, Kuo J, Zhang L, Chopp M.** Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J Exp Ther Oncol*, **2009**; 8:25-33.
211. **Brito PM, Devillard R, Negre-Salvayre A, Almeida LM, Dinis TC, Salvayre R, Auge N.** Resveratrol inhibits the mTOR mitogenic signaling evoked by oxidized LDL in smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **2009**; 205:126-34.
212. **Zhang Q, Kelly AP, Wang L, French SW, Tang X, Duong HS, Messadi DV, Le AD.** Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI3K/Akt signaling pathways. *J Invest Dermatol*, **2006**; 126:2607-13.
213. **Anastasius N, Boston S, Lacey M, Storing N, Whitehead SA.** Evidence that low-dose, long-term genistein treatment inhibits oestradiol-stimulated growth in MCF-7 cells by down-regulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2009**; 116:50-5.

214. Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, Sakai T. A combination of indol-3- carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Mol Cancer*, **2009**; 8:100.
215. Kong D, Banerjee S, Huang W, Li Y, Wang Z, Kim HR, Sarkar FH. Mammalian target of rapamycin repression by 3,3'-diindolylmethane inhibits invasion and angiogenesis in platelet-derived growth factor-D-overexpressing PC3 cells. *Cancer Res*, **2008**; 68:1927-34.
216. Reinke A, Chen JC, Aronova S, Powers T. Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *J Biol Chem*, **2006**; 281:31616-26.
217. Marques FZ, Markus MA, Morris BJ. Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int J Biochem Cell Biol*, **2009**; 41:2125-8.
218. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*, **2008**; 75:787-809.
219. Tunctan B, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Atik U, Buharalioglu CK. Increased production of nitric oxide contributes to renal oxidative stress in endotoxemic rat. *Am J Infect Dis*, **2005**; 1:111-5.
220. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**; 72:248-54.
221. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, **1982**; 126:131-8.
222. Tunctan B, Uludag O, Altug S, Abacioglu N. Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Pharmacol Res*, **1998**; 38:405-11.
223. Golowich SP, Kaplan SD. Methods in enzymology. *Academic Press New York NY*, **1955**; 2:769-82.
224. Korkmaz B, Buharalioglu K, Sahan-Firat S, Cuez T, A. Demiryurek T, Tunctan B. Activation of MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway associated with peroxynitrite formation contributes to hypotension and vascular hyporeactivity in endotoxemic rats. *Nitric oxide*, **2011**; 24:160-72.
225. Wilson CM. Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods in Enzymol*, **1983**; 91:236-47.
226. Salinovich O, Montelano RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **1986**; 156:341-7.

227. Carré JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta*, **2008**; 1777:763-71.
228. Fernandes D, Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock*, **2008**; 30:10-3.
229. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit*, **2005**; 11:76-85.
230. Tunctan B, Korkmaz B, Cuez T, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Falck J, Malik KU. Contribution of vasoactive eicosanoids and nitric oxide production to the effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, on endotoxin-induced hypotension in rats. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, **2010**; 107:877-82.
231. Tunctan B, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Korkmaz B, Falck JR, Malik KU. NS-398 reverses hypotension in endotoxemic rats: contribution of eicosanoids, NO, and peroxynitrite. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **2013**; 104-105:93-108.
232. Doursout MF, Horton H, Hoang L, Liang Y, Hwang SA, Boyd S, Actor JK, Kruzel ML. Lactoferrin moderates LPS-induced hypotensive response and gut injury in rats. *International Immunopharmacology*, **2013**; 15:227-31.
233. Liao MH, Shih CC, Tsao CM, Chen SJ, Wu CC. RhoA/Rho-Kinase and nitric oxide in vascular reactivity in rats with endotoxaemia. *Plos One*, 2013; 8(2):e56331.
234. Kramer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, Binder E, Loof T, Khadzhynov D, Kawachi H, Shimizu F, Diekmann F, Budde K, Neumayer H, Peters H. Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2008**; 294:440-9.
235. Diekmann F, Rovira J, Carreras J, Arellano EA, Bonon-Maneus E, Ramirez-Bajo MJ, Gutierrez-Dalmau A, Brunet M, Campistol JM. Mammalian target of rapamycin inhibition halts progression of proteinuria in a rat model of reduced renal mass. *J Am Soc Nephrol*, **2007**; 18:2653-60.
236. Yang Y, Wang J, Qin L, Shou Z, Zhao J, Wang H, Chen Y, Chen J. Rapamycin prevents early steps of development of diabetic nephropathy in rats. *Am J Nephrol*, **2007**; 27:495-502.
237. Buharalioglu CK, Korkmaz B, Cuez T, Sahan-Firat S, Sari AN, Malik KU, Tunctan B. Piroxicam reverses endotoxin-induced hypotension in rats: contribution of vasoactive eicosanoids and nitric oxide. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **2011**; 109:186-94.
238. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev*, **2005**; 57:217-52.
239. Cuzzocrea S, Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney Int*, **2007**; 71:290-7.

