

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

**ENDOTOKSEMİK SIÇANLARDA 20-HETE ANALOĞU
5,14-HEDGE'NİN SİSTEMİK MİR-150, MİR-223 VE MİR-297
DÜZEYLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MYD88/TAK1/NF-κB YOLU
ETKİNLİĞİ İLE İLİŞKİLENDİRİLEREK ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Ecz. Ayşe Nihal SARI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

MERSİN - 2013

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

"Eczacılık Farmakolojisi Ana Bilim Dalı Eczacılık Farmakolojisi Doktora Programı"
çerçevesinde yürütülmüş olan "Endotoksemik şoklarda 20-HETE analogu
5,14-HEDGE'NİN SİSTEMİK MİR-150, MİR-223 VE MİR-297
DÜZEYLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MYD88/TAK1/NF-κB YOLU
ETKİNLİĞİ İLE İLİŞKİLENDİRİLEREK ARAŞTIRILMASI

Uzm. Ecz. Ayşe Nihal SARI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE EMBB (ANS) 2012-4 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 38

MERSİN - 2013

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

"Eczacılık Farmakoloji Ana Bilim Dalı Eczacılık Farmakoloji Doktora Programı" çerçevesinde yürütülmüş olan "Endotoksemik sıçanlarda 20-HETE analogu 5,14-HEDGE'nin sistemik miR-150, miR-223 ve miR-297 düzeyleri üzerindeki etkisinin MyD88/TAK1/NF-κB yolu etkinliği ile ilişkilendirilerek araştırılması" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/08/2013

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

Doç. Dr. Orhan ULUDAĞ
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Jüri Üyesi

Doç. Dr. C. Kemal BUHARALIOĞLU
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Jüri Üyesi

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

Yrd. Doç. Dr. Belma KORKMAZ
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 23.08.2013 tarihli ve 2013/161 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Necat YILMAZ

TEŞEKKÜR

Tez dönemim boyunca benden desteğini esirgemeyen, tecrübeleri ile her türlü yardımda bulunan tez danışman hocam, Ana Bilim Dalı Baőkanımız Prof. Dr. Sn. Bahar TUNÇTAN'a teşekkür ederim.

Tez çalıőmalarımda yardımını ve dostluğunu esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sn. Belma KORKMAZ'a, teşekkür ederim.

Tez çalıőmam süresince bilgilerini ve tecrübelerini paylaőmaktan çekinmeyen Doç. Dr. Sn. Seyhan ŞAHAN FIRAT'a ve Doç. Dr. Sn. C. Kemal BUHARALIOğLU'na, yardımlarından dolayı Ecz. Sn. Meltem KAÇAN'a, Ecz. Sn. Demet ÜNSAL'a, Yüksek Lisans Öğrencisi Sn. Meryem TEMİZ'e, ayrıca miRNA düzeylerinin ölçümü aőamasında katkıları ile destek olan Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN'e ve Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezinde görev yapan Uzm. Engin KAPLAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xxii
ABSTRACT	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Septik Şok	6
2.1.1. Epidemiyolojisi	8
2.1.2. Etiyolojisi	9
2.1.3. Patofizyolojisi	10
2.1.4. Tedavisi	27
2.2. 20-HETE	36
2.2.1. Özellikleri	36
2.2.2. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	36
2.3. miRNA	47
2.3.1. Özellikleri	47
2.3.2. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	52

3. GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1. Gereç	55
3.1.1. Deney Hayvanı	55
3.1.2. Sarf Malzemesi	55
3.1.3. Teçhizat	59
3.2 Yöntem	60
3.2.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	60
3.2.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması ve miR-150, miR-223 ve miR-297 Ekspresyon Düzeylerinin Ölçülmesi	61
3.2.3. Doku Örneklerinde Toplam Protein Düzeyinin Belirlenmesi	65
3.2.4. Doku Örneklerinde Sitozolik MyD88, TAK1, Fosforile TAK1, IκB-α ve Fosforile IκB-α ile Sitozolik/Nükleer NF-κB p65, Fosforile NF-κB p65 ve Aktin Protein Düzeylerinin Ölçülmesi	66
3.2.5. İmmünoreaktif Proteinlerin Analizi	71
3.2.1. Verilerin Analizi	71
4. BULGULAR	72
4.1. 5,14-HEDGE'nin LPS'ye Verilen Kardiyovasküler Yanıt Üzerindeki Etkisi	72
4.2. 5,14-HEDGE'nin Kontrol ve Endotoksemik Sıçanların Serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 Ekspresyon Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	75
4.3. 5,14-HEDGE'nin Kontrol ve Endotoksemik Sıçanların Böbrek, Kalp, Torasik Aort ve Süperiyor Mezenterik Arterlerinde Aktin, MyD88, TAK1, IκB-α ile NF-κB p65 Protein Ekspresyonları ve/veya Fosforilasyonları Üzerindeki Etkisi	78
4.3.1. 5,14-HEDGE'nin Aktin Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	78
4.3.2. 5,14-HEDGE'nin Sitozolik MyD88 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	80

4.3.3. 5,14-HEDGE'nin Sitolik TAK1 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi	83
4.3.4. 5,14-HEDGE'nin Sitolik IκB-α Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi	86
4.3.5. 5,14-HEDGE'nin Sitolik ve Nükleer NF-κB p65 Protein Ekspresyonu ile Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi	89
5. TARTIŞMA	98
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	106
7. KAYNAKLAR	108
ÖZ GEÇMİŞ	132

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. LPS yapısının şematik gösterimi	11
Şekil 2.2. Memeli bir konakta enflamasyon ile sonuçlanan LPS/TLR4 aracılıklı sinyalleme yolu etkinliğinin şematik gösterimi	13
Şekil 2.3. MyD88'e bağımlı ve MyD88'den bağımsız LPS/TLR4 sinyalleme yollarının şematik gösterimi	14
Şekil 2.4. NF- κ B'nin etkinleşmesiyle sonuçlanan TLR4 sinyalleme yollarının şematik gösterimi	16
Şekil 2.5. Klasik ve klasik olmayan NF- κ B yollarının şematik gösterimi	18
Şekil 2.6. Klasik ve klasik olmayan yollarda NF- κ B etkinleşme kaskadının şematik gösterimi	19
Şekil 2.7. NF- κ B'nin septik şok patofizyolojindeki rolünün şematik gösterimi	26
Şekil 2.8. Septik şok tedavisinde patojenezde rol oynayan mediyatörlere yönelik tedavi yaklaşımları	28
Şekil 2.9. Septik şoklu infantlar ve çocuklarda hemodinamik desteğin sürdürülmesi için önerilen zamana duyarlı ve amaca yönelik algoritma	35
Şekil 2.10. Arakidonik asidin CYP'ye bağımlı monooksijenazlar (ω -hidroksilazlar ve epoksijenazlar) tarafından ω - ve ω -1-HETE'ler, epoksitler (EET'ler) ve diollere (DHT'lere) metabolizması	37
Şekil 2.11. 20-HETE'nin kan basıncını düzenleyici etkisi ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizma	38
Şekil 2.12. CYP aracılığı ile oluşan arakidonik asit metabolitlerinin damar gerimi üzerindeki etkileri ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar	38
Şekil 2.13. Renal ve serebral arterlerde potasyum kanal etkinliği ve damar gerimi üzerinde NO'nun etkileri ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar	40

Şekil 2.14. 20-HETE'nin neden olduğu endotelial işlev bozukluğu ve etkinleşmesi ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar	41
Şekil 2.15. Endotoksinin neden olduğu vasküler hiporeaktivite, hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve yaşam süresi üzerinde iNOS, çGS, PKG, COX-1, COX-2, CYP4A1 ve gp91 ^{phox} 'un katkısı ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar ...	45
Şekil 2.16. Endotoksinin neden olduğu hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve yaşam süresi üzerinde çEH, CYP2C23 ve MEK1/ERK1/2/IKKβ/IκB-α/NF-κB yolu ile enflamatuvar sitokin oluşumunun katkısı ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar	46
Şekil 2.17. miRNA biyogenezisi ve etki mekanizması ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar	49
Şekil 2.18. miRNA biyogenezisi ve etki mekanizması ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar	50
Şekil 2.19. miRNA biyogenezisi ve etki mekanizması ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar	51
Şekil 2.20. miRNA ekspresyonu veya işlevinin deregülasyonu için ileri sürülen mekanizmalar	54
Şekil 4.1. Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda 5,14-HEDGE'nin (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi	74
Şekil 4.2. Kontrol ve endotoksemik sıçanların serumlarında (A) miR-150, (B) miR-223 ve (C) miR-297 ekspresyonu düzeyleri üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	77
Şekil 4.3. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik MyD88 protein ekspresyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	82
Şekil 4.4. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik TAK1 protein fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	85

Şekil 4.5. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik I κ B- α protein fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	88
Şekil 4.6. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik ve nükleer NF- κ B p65 protein fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	93
Şekil 4.7. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde nükleer NF- κ B p65 ve fosforile NF- κ B p65 protein oranının, sitozolik NF- κ B p65 ve fosforile NF- κ B p65 protein oranı üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	96
Şekil 5.1 Endotoksemik sıçanlarda 5,14-HEDGE'nin sistemik miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile MyD88/TAK1/IKK β /NF- κ B yolu ekspresyon ve etkinliği üzerindeki etkisi ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizma	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Konakta enfeksiyona maruziyet sonucunda başlayan ve çoklu organ yetmezliğine dek gidebilen durumlar ile ilgili tanımlar	7
Çizelge 2.2. Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için <i>Surviving Sepsis Campaign</i> 'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar	30
Çizelge 2.3. Sepsiste hedeflere yönelik tedavi seçenekleri	
Çizelge 3.1. Serum, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arter örneklerinde ölçülen parametreler	61
Çizelge 3.2. <i>miRNAeasy serum/plasma spike-in control</i> standart eğrisi için cDNA dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan cDNA/çözelti miktarları	64
Çizelge 3.3. miR-150, miR-223, miR-297 ve Hs_RNU6B_2 ekspresyon düzeylerinin ölçülmesinde kullanılan qRT-PCR koşulları	65
Çizelge 3.4. Sitozolik MyD88, TAK1, fosforile TAK1, IκB-α ve fosforile IκB-α ile sitozolik/nükleer NF-κB p65, fosforile NF-κB p65 ve aktin protein düzeylerinin ölçülmesinde yapılan işlemler ve kullanılan antikorların özellikleri	69
Çizelge 4.1. Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda 5,14-HEDGE'nin OAB ve KH üzerindeki etkisi	73
Çizelge 4.2. Kontrol ve endotoksemik sıçanların serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	76
Çizelge 4.3. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik ve nükleer aktin protein ekspresyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	79
Çizelge 4.4. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik MyD88 protein ekspresyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	81