240. **Suba EA, McKenna TM, Williams TJ.** In vivo and in vitro effects of endotoxin on vascular responsiveness to norepinephrine and signal transduction in the rat. *Circ Shock*, **1992**; 36:127-33.
241. **Thiemermann C.** The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock, *Adv. Pharmacol*, **1994**; 28:45-79.
242. **Dello Russo C, Lisi L, Tringali G, Navarra P.** Involvement of mTOR kinase in cytokine-dependent microglial activation and cell proliferation. *Biochem Pharmacol*, **2009**; 78:1242-51.
243. **Jin HK, Ahn SH, Yoon JW, Park JW, Lee EK, Yoo JS, Lee JC, Choi WS, Han JW.** Rapamycin down-regulates inducible nitric oxide synthase by inducing proteasomal degradation. *Biol Pharm Bull*, **2009**; 32(6):988-92.
244. **Chou YY, Gao JI, Chang SF, Chang PY, Lu SC.** Rapamycin inhibits lipopolysaccharide induction of granulocyte-colony stimulating factor and inducible nitric oxide synthase expression in macrophages by reducing the levels of octamer-binding factor-2. *FEBS Journal*, **2011**; 278:85-96.
245. **Nishizawa M, Tsuchiya M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S.** Multiple elements in the promoter of granulocyte colony-stimulating factor gene regulate its constitutive expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*, **1990**; 265:5897-902.
246. **Nishizawa M, Nagata S.** Regulatory elements responsible for inducible expression of the granulocyte colony-stimulating factor gene in macrophages. *Mol Cell Biol*, **1990**; 10:2002-11.
247. **Lu SC, Chang SF, Chen HL, Chou YY, Lan YH, Chuang CY, Yu WH, Chen CL.** A novel role for Oct-2 in the lipopolysaccharide-mediated induction of resistin gene expression in RAW264.7 cells. *Biochem J*, **2007**; 402:387-95.
248. **Lu SC, Wu HW, Lin YJ, Chang SF.** The essential role of Oct-2 in LPS-induced expression of iNOS in RAW 264.7 macrophages and its regulation by trichostatin A. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2009**; 96:1133-9.
249. **Duncan MW.** A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*, **2003**; 25:351-61.
250. **Guc MO.** Endotoxin-endothelium interactions in low-perfusion state research. *J Physiol Pharmacol*, **1999**; 50:541-50.
251. **van der Vliet A, Eiserich JP, Kaur H, Cross CE, Halliwell B.** Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol*, **1996**; 269:175-84.
252. **Zhang HX, Duan GL, Wang CN, Zhang YQ, Zhu XY, Liu YJ.** Protective effect of resveratrol against endotoxemia-induced lung injury involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **2014**; 27:150-5.

253. Whaley-Connell AT, Habibi J, Nistala R, DeMarco WG, Pulakat L, Hayden MR, Joginpally T, Ferrario CM, Parrish AR, Sowers JR. Mineralocorticoid receptor-dependent proximal tubule injury is mediated by a redox-sensitive mtor/s6k1 pathway. *Am J Nephrol*, **2012**; 35:90-100.
254. Yalcin S, Marinkovic D, Mungamuri SK, Zhang X, Tong W, Sellers R, Ghaffari S. ROS mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3^{-/-} mice. *EMBO J*, **2010**; 29:4118-31.
255. Attur MG, Patel R, Thakker G, Vyas P, Levartovsky D, Patel P, Naqvi S, Raza R, Patel K, Abramson D, Bruno G, Abramson SB, Amin AR. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: Cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflamm Res*, **2000**; 49:20-6.
256. Lee PS, Wilhelmson ASK, Hubner Ap, Reynolds SB, Gallacchi DA, Chiou TT, Kwiatkowski DJ. mTORC1-S6K Activation by Endotoxin Contributes to Cytokine Up-Regulation and Early Lethality in Animals. *Plos one*, **2010**; 5(12):e14399.
257. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. IKK β Suppression of TSC1 Links Inflammation and Tumor Angiogenesis via the mTOR Pathway. *Cell*, **2007**; 130(3):440-55.
258. Radhakrishnan P, Bryant VC, Blowers EC, Rajule RN, Gautam N, Anwar MM, Mohr AM, Grandgenett PM, Bunt SK, Arnst JL, Lele SM, Alnouti Y, Hollingsworth MA, Natarajan A. Targeting the NF- κ B and mTOR pathways with a quinoxaline urea analog that inhibits IKK β for pancreas cancer therapy. *Clin Cancer Res*, **2013**; 19(8):2025-35.
259. Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**; 95:3537-42.
260. Suzuki H, Chiba T, Kobayashi M, Takeuchi M, Suzuki T, Ichiyama A, Ikenoue T, Omata M, Furuichi K, Tanaka K. IkappaBalpha ubiquitination is catalyzed by an SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-box/WD40-repeat proteins, betaTrCP1 and betaTrCP2. *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**; 256:127-32.
261. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, **2008**; 132:344-62.
262. Liou HC, Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol*, **1993**; 5:477-87.
263. Omura T, Yoshiyama M, Izumi Y, Kim S, Matsumoto R, Enomoto S, Kusuyama T, Nishiya D, Nakamura Y, Akioka K. Involvement of c-Jun NH2 terminal kinase and p38MAPK in rapamycin-mediated inhibition of neointimal formation in rat carotid arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, **2005**; 46:519-25.

264. Sun Q, Liu Q, Zheng Y, Cao X. Rapamycin suppresses TLR4-triggered IL-6 and PGE(2) production of colon cancer cells by inhibiting TLR4 expression and NF- κ B activation. *Mol Immunol*, **2008**; 45:2929-36.
265. Lee DF, Hung MC. All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis. *Cell Cycle*, **2007**; 6:3011-4.
266. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*, **2007**; 130:440-55.
267. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Wei Y, Chou CK, Hung JY, Yen CJ, Hung MC. IKKbeta suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance. *Int J Mol Med*, **2008**; 22:633-8.
268. Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Gutierrez B, Culebras JM, Javier Gonzalez-Gallego J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, **2003**; 66:439-45.
269. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**; 261:917-22.
270. Wang S, Bo Q, Zhao X, Yang X, Chi Z, Liu X. Resveratrol pre-treatment reduces early inflammatory responses induced by status epilepticus via mTOR signaling. *Brain research*, **2013**; 1492:122-9.
271. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci*, **2005**; 25:11288-99.
272. Wang Y, Liu Y, Zhang XY, Xu LH, Ouyang DY, Liu KP, Pan H, He J, Xian-Hui He XH. Ginsenoside Rg1 regulates innate immune responses in macrophages through differentially modulating the NF- κ B and PI3K/Akt/mTOR pathways. *International Immunopharmacology*, **2014**; 23:77-84
273. Zhang T, Lu X, Li J, Chidiac P, Sims SM, Feng Q. Inhibition of Na/K-ATPase promotes myocardial tumor necrosis factor- α protein expression and cardiac dysfunction via calcium/mTOR signaling in endotoxemia. *Basic Res Cardiol*, **2012**; 107:254-65.
274. Fielhaber JA, Carroll SF, Dydensborg AB, Shourian M, Triantafillopoulos A, Harel S, Hussain SN, Bouchard M, Qureshi ST, Arnold S, Kristof AS. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Augments Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury and Apoptosis. *J Immunol*, **2012**; 188:4535-42.
275. Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, Zou H, Qiu J. Activation of Sirt1 by Resveratrol Inhibits TNF- α Induced Inflammation in Fibroblasts. *Plos one*, **2011**; 6(11):27081-8.

- 276. Lisi L, Navarra P, Feinstein DL, Dello Russo C.** The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes. *J Neuroinflammation*, **2011**; 8:1.
- 277. Plaisance I, Morandi C, Murigande C, Brink M.** TNF-alpha increases protein content in C2C12 and primary myotubes by enhancing protein translation via the TNF-R1, PI3K, and MEK. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2008**; 294:241-50.
- 278. Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, Rodan GA, Reszka AA.** MCSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ*, **2003**; 10:1165-77.
- 279. Lang CH, Pruznak AM, Frost RA.** TNFalpha mediates sepsis-induced impairment of basal and leucine-stimulated signaling via S6K1 and eIF4E in cardiac muscle. *J Cell Biochem*, **2005**; 94:419-31.
- 280. Bonegio RG, Fuhro R, Wang Z, Valeri CR, Andry C.** Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, **2005**; 16:2063-72.
- 281. Liu M, Agreda P, Crow M, Racusen L, Rabb H.** Effects of delayed rapamycin treatment on renal fibrosis and inflammation in experimental ischemia reperfusion injury. *Transplant Proc*, **2009**; 41:4065-71.
- 282. Wei D, Huang Z.** Anti-inflammatory effects of triptolide in lps-induced acute lung injury in mice. *Inflammation*, **2014**; 37(4):1307-16.

ÖZ GEÇMİŞ

Meryem TEMİZ 10/12/1988 yılında Mersin’de doğmuştur. İlköğretimini İleri İlköğretim okulunda ve lise öğrenimini Mersin Salim Yılmaz Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. 2012 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun olmuştur. Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalında, 2012-2013 Eğitim-Öğretim Yılı Bahar Dönemi'nde Yüksek Lisans Programı'na başlamıştır. 17/12/2013 tarihinden itibaren Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir. İngilizce (ÜDS: 70) bilmektedir.