Çizelge 4.5. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik TAK1 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	84
Çizelge 4.6. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik I κ B- α protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	87
Çizelge 4.7. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik ve nükleer NF- κ B p65 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	91
Çizelge 4.8. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nükleer NF- κ B p65 ve fosforile NF- κ B p65 protein oranının, sitozolik NF- κ B p65 ve fosforile NF- κ B p65 protein oranı üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1,3-PBIT	Fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüüre) dihidrobromür (<i>phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide</i>)
20-HEDE	20-Hidroksieikoz-6(Z),15(Z)-dienoik asit (<i>20-hydroxieicosa-6[Z],15[Z]-dienoic acid</i>)
20-HETE	20-Hidroksieikozatetraenoik asit (<i>20-hydroxieicosatetraenoic acid</i>)
5,14-HEDGE	N-(20-Hidroksieikoz-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin (<i>N-[20-hydroxyeicosa-5(Z),14(Z)-dienoyl]glycine</i>)
5-LO	<i>5-Lipoxygenase</i>
A	<i>Acetylation</i>
AA	Arakidonik asit (<i>arachidonic acid</i>)
ACTH	Adrenokortikotropik hormon (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AGO	Argonat (<i>argonaute</i>)
Ago	Argonat (<i>argonaute</i>)
Akt	<i>Protein kinase B</i>
AMP	Guanozin 5'-monofosfat (<i>guanosine 5'-monophosphate</i>)
AngII	<i>Angiotensin II</i>
ANOVA	Varyans analizi (<i>analysis of variance</i>)
AP	Etkinleştirici protein (<i>activating protein</i>)
ARDS	İveğen solunum sıkıntısı sendromu (<i>acute respiratory distress syndrome</i>)
AT III	<i>Antithrombin III</i>
ATF	<i>Activating transcription factor-2</i>
BAFF/Blys	<i>B-cell activating factor/B lymphocyte stimulator</i>

BAFFR	Tümör nekroze edici faktör ailesi reseptörüne ait B hücrelerini etkinleştirici faktör (<i>B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor</i>)
Bcl	B hücreleri lenfoma proteini (<i>B-cell lymphoma protein</i>)
BCR	B hücreleri reseptörü (<i>B-cell receptor</i>)
BPI	<i>Bactericidal permeability-increasing protein</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CBP	Siklik adenosin 5'-monofosfat yanıt elementini bağlayıcı proteini bağlayıcı proteini (<i>cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein binding protein</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
cGMP	Siklik guanozin 5'-monofosfat (<i>cyclic guanosine 5'-monophosphate</i>)
CINC	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>
CKII	<i>Casein kinase II</i>
COX	Siklooksijenaz (<i>cyclooxygenase</i>)
CREB	<i>Cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein</i>
C-Src	<i>c-Src tyrosine kinase</i>
CT	<i>Comparative threshold cycle</i>
CVP	<i>Central venous pressure</i>
CYP	Sitokrom P450 (<i>cytochrome P450</i>)
çGS	Çözünbilir guanilil siklaz (<i>soluble guanylyl cyclase</i>)
çEH	Çözünbilir epoksit hidrolaz (<i>soluble epoxide hydrolase</i>)
dk.	Dakika
DA	<i>Deacetylation</i>
DAG	<i>Diacyl glycerol</i>

dl	Desilitre
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DHET	<i>Dihydroxyeicosatrienoic acid</i>
DHT	<i>Dihydroxyeicosatrienoic acid</i>
DIC	<i>Disseminated intravascular coagulation</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Ditiyotreytol (<i>dithiothreitol</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECMO	<i>Extracorporeal membrane oxygenation</i>
ECSIT	<i>Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EET	Epoksieikozatrienoik asit (<i>epoxyeicosatrienoic acid</i>)
EETs	<i>Epoxyeicosatrienoic acids</i>
eNOS	Endoteliyal nitrik oksit sentaz (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FATD	<i>Femoral artery thermodilution</i>
F _I O ₂	İnspirasyonla alınan oksijen fraksiyonu (<i>fraction of inspired oxygen</i>)
FLAP	<i>5-Lipoxygenase-activating protein</i>
GMP	Guanozin 5'-monofosfat (<i>guanosine 5'-monophosphate</i>)
GTP	Guanozin 5'-trifosfat (<i>guanosine 5'-triphosphate</i>)
GW182	<i>Glycine-tryptophan 182-kDa protein</i>
HCl	Hidroklorik asit (<i>hydrochloric acid</i>)
Hgb	<i>Hemoglobin</i>
HETE	Hidroksieikozatetraenoik asit (<i>hydroxieicosatetraenoic acid</i>)
HMG-1	<i>High mobility group I</i>
HMGA2	<i>High mobility group AT-hook 2</i>
HMG I(Y)	<i>High mobility group I[Y]</i>

hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
ICAM	Hücre içi adezyon molekülü (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
I κ B	κ B inhibitörü (<i>inhibitor of κB</i>)
I- κ B	κ B inhibitörü (<i>inhibitor of κB</i>)
IFN	İnterferon (<i>interferon</i>)
IKK	I κ B kinaz (<i>IκB kinase</i>)
IKK ϵ	I κ B kinaz ϵ (<i>IκB kinase ϵ</i>)
IKK δ	<i>IκB kinases</i>
IL	İnterlökin (<i>interleukin</i>)
IL-1ra	<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>
IO	<i>Intraosseous, intraosseously</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>)
IV	<i>Intravenous, intravenously</i>
IM	<i>Intramuscular, intramuscularly</i>
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
i.p.	İntraperitoneal (<i>intraperitoneal, intraperitoneally</i>)
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
junD	<i>Jun protein D</i>
KCl	Potasyum klorür (<i>potassium chloride</i>)
kg	Kilogram
KH	Kalp hızı
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat (<i>potassium dihydrogen phosphate</i>)
LBP	Lipit bağlayıcı protein (<i>lipid-binding protein</i>)
5-LO	<i>5-Lipoxygenase</i>
l	Litre
LPS	Lipopolisakkarit (<i>lipopolysaccharide</i>)

LTB	<i>Leukotriene B</i>
LTD	<i>Leukotriene D</i>
LTE	<i>Leukotriene E</i>
LT- β R	Lenfokin- β reseptörü (<i>lymphokine-β receptor</i>)
LT β R	Lenfotoksin- β reseptörü (<i>lymphotoxin β-receptor</i>)
Mab	<i>Monoclonal antibody</i>
MAIL	<i>Molecule possessing ankyrin-repeats induced by lipopolysaccharide</i>
MAP	<i>Mean arterial pressure</i>
MAPK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MD2	<i>Lymphocyte antigen 96</i>
MD-2	Lenfosit antijen 96 (<i>lymphocyte antigen 96</i>)
MEK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz (<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
MEKK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz/ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (<i>mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase</i>)
mg	Miligram
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
miR	Mikroribonükleik asit (<i>microribonucleic acid</i>)
miRNA	Mikroribonükleik asit (<i>microribonucleic acid</i>)
miRNP	<i>Microribonucleic acid particle</i>
MKK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz (<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)

mRNA	Haberci ribonükleik asit (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MyD	Miyeloit farklılaşma faktörü (<i>myeloid differentiation factor</i>)
NaCl	Sodyum klorür (<i>sodium chloride</i>)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat (<i>sodium bicarbonate</i>)
NAK	Nükleer faktör κ B etkinleştirici kinaz (<i>nuclear factor κB-activating kinase</i>)
NAP	Nükleer faktör κ B etkinleştirici kinaz ile ilişkili protein (<i>nuclear factor κB-activating kinase-associated protein</i>)
NE	<i>Norepinephrine</i>
NEMO	Nükleer faktör κ B esansiyel düzenleyicisi (<i>nuclear factor κB essential modulator</i>)
NF κ B	Nükleer faktör κ B (<i>nuclear factor κB</i>)
NF- κ B	Nükleer faktör κ B (<i>nuclear factor κB</i>)
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T cell</i>
NIK	Nükleer faktör κ B indükleyici kinaz (<i>nuclear factor κB-inducing kinase</i>)
NO	Nitrik oksit (<i>nitric oxide</i>)
NOS	Nitrik oksit sentaz (<i>nitric oxide synthase</i>)
NS-398	N-(2-sikloheksiloksi-4-nitrofenil)-metansülfonamid (<i>N-[2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl]-methansulphonamide</i>)
O ₂ ⁻	<i>Superoxide</i>
OAB	Ortalama arter basıncı
ORF	<i>Open reading frame</i>
Oxy	<i>S-glutathionylation</i>
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>
PAF-AH	<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase</i>
PAFra	<i>Platelet activating factor receptor antagonist</i>
PAI	<i>Plasminogen-activator inhibitor type</i>
PARP	Poli (adenozin difosfat-riboz) polimeraz <i>(poly [adenosine diphosphate-ribose] polymerase)</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PG	Prostaglandin (<i>prostaglandin</i>)
PGE	Prostaglandin E (<i>prostaglandin E</i>)
PGF	Prostaglandin F (<i>prostaglandin F</i>)
PGH	Prostaglandin H (<i>prostaglandin H</i>)
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (<i>prostaglandin I₂</i>); prostasiklin (<i>prostacyclin</i>)
pIκB	<i>Phosphorylated inhibitor of κB</i>
p-I-κB	<i>Phosphorylated inhibitor of κB</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PICCO	<i>Pulse index contour cardiac output</i>
PICU	<i>Pediatric intensive care unit</i>
PI-PLC	<i>Phosphatidylinositol-specific phospholipase C</i>
PIV	<i>Peripheral intravenous</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>)
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PLA	<i>Phospholipase A</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PMX B	<i>Polymyxin B</i>
p-NF-κB	Fosforile nükleer faktör κB (<i>phosphorylated nuclear factor κB</i>)
Pol	<i>Ribonucleic acid polymerase</i>

PPAR	Peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör (<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
p-VASP	<i>Phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RANK	Nükleer faktör κ B için reseptör etkinleştiricisi (<i>receptor activator for nuclear factor κB</i>)
rhAPC	<i>Recombinant human activated protein C</i>
RIP	Reseptör ile etkileşen protein (<i>receptor-interacting protein</i>)
RISC	Ribonükleik asit ile indüklenen susturma kompleksi (<i>ribonucleic acid-induced silencing complex</i>)
RNA	Ribonükleik asit (<i>ribonucleic acid</i>)
RNA pol	<i>Ribonucleic acid polymerase</i>
RNA Pol	<i>Ribonucleic acid polymerase</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTMM	<i>Reverse transcription master mix</i>
RTR	<i>Reverse transcription reaction</i>
sa.	Saat
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.k	Subkütan (<i>subcutaneous, subcutaneously</i>)
SCF β TrCP	<i>Skp1-Cull1-Roc1-F-box ubiquitin ligaz kompleksi</i> (<i>Skp1-Cull1-Roc1-F-box ubiquitin ligase complex</i>)
ScvO ₂	<i>Central venous oxygen saturation</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sEH	<i>Soluble epoxide hydrolase</i>
sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i>
SIRS	Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (<i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
siRNAs	<i>Small interfering RNAs</i>
SKB	Sistolik kan basıncı (<i>systolic blood pressure</i>)

Sn.	Saniye
S-NO	<i>S-Nitrosylation</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
snRNA	<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>
SOD	Süperoksit dizmutaz (<i>superoxide dismutase</i>)
sPLA	<i>Secretory phospholipase A₂</i>
SSA	Sığır serum albumini (<i>bovine serum albumin</i>)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAB	<i>Transforming growth factor-activated kinase-binding protein</i>
TABs	<i>Transforming growth factor-activated kinase-binding proteins</i>
TAK	Transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz (<i>transforming growth factor-activated kinase</i>)
TANK	Tümör nekroze edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör ile üyesi nükleer faktör κ B etkinleştiricisi (<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κB activator</i>)
TBK	Tümör nekroze edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör aile üyesi ile ilişkili nükleer faktör κ B etkinleştiricisini bağlayan kinaz (<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κB-activator-binding kinase</i>)
TBXA	<i>Thromboxane A₂</i>
TCR	T hücresi reseptörü (<i>T-cell receptor</i>)
TE	Tris/etilendiamintetraasetik asit (<i>tris-ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin</i> (<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>)
TF	<i>Tissue factor</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF	<i>Tubuloglomerular feedback</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>
TNCR6	<i>Trinucleotide repeat-containing 6 protein</i>
TNF	Tümör nekroze edici faktör (<i>tumor necrosis factor</i>)
TNFR	Tümör nekroze edici faktör reseptörü (<i>tumor necrosis factor receptor</i>)
TNFRI	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TPR	<i>Total peripheral resistance</i>
TR	<i>Transcription</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain protein</i>
TRAF	Tümör nekroze edici 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>
trkC	<i>Tropomyosin-related kinase C</i>
TTÇ	Tris tampon çözeltisi
U	<i>Ubiquitination</i>
U0126	1,4-Diamino-2,3-disiyano-1,4-bis[2-aminofeniltiyo]bütadien (<i>1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien</i>)
Ub	<i>Ubiquitination</i>
μ l	Mikrolitre
UTR	<i>Untranslated region</i>
VASP	Vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein (<i>Phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>)
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
YKST	Yağsız kurutulmuş süt tozu (<i>non-fat dry milk</i>)

ÖZET

Endotoksemik Sıçanlarda 20-HETE Analogu 5,14-HEDGE'nin Sistemik miR-150, miR-223 ve miR-297 Düzeyleri Üzerindeki Etkisinin MyD88/TAK1/NF- κ B Yolu Etkinliği ile İlişkilendirerek Araştırılması

Bu çalışmada, sistemik yoldan dayanıklı bir 20-hidroksieikozatetraenoik asit (20-HETE) analoğu olan ve endojen olarak oluşan 20-HETE'nin etkilerini taklit ettiği bilinen *N*-(20-hidroksieikoz-5[Z],14[Z]-dienoil) glisin (5,14-HEDGE) uygulandığında, gerek kontrol ve gerekse endotoksemik sıçanların serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile renal, kardiyak ve vasküler dokularında sitozolik miyeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88), sitozolik transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz (TAK1), I κ B kinaz (IKK) β ve κ B inhibitörü α (I κ B- α) ile sitozolik/nükleer nükleer faktör κ B (NF- κ B) p65 protein ekspresyonları ve/veya etkinliklerinin ne yönde değiştiği araştırıldı. Deneylerde kontrol grubu olarak serum fizyolojik ve septik şok grubu olarak lipopolisakkarit (LPS), deney grubu olarak da tek başına veya LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanan erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. 5,14-HEDGE, hayvanlara serum fizyolojik veya LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulandı. Sıçanlara serum fizyolojik veya LPS enjeksiyonundan önce ve 1, 2, 3 ve 4 saat sonra kuyruktan ortalama arteriyel basınç (OAB) ve kalp hızı (KH) kayıtları alındı. Deneyler sonunda, öldürülen sıçanlardan alınan kanlardan hazırlanan serum örneklerinde miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik MyD88, TAK1, fosforile TAK1, I κ B- α ve fosforile I κ B- α ile sitozolik/nükleer NF- κ B p65 ve fosforile NF- κ B p65 protein ekspresyonları ölçüldü. Sıçanlara LPS uygulanmasından 4 saat sonra OAB 35 mmHg kadar azaldı, KH 75 atım/dakika kadar arttı. LPS uygulanan sıçanların serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile dokularının sitozolik fraksiyonlarında MyD88 ekspresyonu ile fosforile TAK1/TAK1 ve fosforile I κ B- α /I κ B- α oranı, sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında fosforile NF- κ B p65/NF- κ B p65 oranı ile nükleer/sitozolik NF- κ B p65 ve nükleer/sitozolik fosforile NF- κ B p65 oranında artış olduğu gözlemlendi. LPS'nin neden olduğu bütün bu değişiklikler 5,14-HEDGE ile önlemlendi. Bu çalışmanın bulguları, 5,14-HEDGE'nin endotoksemi sırasında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolunun ekspresyon ve etkinliğindeki artmayı önlediğini ve böylece septik şok tedavisinde yararlı olabileceğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Endotoksin, MyD88, TAK1, IKK β , I κ B- α , NF- κ B, miRNA

ABSTRACT

Investigation of the Effect of 20-HETE Analog, 5,14-HEDGE, on Systemic miR-150, miR-223, and miR-297 Levels in Relation with Activity of MyD88/TAK1/NF- κ B Pathway in Endotoxemic Rats

In this study, effects of a stable analog of 20-HETE, *N*-20-hydroxyeicosa-5[Z],14[Z]-dienoyl]glycine (5,14-HEDGE), which mimics the effects of endogenously produced 20-HETE, on miR-150, miR-223, and miR-297 expression levels in sera and cytosolic myeloid differentiation factor 88 (MyD88), transforming growth factor-activated kinase (TAK1), I κ B kinase (IKK) β , and inhibitor of κ B α (I κ B- α) as well as cytosolic/nuclear nuclear factor κ B (NF- κ B) p65 protein expressions and/or activities in renal, cardiac and vascular tissues of control and endotoxemic rats were investigated. In these studies, saline, lipopolysaccharide (LPS), and 5,14-HEDGE alone or in combination with LPS-treated male Wistar rats were used as control, septic shock, and experimental groups, respectively. 5,14-HEDGE was administered 1 hour after injection of saline or LPS. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were measured from rats received either saline or LPS at time 0, 1, 2, 3, and 4 hours. At the end of the experiments, rats were sacrificed, serum miR-150, miR-223, and miR-297 expression levels and cytosolic MyD88, TAK1, phosphorylated TAK1, I κ B- α , and phosphorylated I κ B- α as well as cytosolic/nuclear NF- κ B p65 and phosphorylated NF- κ B p65 protein expressions in kidney, heart, thoracic aorta, and superior mesenteric artery were measured. MAP fell by 35 mmHg, HR rose by 75 beats/min at 4 hour after LPS administration. Serum miR-150, miR-223, and miR-297 expression levels and tissue protein expression of MyD88 and phosphorylated TAK1/TAK1, and ratios of phosphorylated I κ B- α /I κ B- α ratio in cytosolic fractions and phosphorylated NF- κ B p65/NF- κ B p65 in cytosolic and nuclear fractions as well as nuclear/cytosolic NF- κ B p65 ratio and nuclear/cytosolic phosphorylated NF- κ B p65 ratio were observed to be increased in LPS-treated rats. The LPS-induced changes were prevented by 5,14-HEDGE. The results of the study demonstrated that 5,14-HEDGE prevented the increase in miR-150, miR-223, and miR-297 expression levels as well as expression and activity of MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B pathway during endotoxemia, and thus it could have a beneficial effect in septic shock treatment.

Keywords: Endotoxin, MyD88, TAK1, IKK β , I κ B- α , NF- κ B, miRNA

1. GİRİŞ

Sepsis enfeksiyona karşı konağın verdiği şiddetli sepsis (bilinen veya olası bir enfeksiyona karşı ikincil olarak hızla gelişen organ işlev bozukluğu) ve septik şok (sıvı uygulanmasıyla düzeltilemeyen hipotansiyonun eşlik ettiği şiddetli sepsis) ile sonuçlanabilen sistemik zararlı bir yanıttır. Sepsisin en sık görülen bir komplikasyonu olarak ortaya çıkan septik şok, enfeksiyona karşı konakta gelişen enflamatuvar ve antiinflamatuvar olaylar ile humoral ve hücresele tepkilerin neden olduğu respiratuvar, gastrointestinal, renal ve sirkülatuvar işlev bozukluklarının ardından çoklu organ yetmezliği ve ölüm ile sonuçlanabilmektedir. Dünyada giderek daha büyük bir sağlık sorunu olmaya başlayan şiddetli sepsis ve septik şok nedeniyle her yıl dört bireyden biri, bazen daha çoğu, ölmektedir. Hemodinamik destek (oksijenasyon/ventilasyon stratejileri, sıvı/vazopresör kullanımı ve erken hedefe yönelik tedavi gibi), antimikrobiyal tedavi ve bakteriyel virülans faktörleri (antiendotoksin antikorlar ve endotoksin uzaklaştırıcı kolonların kullanılması gibi) ile konaktaki yanıt faktörlerini (steroitler, antisitokin ilaçlar ve antikoagülanların kullanılması gibi) hedef alan yaklaşımların yetersiz kaldığı sepsis ve septik şok tedavisindeki gelişmeler oldukça yavaş ilerlemekte, ayrıca tedavi maliyeti giderek artmaktadır. Bu durumun nedenleri arasında sepsis ve septik şok patojenezinin pek çok mediyatörün katkısından dolayı karmaşık olması, mediyatörlerin birbirleri ile etkileşmeleri, semptomlar ve prognozun bireyler arasında değişkenlik göstermesi sayılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan ve "endotoksin" olarak da adlandırılan lipopolisakkarit (LPS)'nin lipit A bölümünün konakta tetiklediği sinyal ileti mekanizmalarının ve etkinleştirdiği çoğu enzim ekspresyon ve etkinliğinin düzenlenmesine dayanan nedene yönelik ve moleküler düzeyde özgül terapötik yaklaşımlar üzerinde yoğunlaşmıştır (1-3).

Bir bilgi kodlamayan mikroribonükleik asit (miRNA)'lar, haberci ribonükleik asit (*messenger ribonucleic acid*; mRNA)'lar ile doğrudan etkileşmeleri sonucunda onların degradasyonuna neden olarak veya protein translasyonunu inhibe ederek protein kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen, ancak mRNA'lardan farklı olarak protein sentezine neden olmayan küçük ribonükleik asit (RNA)'lardır. Özellikle sepsis ve septik şok gibi enflamasyon ile belirgin durumların patojenezinde önemli bir rolü olan nükleer faktör κB (NF-κB)'nin, miR-9, miR-21, miR-125a, miR-132, miR-146a, miR-147b, miR-155 ve miR-301a gibi miRNA'ların ekspresyonlarının artmasına veya let-7i gibi miRNA'ların ekspresyonlarının azalmasına neden olarak, çoğu miRNA'nın ekspresyonunu düzenlendiğine ilişkin çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Öte yandan, miR-9, miR-21, miR-146a ve miR-155 gibi miRNA'ların NF-κB sinyalleici yolunu inhibe ettiği veya miR-301a gibi miRNA'ların NF-κB etkinliğini artırdığına ilişkin bulgular da vardır (4-24). Son yıllarda, özellikle dolaşımda bulunan miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin çeşitli hastalıklarda tanı amacıyla kullanılabilmesine ilişkin çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (4, 21, 25). Sepsisli hastaların serum veya plazmalarında özellikle miR-150, miR-223, miR-297, miR-146a ve miR-574-5p düzeylerinin tanı amacıyla belirteç olarak kullanılacaklarına ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yoğun bakımda yatan sepsisli hastalarda serum miR-297 düzeylerinin ölen hastalarda, miR-574-5p düzeylerinin ise yaşayan hastalarda daha yüksek olduğu bulunmuştur (26). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, miR-297'nin yaşam süresi, miR-574-5P'nin ise sepsis nedeniyle ölümden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Öte yandan, plazma miR-150 düzeylerinin sepsisli hastalarda azaldığı ve bu azalmanın hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (27). Bir başka çalışmada, sepsisli hastalarda serum miR-146a ve miR-223 düzeylerinin sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (*systemic inflammatory response syndrome*; SIRS) ve kontrol gruplarına göre daha az olduğu ve özellikle miR-223'ün SIRS ve sepsisi birbirinden ayırmak amacıyla kullanılabilceği bildirilmiştir (28). Schmidt ve ark. (29) ise, LPS uygulanan sağlıklı insanların lökositlerinde miR-146b, miR-150, miR-342 ve let-7g düzeylerinin azalırken, miR-143 düzeyinin arttığını göstermişlerdir. Öte yandan, rodentlerde oluşturulan *in vivo* deneysel septik şok modellerinde miRNA'ların rolüne ilişkin yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. LPS uygulanan farelerin çeşitli dokularında miR-

21, miR-25, miR-27b, miR-100, miR-140, miR-142-3p, miR-181c, miR-187, miR-194, miR-214, miR-223 ve miR-224 (30), miR-146a (31), miR-146b, miR-155 ve miR-1224 (32), miR-125b-5p, miR-150 ve miR-181a (33) düzeylerinin arttığı ve miR-181d (33) ile miR-223 (34) düzeylerinin azaldığının gösterilmesine karşın, sıçanlarda miRNA düzeylerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca, sepsisli hastaların serum veya plazmalarında düzeylerinin ölçüldüğü miR-150 ve miR-223 ile sıçanların serum (35), hepatik stellat hücreler (36), kardiyomyosit (37) ve kolon mukozasında (38) yapılan çalışmalar olmasına karşın, miR-297 düzeylerinin ne yönde değiştiğine ilişkin herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Arakidonik asit (AA)'nın bir ω -hidroksilasyon ürünü olan 20-hidroksieikozatetraenoik asit (20-HETE), böbrek, kalp, karaciğer, beyin, akciğer ve çeşitli damarlarda başlıca sitokrom P450 (*cytochrome P450*; CYP) 4A ve CYP4F izoformları olmak üzere, CYP enzimleri tarafından oluşturulmaktadır. 20-HETE özellikle damar geriminin düzenlenmesi, böbrek işlevi ve arteriyel kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hipertansiyon, iskemik vasküler, serebral, kardiyak ve renal hastalıklar, neovaskülarizasyon, diyabet, enflamasyon, polikistik böbrek hastalıkları, gebelik toksemisi ve kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda 20-HETE oluşumunda değişiklikler olduğu gözlenmiştir (2, 3, 39-55). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, LPS ile oluşturulan süregen sistemik enflamasyon modelinde CYP4A ve CYP4F aracılığı ile oluşan 20-HETE'nin enflamasyona neden olan mediyatörlerden biri olarak rol oynadığı gösterilmiştir (56, 57). Öte yandan, günümüzde endotoksine maruziyet sonucunda indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz (*cyclooxygenase*; COX)-2 gibi enzimlerin ekspresyon ve etkinliğinin artması sonucunda aşırı düzeyde oluşan ve enflamasyon ile belirgin birçok renal ve kardiyovasküler hastalığın patojenezinde rol oynayan nitrik oksit (NO) ve prostaglandinler gibi vazodilatör mediyatörlerin inhibisyonuna yönelik yaklaşımlar olmasına karşın, endotoksemi sırasında CYP4A ekspresyon ve etkinliğinin azalması sonucunda oluşumu azalan 20-HETE gibi vazokonstriktör ürünlerin dayanıklı analoglarının sepsis ve septik şok tedavisinde yararlı olabileceğine ilişkin literatürde tarafımızdan yapılan çalışmalar dışında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (58-85). Endotoksemik sıçanlarda

in vivo olarak yaptığımız çalışmaların sonuçlarına göre, subletal dozda (10 mg/kg; intraperitoneal [i.p.]) LPS (*E. coli* LPS O111:B4) enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel septik şok modelinde gelişen vasküler hiporeaktivite ve hipotansiyona böbrek, kalp, akciğer, dalak, beyin, torasik aort, süperiyor mezenterik arter ile femoral arterde çözünebilir epoksid hidrolaz (çEH), mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz (*mitogen-activated protein kinase kinase*; MEK) 1, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (*extracellular signal-regulated kinase*; ERK) 1/2, IκB kinaz (*IκB kinase*; IKK) β, κB inhibitörü (*inhibitor of κB*; IκB)-α, NF-κB, iNOS, çözünebilir guanilil siklaz (çGS), protein kinaz G (*protein kinase G*; PKG) ve/veya COX-2 ekspresyon/etkinliği, katalaz etkinliği ile tümör nekroze edici faktör (*tumor necrosis factor*; TNF)-α ve interlökin (*interleukin*; IL)-8 oluşumunda artmaya, aynı zamanda CYP2C23, AA epoksijenazlar, CYP4A1/A3 ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyon/etkinliğinde azalma eşlik etmektedir. Ayrıca, apoptozun göstergelerinden biri olan kaspaz-3 etkinliği ile oksidatif stresin göstergelerinden toplam antioksidan etkinlik, süperoksit dizmutaz (*superoxide dismutase*; SOD) etkinliği, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz etkinliği ile indirgenmiş glutatyon düzeyleri azalmaktadır. MEK1/ERK1/2/iNOS yolu (61-68, 70-73) ve/veya COX-1/2 inhibisyonu (58, 69, 72, 74, 78, 79, 82, 85) ya da dayanıklı bir 20-HETE analogu olan ve endojen olarak oluşan 20-HETE'nin etkilerini taklit ettiği bilinen *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil) glisin (5,14-HEDGE) (30 mg/kg, subkütan [s.k.]; LPS'den 1 saat sonra) (59, 60, 75-77, 80, 81, 83, 84) uygulanması sonucunda sıçanların renal ve/veya kardiyovasküler dokularında enflamatuvar sitokinlerden IL-8 ve TNF-α oluşumu ile birlikte artmış olan çEH, MEK1, ERK1/2, IKKβ, IκB-α, NF-κB p65, iNOS, *heat shock protein 90* (hsp90), çGS, PKG, COX-2, gp91^{phox} (NOX2; nikotinamid adenin dinükleotit fosfat [*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*; NADPH] oksidazın süperoksit oluşturan katalitik alt birimi), p47^{phox} (NOXO2; NOX2 etkinliğinin düzenlenmesinden sorumlu NADPH oksidaz alt birimi) ve/veya 3-nitrotirozin ekspresyon/etkinliği ile azalmış olan CYP2C23, AA epoksijenazlar ve CYP4A1 ekspresyon/etkinliği ile apoptoz, oksidan/antioksidan durum, lipid peroksidasyonu ve enflamasyon ile ilgili değişiklikler normal düzeylere getirilebilmekte, ayrıca güçlü bir vazokonstriktör olan 20-HETE oluşumunun artması ile vasküler hiporeaktivite, hipotansiyon, takikardi ve enflamasyon düzeltilebilmekte, farelerde

mortalite önlenebilmektedir. Bu tez çalışmasında ise, sistemik yoldan 5,14-HEDGE uygulanan kontrol ve endotoksemik sıçanların serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile renal, kardiyak ve vasküler dokularında sitozolik miyeloit farklılaşma faktörü (*myeloid differentiation factor*; MyD) 88, transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz (*transforming growth factor-activated kinase*; TAK) 1, IKK  ve I B-  ile sitozolik/nükleer NF- B p65 protein ekspresyonları ve/veya etkinliklerinin ne yönde değiştiği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Septik Şok

Şok, vücudun yaşamsal organlara ve dokulara yeterli kan ve oksijenin sağlanamaması sonucu yaşamı tehdit eden bir durum olarak tanımlanmaktadır. Şokun başlıca türleri arasında septik şok, hemorajik şok, travmatik şok, kardiyojenik şok, nörojenik şok ve anafilaktik şok bulunmaktadır. Septik şok, başta Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı konakta gelişen enflamatuvar ve antienflamatuvar olaylar ile humoral ve hücrel tepkilerin neden olduğu, kanda vazopresör katekolamin düzeylerinin artmasına karşın, vazokonstriktör maddelere karşı hiporeaktivite ve sıvı uygulanmasıyla düzeltilemeyen kan basıncında ileri derecede bir düşmenin eşlik ettiği, mikrosirkülatuvar işlev bozukluğuyla birlikte akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin gibi yaşamsal organlarda doku perfüzyonu ve oksijen kullanımında bozulma sonucu bu organların işlevlerinde bozukluk ve ardından ölümün görüldüğü karmaşık bir sistemik yanıt olarak tanımlanmaktadır. *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilerden açığa çıkan endotoksinlerin neden olduğu septik şok ise "endotoksik şok", "endoksin şoku" veya "toksik şok" olarak adlandırılmaktadır. Konakta enfeksiyona maruziyet sonucunda başlayan ve çoklu organ yetmezliğine dek gidebilen durumların tanımları Çizelge 2.1'de verilmiştir (1-3, 86-88).

Çizelge 2.1. Konakta enfeksiyona maruziyet sonucunda başlayan ve çoklu organ yetmezliğine dek gidebilen durumlar ile ilgili tanımlar.

Enfeksiyon	Normalde steril olan konakçıda mikroorganizmanın varlığı veya mikroorganizmanın yayılmasına karşı verilen enflamatuvar yanıt ile belirgin mikrobiyal durum.
Bakteriyemi	Kanda canlı bakteri bulunması durumu.
SIRS	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/dk. 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 [Pa _{O2} /F _{O2} 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 dolum veya lekelenme).
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 Pa _{O2} /F _{O2} değeri < 250 ile birlikte ıveğen akciğer zedelenmesi; enfeksiyon kaynağı olarak pnömoni varlığında Pa _{O2} /F _{O2} değeri < 200 ile birlikte ıveğen 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	Sepsisin neden olduğu, yeterli sıvı uygulanmasına karşın düzelmeyen hipotansiyon olması durumu.
Çoklu organ yetmezliği	Girişim ile homeostazın sağlanamadığı hastalarda organ işlevlerinin değişmesi ile belirgin durum.

F_{O2}, inspirasyonla alınan oksijen fraksiyonu; OAB, ortalama arteriyel basınç; Pa_{CO2}, kan kısmi karbondioksit basıncı; SIRS, sistemik enflamatuvar yanıt sendromu; SKB, sistolik kan basıncı.

2.1.1. Epidemiyolojisi

Sepsisin yıllık görülme sıklığı her 100.000'de 50-95 olgu olarak görülmekte, ayrıca görülme sıklığı da her yıl %9 oranında artmaktadır. Şiddetli sepsis ve septik şok olgularının sayısının ise 2010-2020 yılları arasında 934.000'den 1.110.000'e çıkacağı ileri sürülmüştür. Sepsis için yapılan hastane başvurularının, tüm başvuruların %2'sini oluşturduğu, sepsisli hastaların yaklaşık %9'unda şiddetli sepsis, şiddetli sepsis hastalarının %3'ünde ise septik şok geliştiği bildirilmiştir. Yoğun bakım birimlerinde bulunan hastaların yaklaşık %10'luk bir bölümünü de septik şoklu hastalar oluşturmaktadır. Yoğun bakım birimlerindeki destekleyici tedavideki önemli gelişmelere ve oldukça etkili ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılmasına karşın, sepsisli hastalarda geniş çapta yapılan epidemiyolojik çalışmalar ve klinik araştırmaların sonuçlarına göre, mortalite görülme olasılığı yaklaşık %35 oranında, septik şok nedeniyle olan ölümlerin oranı ise %60 kadar artmıştır. Antihipotansif tedaviye yanıt vermeyen septik şoklu hastaların yaklaşık %75'i birkaç saat veya gün içerisinde ölmektedir, kalan hastalar ise günler veya haftalar sonra çoklu organ yetmezliği nedeniyle ölmektedir. Sepsisli hastalarda mortalite görülme olasılığı %21.6-50.8 arasında değişmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 750.000'den çok sepsis olgusunun görüldüğü, bu olguların 380.000'den çoğunun yoğun bakım birimlerine yatırıldığı ve 130.000 kadar olgunun da mekanik solunuma gerek duyduğu bildirilmiştir. Bir solunum aygıtına bağlanan sepsisli hastalar yoğun bakım birimlerinde yaklaşık 7-14 gün kadar yaşayabilmekte, daha sonra 10-14 gün kadar daha hastanede kalabilmektedirler. Sonuç olarak, bu hastalar hastanede 3-5 hafta kadar kalmaktadırlar. Angus ve ark. (2001) tarafından yapılan bir araştırmada, sepsis ve septik şok nedeniyle tedavi gören hastalar için kişi başına yaklaşık 22.000 \$ kadar harcama yapıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, sepsisli hastaların bakımı için yıllık toplam maliyetin 17 milyar \$ kadar olduğu bildirilmiştir. Hesaplanan bu yıllık maliyetin toplumun yaşlanması, antimikrobiyal ilaçlara dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve girişimsel terapötik yaklaşımların yaygınlaşmasından dolayı önümüzdeki yıllarda daha da artacağı ileri sürülmektedir (2, 89-93).

2.1.2. Etiyolojisi

Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, mantarlar, anaerobik mikroorganizmalar ve virüsler sepsise neden olabilmektedir. Genellikle Gram-negatif veya Gram-pozitif bir bakterinin bağırsak, akciğer, deri ya da jenitoüriner sistem aracılığıyla kan dolaşımına geçmesi sonucunda sepsis ve septik şoka neden olan patofizyolojik olaylar tetiklenmektedir. Sepsis ve septik şok olgularının %30-50 kadarından Gram-pozitif bakteriler (metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) %14-24, metisiline dirençli *S. aureus* %5-11, öteki *Staphylococcus* türleri %1-3, *Streptococcus pneumoniae* %9-12, öteki *Streptococcus* türleri %6-11, *Enterococcus* türleri %3-13, anaerobik mikroorganizmalar %1-2 ve öteki Gram-pozitif bakteriler %1-5), %25-30 kadarından Gram-negatif bakteriler (*E. coli* %9-27, *Pseudomonas aeruginosa* %8-15, *Klebsiella pneumoniae* %2-7, *Enterobacter* türleri %6-16, *Haemophilus influenzae* %2-10, anaerobik mikroorganizmalar %3-7 ve öteki Gram-negatif bakteriler %3-12), mantarlar (*Candida albicans* (*C. albicans*) %1-3 ve öteki *Candida* türleri %1-2), %1-3 kadarından parazitler ve %2-4 kadarından virüsler sorumlu tutulmaktadır. Sepsis etkeni olarak *C. albicans* en sık görülen mantarlardandır, ancak *albicans* olmayan türlerin (*C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*) oranının %24'ten %46'ya yükseldiği bildirilmiştir. Sepsis etkeni olarak tanımlanan öteki mantarlar arasında *Cryptococcus*, *Coccidioides*, *Fusarium* ve *Aspergillus* bulunmaktadır. Öte yandan, olguların %20-30 kadarında kan kültürlerinin göreceli olarak düşük duyarlılıkta olması veya antibiyotik kullanımından dolayı etken tanımlanamamaktadır. Şiddetli sepsis veya septik şoklu bireylerin %25'inde enfeksiyon kaynağının çeşitli bölgelerde görülmesine karşın, bireylerin %20'sinde enfeksiyon kaynağı bilinmemektedir (2, 93).

Sepsis ve septik şokun risk etkenleri arasında erkek olmak, kuzey Amerikalılar için beyaz olmayan etnik kökenden olmak, birlikte başka hastalıkların bulunması, malignansiler, bağışıklık sisteminin yetersiz çalışması veya baskılanmış olması, süregen organ yetmezliği, alkol bağımlılığı ve genetik özellikler bulunmaktadır. Diyabet, malignansi veya insan bağışıklık yetersizliği virüsü (*human immunodeficiency virus*)

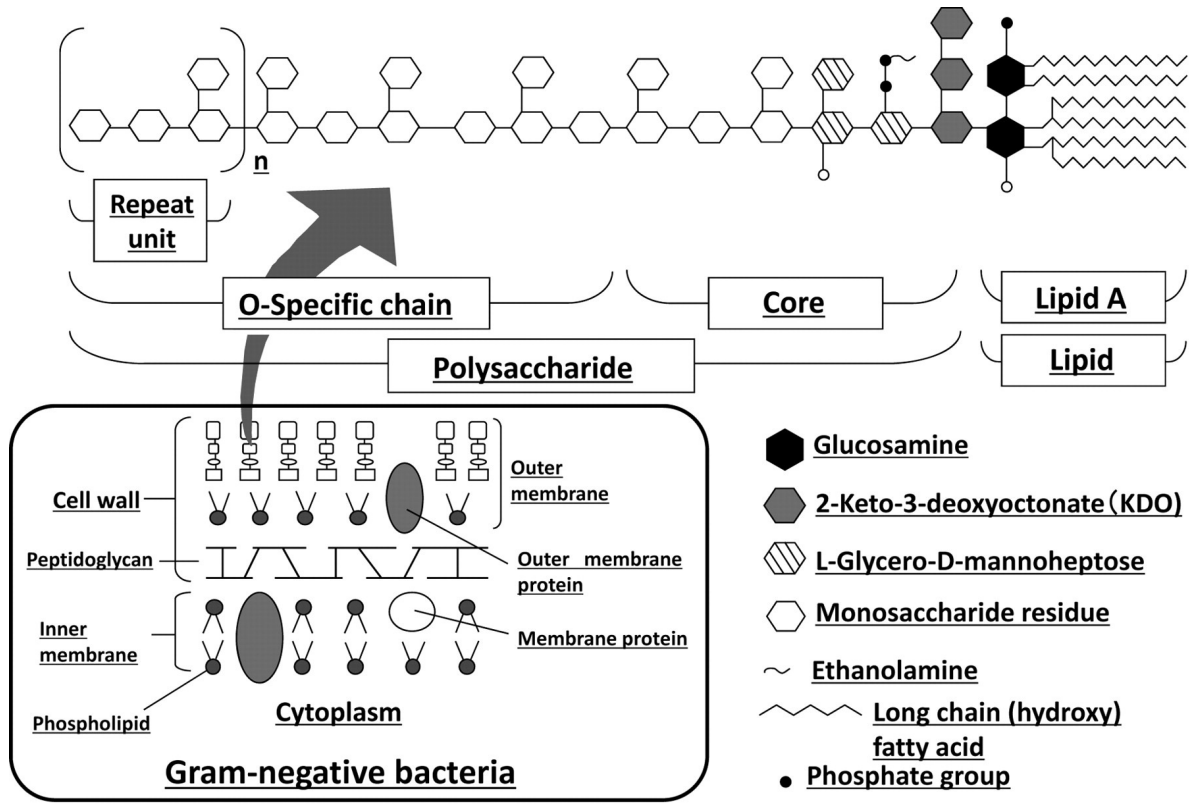
enfeksiyonu olan ya da cerrahi girişim yapılan hastalar ile deri bütünlüğü bozulan travma kurbanlarında sepsis gelişme olasılığı çok daha yüksektir (94, 95). Septik şok 60-70 yaşlarında daha sık görülmektedir (95, 96). Her ne kadar beyazlar ile siyahlar karşılaştırıldığında, sepsis nedeniyle hastaneye yatış ve mortalite oranlarının siyahlarda daha yüksek olduğu ancak fatalite oranlarının benzer olduğu bildirilmiş olsa da (97), sepsis herhangi bir ırkta, cinsiyette, yaşta veya coğrafik bölgede görülebilmektedir (2, 90-93, 98).

2.1.3. Patofizyolojisi

Sepsis ve septik şokta gelişen patofizyolojik olaylarda öncelikle monosit, makrofaj, nötrofil ve endotel hücreleri enfeksiyona karşı yanıtın başlatılması ve sürdürülmesi açısından önemli rol oynamaktadırlar. Sepsis ve septik şok patofizyolojisinde yer alan öteki önemli olaylar ise enflamasyon ve pıhtılaşma olaylarının başlamasıdır. Enflamasyon ve pıhtılaşma olayları bir kez başladığında birbirleri ile etkileşerek konağın enfeksiyona karşı olan yanıtını güçlendirirler; örneğin, enflamasyon gelişmesine neden olan mediyatörler, dolaşımda bulunan monositlerin, doku makrofajlarının, nötrofillerin ve endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan doku faktörünün ekspresyonunu indükleyerek pıhtılaşma olayını artırabilmektedirler. Enflamasyonun başlaması ile birlikte sitokinler, adezyon molekülleri, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi mediyatörlerin aşırı ve kontrolsüz bir biçimde oluşumunun artması sepsis patofizyolojisine katkıda bulunmaktadır. Sepsiste oluşumları artan TNF- α , IL-1, IL-8 ve interferon (IFN)- γ gibi enflamasyonun başlamasına aracılık eden sitokinlerin yanı sıra, IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi antiinflamatuvar sitokinler de oluşmaktadır (2, 90-92, 99-109).

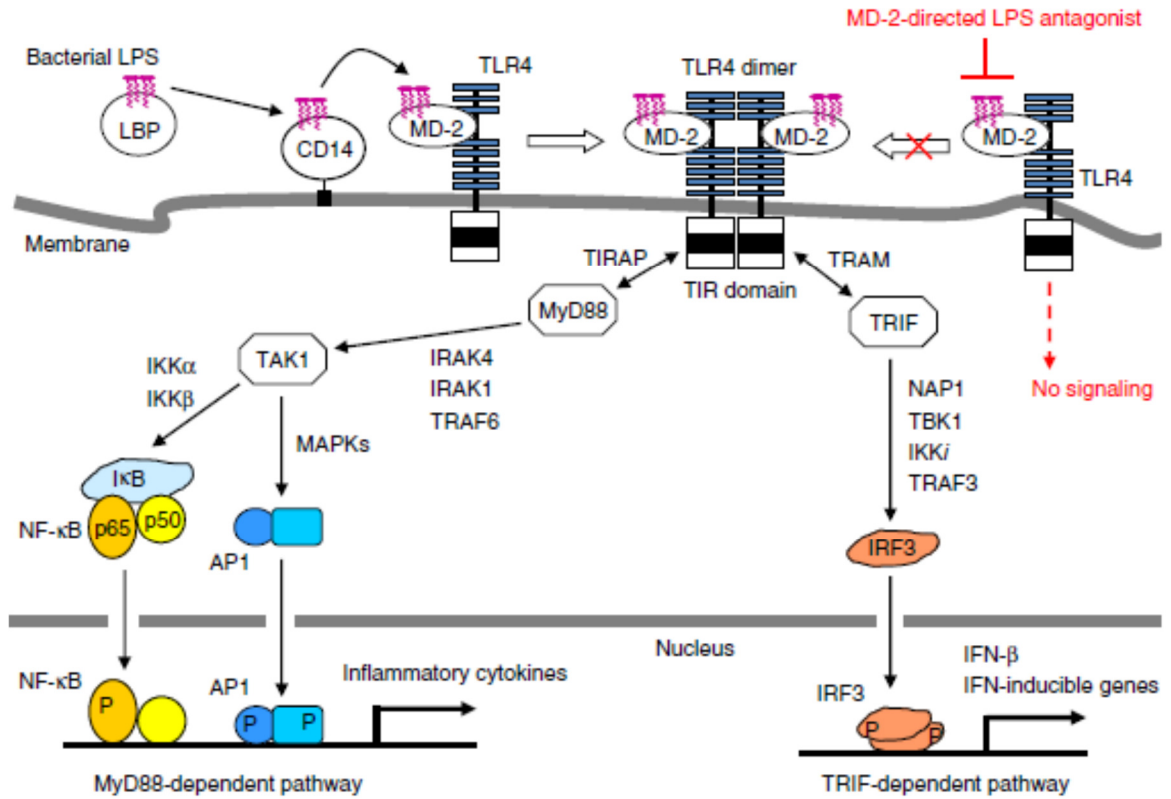
Sepsisli insanlarda sistemik inflamatuvar yanıt, esas olarak normalde insan dokularında bulunmayan mikrobiyal kökenli makromoleküller tarafından başlatılmaktadır. Bütün *pathogen-associated molecular pattern* moleküllerinden en potenti bakteriyel LPS'dir. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS, moleküle polar ve amfipatik özelliklerini kazandıran üç değişik bölgeden oluşmaktadır. Bu bölgeler; lipit A,

çekirdek oligosakkarit ve yineleyen polisakkarit zincirlerinden oluşmaktadır. Dış bölgede bulunan O-antijen yapısının bakteri türlerine bağlı olarak antijenitesi bulunmaktadır. Orta bölgede yer alan çekirdek bölge daha az antijenik değişkenlik göstermektedir. En içteki bölgede ise lipit A yapısı bulunmaktadır. *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilerin neden olduğu sepsis ve septik şok patojenezinin en potent mikrobiyal mediyatörü "endotoksin" olarak da adlandırılan LPS'nin "lipit A" bölümüdür (Şekil 2.1). Gram-pozitif bakterilerde endotoksin olmamasına karşın, bu mikroorganizmaların en önemli özelliği peptidoglikan ve lipoteikoik asit gibi, LPS'den daha az derecede de olsa, enflamatuvar sitokinlerin salıverilmesine neden olan güçlü ekzotoksinler üretmeleridir (2, 89, 92, 108, 110-115).

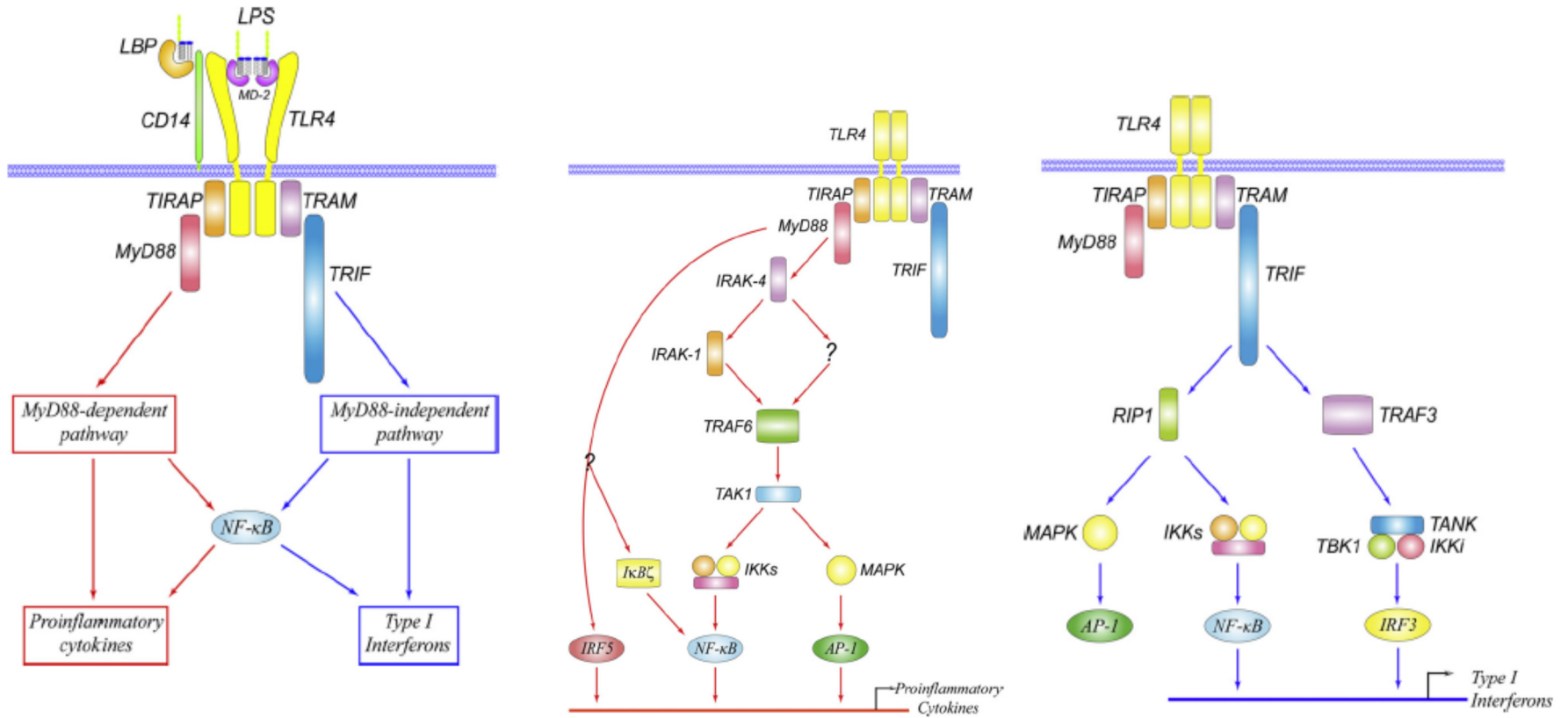


Şekil 2.1. LPS yapısının şematik gösterimi (112). LPS, lipopolisakkarit.

Lipit A, yüksek derecede immünoreaktiftir ve Gram-negatif sepsiste gözlenen toksik etkilerin birçoğundan sorumludur. Lipit A'nın başlıca etkisi, makrofajları etkinleştirmesi ve enflamasyona neden olan olayları tetiklemesidir. Enfeksiyona karşı gelişen yanıtta önemli rol oynayan monositler, makrofajlar, nötrofiller ve endotel hücreleri yüzeyinde bulunan *cluster of differentiation* (CD) 14 ve *Toll-like receptor* (TLR) 4, bütün bakteriyi veya LPS gibi bakteriyel ürünleri tanıyan ve onlara bağlanan reseptörlerdir. Hepatositler tarafından sentezlenen bir serum proteini olan lipit bağlayıcı protein (*lipid-binding protein*; LBP)'nin bakteriyel LPS'yi CD14'e transfer etmesinin ardından, LPS molekülleri CD14 tarafından biriktirilmekte ve LPS monomerleri lenfosit antijen 96 (*lymphocyte antigen 96*; MD-2) ve TLR4 reseptör kompleksine sunulmaktadır (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3). TLR4 aracılıklı olarak enflamasyon ile sonuçlanan yolun etkinliğinin bir göstergesi olarak, LPS ile bağlı olan MD-2/TLR4 kompleksi (LPS-MD-2-TLR4)₂ reseptör multimerine dönüştürülmektedir. TLR4 sinyal yolu MyD88'e bağımlı ve MyD88'den bağımsız olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. MyD88'e bağımlı yolda, *Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein* (TIRAP) aracılığıyla MyD88'e iletilen uyarı interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (*interleukin-1 receptor-associated kinase*) (IRAK) 1/4, tümör nekroze edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*) (TRAF) 6, TAK1, IKK α (IKK1), IKK β (IKK2), IKK γ (IKK3) ve mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*; MAPK)'ler gibi sinyalleyici moleküller (MEK1, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz [*mitogen-activated protein kinase kinase*; MKK] 3/6 ve MKK4; ERK1/2, p38 MAPK ve *c-jun N-terminal kinase* [JNK] 1/2) aracılığıyla çeşitli enflamatuvar mediyatörlerin oluşumunu uyarmak üzere NF- κ B ve etkinleştirici protein (*activating protein*; AP)-1 (c-fos/c-jun heterodimeri) transkripsiyon faktörleri etkinleştirilmektedir. MyD88'den bağımsız yolda ise, *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR) içeren bir adaptör protein olan *Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF), nükleer faktör κ B etkinleştirici kinaz ile ilişkili protein (*nuclear factor κ B-activating kinase-associated protein*; NAP) 1, tümör nekroze edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör aile üyesi ile ilişkili nükleer faktör κ B etkinleştiricisini bağlayan kinaz (*tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κ B-activator-binding kinase*; TBK) 1, tümör nekroze



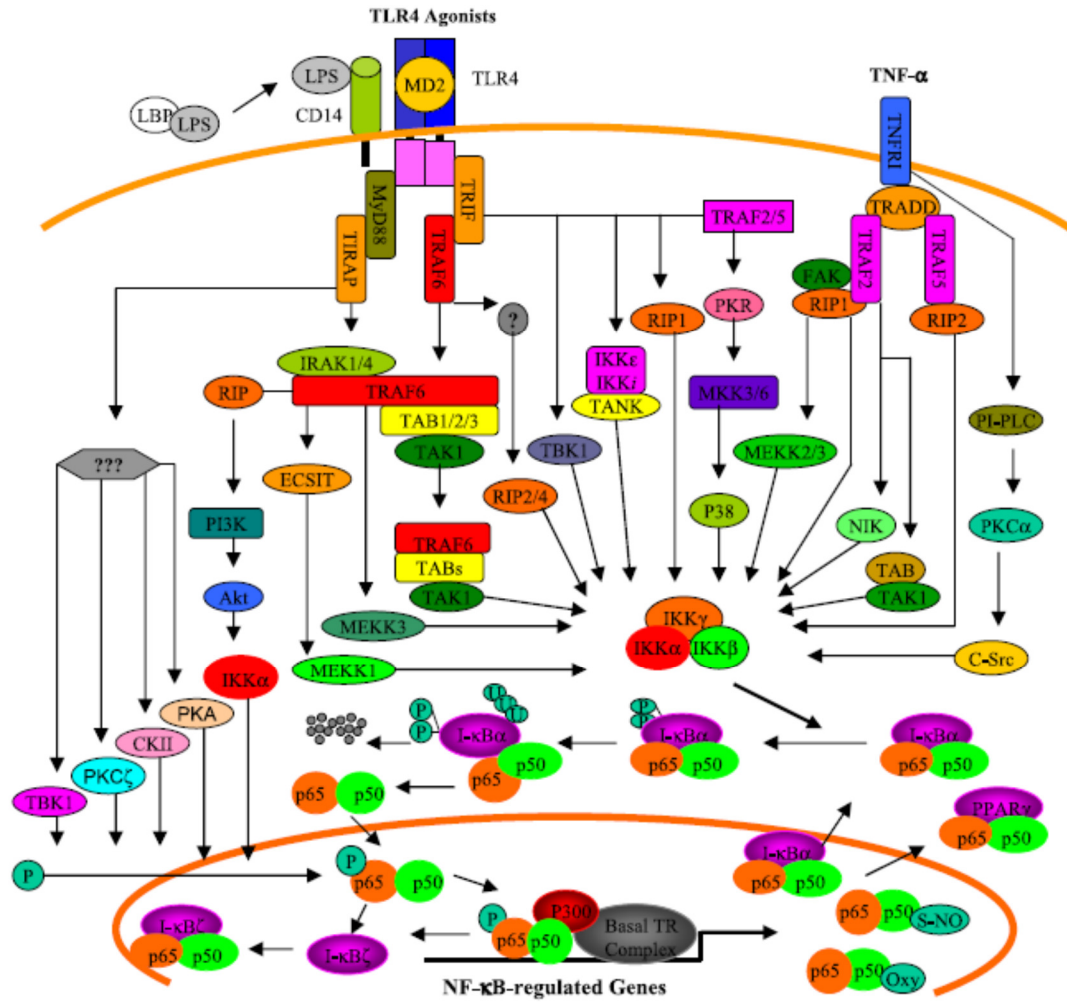
Şekil 2.2. Memeli bir konakta enflamasyon ile sonuçlanan LPS/TLR4 aracılıklı sinyalleşici yol etkinliğinin şematik gösterimi (123). AP, *activated protein*; CD, *cluster of differentiation*; IκB, *κB inhibitor*; IFN, *interferon*; IKK, *IκB kinase*; IRAK, *interleukin-1 receptor-associated kinase*; IRF, *interferon regulating factor*; LBP, *lipid-binding protein*; LPS, *lipopolysaccharide*; MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*; MD-2, *lymphocyte antigen 96*; MyD, *myeloid differentiation factor*; NAP, *nuclear factor κB-activating kinase-associated protein*; NF-κB, *nuclear factor κB*; P, *phosphate*; TAK, *transforming growth factor-activated kinase*; TBK, *tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κB-activator-binding kinase*; TIR, *toll/interleukin-1 receptor*; TIRAP, *toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*; TLR, *toll-like receptor*; TRAF, *tumor necrosis factor receptor-associated factor*; TRAM, *toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β-related adaptor molecule*; TRIF, *toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β*.



Şekil 2.3. MyD88'e bağımlı ve MyD88'den bağımsız LPS/TLR4 sinyallejci yolların şematik gösterimi (105). AP, activated protein; CD, cluster of differentiation; IκB, κB inhibitor; IKK, IκB kinase; IKKs, IκB kinases; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; IRF, interferon regulating factor; LBP, lipid-binding protein; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MD-2, lymphocyte antigen 96; MyD, myeloid differentiation factor; NF-κB, nuclear factor κB; RIP, receptor-interacting protein; TAK, transforming growth factor-activated kinase; TANK, tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κB activator; TBK, tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κB-activator-binding kinase; TIRAP, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein; TLR, toll-like receptor; TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor; TRAM, toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β-related adaptor molecule; TRIF, toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β.

edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör ile üyesi nükleer faktör κ B etkinleştiricisi (*tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κ B activator*; TANK), I κ B kinaz ϵ (*I κ B kinase ϵ* ; IKKi) ve TRAF3 aracılığıyla IFN- β ve IFN ile indüklenebilen genleri *up*-regüle etmek üzere, interferon düzenleyici faktör (*interferon regulating factor*; IRF) 3'ü etkinleştirmekte, ayrıca reseptör ile etkileşen protein (*receptor-interacting protein*; RIP) 1 aracılığıyla AP-1'i etkinleştirmek üzere MAPK'ler ile NF- κ B'nin etkinleşmesini sağlayan IKK'lerin etkinleşmesine neden olmaktadır. NF- κ B'nin etkinleşmesiyle sonuçlanan TLR4'ün aracılık ettiği sinyalleşici yollar Şekil 2.4'te şematik olarak gösterilmiştir (2, 99, 105, 116-125).

NF- κ B, NF- κ B/Rel ailesindeki proteinlerin çeşitli kombinasyonlarından oluşan dimerleri oluşturan yapısal olarak retroviral onkoprotein v-Rel ile yapısal homoloji gösteren transkripsiyonel proteinlerin bir grubudur. Memeli hücrelerinde NF- κ B ailesindeki proteinlerin birinci grubunda NF- κ B1 (p105'ten oluşan p50; geni NFKB1) ve NF- κ B2 (p100'den oluşan p52; geni NFKB2), ikinci grubunda ise RelA (p65; geni RELA), RelB (geni RELB) ve c-Rel (geni REL) bulunmaktadır. Bu proteinlerden yalnızca RelA, RelB ve c-Rel transaktivasyon bölgeleri içermekte, transkripsiyonel olarak etkin olan NF- κ B dimerlerinde de bu üç faktörden biri bulunmaktadır. NF- κ B ailesindeki proteinler arasındaki etkileşimler başka yapıda bir NF- κ B dimerinin oluşmasına neden olmaktadır (126-128). Bu NF- κ B dimerleri homodimer veya heterodimer olabilmektedir; öte yandan, NF- κ B'nin en baskın biçimi p50/p65 heterodimeridir. NF- κ B dimerlerinin farklı biçimleri deoksiribonükleik asit (*deoxyribonucleic acid*; DNA)'ya bağlanma tercihi, I κ B izoformları ile etkileşiminin seçiciliği ve transkripsiyonel yeteneği gibi özellikleri açısından birbirlerinden ayrılırlar. Örneğin, p65/c-Rel dimeri 5'-HGGARNYYCC-3' bölgesine bağlanırken, p50/p65 dimeri tercihen 5'-GGGRNNYYCC-3' bölgesine bağlanır (126). RelB/p52 dimeri tercihen, p65/p50 dimeri tarafından tanınmayan, 5'-GGGAGATTTG-3' bölgesini tanır (129). p65 içeren NF- κ B dimerleri tercihen I κ B- α ve I κ B- β ile etkileşirken (126, 128), p50 içeren dimerler I κ B- γ ve I κ B- ζ 'yı yeğlerler (130, 131). Ekspresyonu yalnızca lenfoid dokularda sınırlı olan RelB dışındaki NF- κ B proteinleri bütün hücre

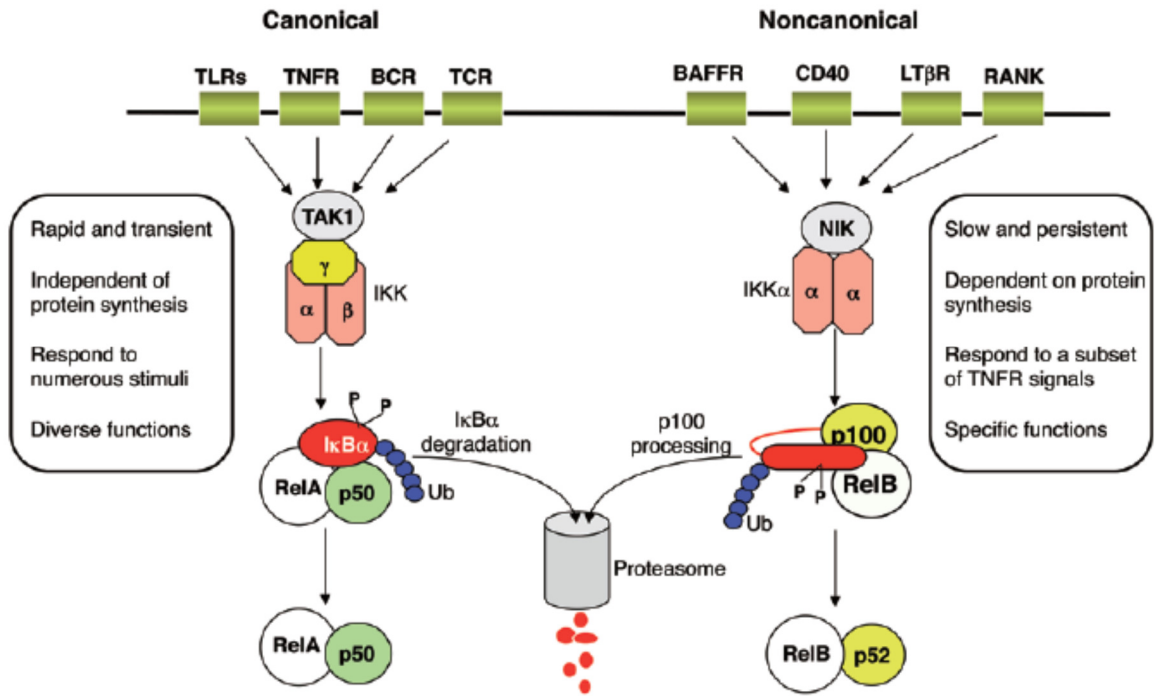


Şekil 2.4. NF- κ B'nin etkinleşmesiyle sonuçlanan TLR4 sinyallejici yolların şematik gösterimi (121). *Akt*, protein kinase B; *CD*, cluster of differentiation; *CKII*, casein kinase II; *C-Src*, c-Src tyrosine kinase; *ECSIT*, evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways; *FAK*, focal adhesion kinase; *I- κ B*, κ B inhibitor; *IKK*, I κ B kinase; *IRAK*, interleukin-1 receptor-associated kinase; *LBP*, lipid-binding protein; *LPS*, lipopolysaccharide; *MD2*, lymphocyte antigen 96; *MEKK*, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase; *MKK*, mitogen-activated protein kinase kinase; *MyD*, myeloid differentiation factor; *NF- κ B*, nuclear factor κ B; *NIK*, nuclear factor κ B-inducing kinase; *Oxy*, S-glutathionylation; *P*, phosphate; *p38*, p38 mitogen-activated protein kinase; *PI3K*, phosphatidylinositol-3-kinase; *PI-PLC*, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; *PKA*, protein kinase A; *PKC*, protein kinase C; *PKR*, protein kinase R; *PPAR γ* , peroxisome proliferator-activated receptor; *RIP*, receptor-interacting protein; *S-NO*, S-nitrosylation; *TAB*, transforming growth factor-activated kinase-binding protein; *TABs*, transforming growth factor-activated kinase-binding proteins; *TAK*, transforming growth factor-activated kinase; *TANK*, tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κ B activator; *TBK*, tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor κ B-activator-binding kinase; *TIRAP*, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein; *TLR*, toll-like receptor; *TNF*, tumor necrosis factor; *TNFR1*, tumor necrosis factor receptor 1; *TR*, transcription; *TRADD*, tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain protein; *TRAF*, tumor necrosis factor receptor-associated factor; *TRIF*, toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β .

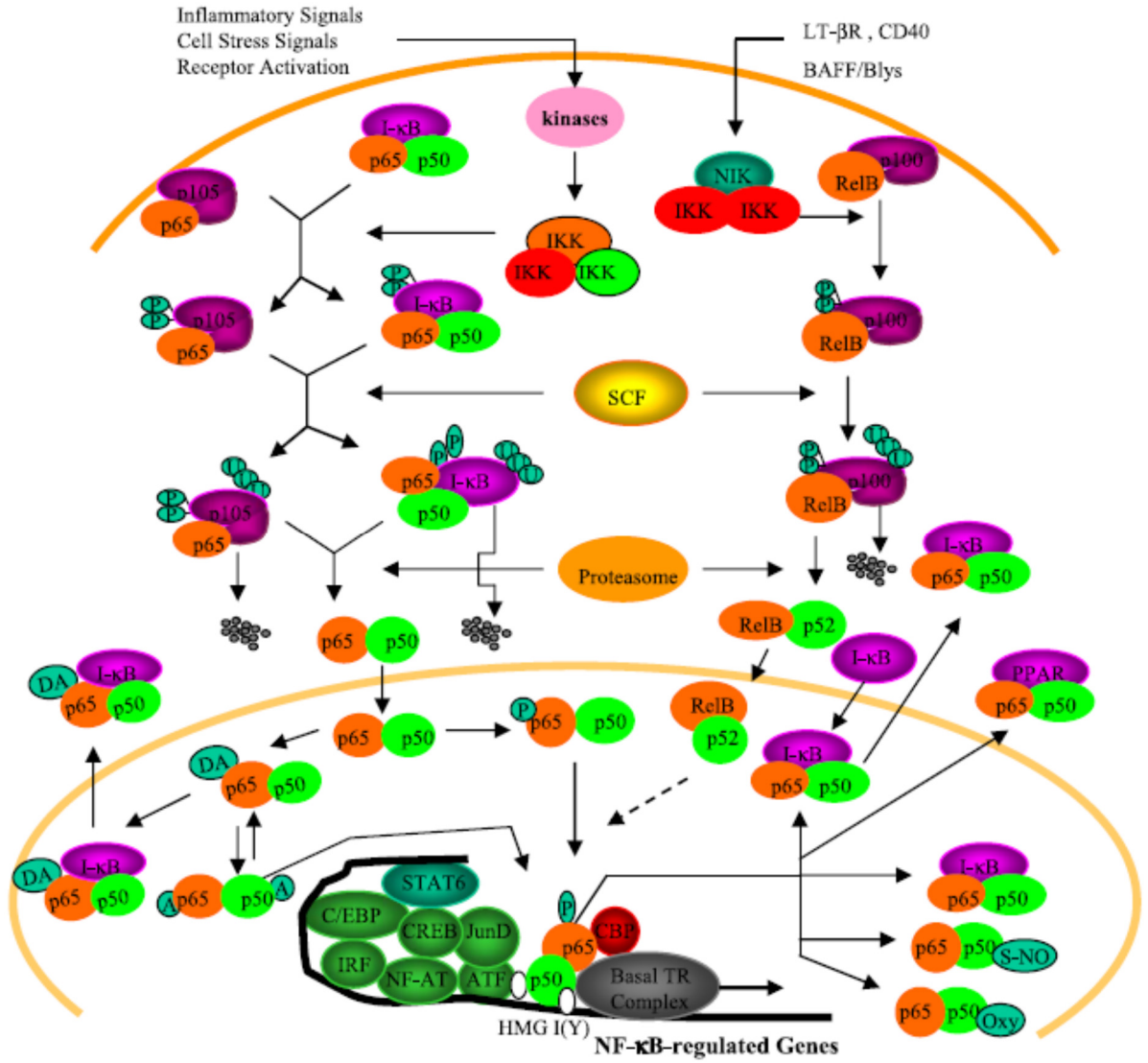
türlerinde yapısal (*constitutive*) olarak eksprese edilmektedir (132). Çoğu NF- κ B dimerlerinin transkripsiyon etkinleştiricileri olmasına karşın, p52/p52, p50/p50 ve p65/p65 homodimerleri transkripsiyonal baskılayıcıdır (133). p50 veya p65 homodimeri histon deasetilaz ile bir kompleks oluşturduktan sonra DNA'ya bağlanır ve NF- κ B'ye bağımlı gen ekspresyonunu baskılar (134). Öte yandan, Marienfeld ve ark. (135) RelB/p50 veya RelB/p52 dimerinin bir transkripsiyonal etkinleştirici gibi davranırken, p65/RelB heterodimerinin gen transkripsiyonunu baskıladığını göstermişlerdir (105, 116, 117, 119-125, 136-141).

NF- κ B'nin çeşitli stres durumlarında (fiziksel, kimyasal, oksidatif, çevresel, fizyolojik vb.) ve mitojenler, modifiye proteinler, reseptör ligantları, fizyolojik ve patolojik mediyatörler, apoptotik moleküller, bakteriler, mantarlar, virüsler ve parazitler ile onların ürünleri, enflamatuvar sitokinler ile çeşitli patolojik durumlarda etkinleştiği bilinmektedir. NF- κ B etkinliği esas olarak I κ B ailesindeki proteinlerden I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , I κ B- ζ , Bcl-3, p105, p100 ve *molecule possessing ankyrin-repeats induced by lipopolysaccharide* (MAIL) tarafından düzenlenmektedir. NF- κ B'nin etkinleşmesinde "klasik NF- κ B yolu (*canonical NF- κ B pathway*)" ve "klasik olmayan NF- κ B yolu (*noncanonical NF- κ B pathway*)" olmak üzere iki yol tanımlanmıştır (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6). TLR, tümör nekroze edici faktör reseptörü (*tumor necrosis factor receptor*; TNFR), B hücresi reseptörü (*B-cell receptor*; BCR) ve T hücresi reseptörü (*T-cell receptor*; TCR) gibi doğal ve adaptif immün reseptörlerin aracılık ettiği çeşitli sinyaller tarafından tetiklenen klasik yolda, TAK1 tarafından IKK kompleksinin etkinleşmesinin ardından IKK tarafından özellikle I κ B- α 'nın fosforillenerek degrade olması sonucunda başta p50/p65 heterodimerleri olmak üzere çeşitli NF- κ B kompleksleri hızlı ve geçici (*transient*) bir biçimde nükleusa geçmektedir; bu yolun etkinliğinin artması erken gen transkripsiyonu, geç gen ekspresyonu veya gen transkripsiyonunun baskılanması ile sonuçlanmaktadır. Tümör nekroze edici faktör ailesi reseptörüne ait B hücresini etkinleştirici faktör (*B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor*; BAFFR), CD40, lenfokin- β reseptörü (*lymphokine- β receptor*; LT β R) ve nükleer faktör κ B için reseptör etkinleştiricisi (*receptor*

activator for nuclear factor κ B; RANK) gibi reseptörlerin aracılık ettiği sinyaller tarafından tetiklenen klasik olmayan yolda ise, nükleer faktör κ B indükleyici kinaz (*nuclear factor κ B-inducing kinase*; NIK) tarafından $\text{IKK}\alpha$ 'nın fosforilasyonu ve etkinleşmesinin ardından bir NF- κ B prekürsörü olan p100'ün fosforile olması ve Skp1-Cul1-Roc1-F-box ubiquitin ligaz (*Skp1-Cul1-Roc1-F-box ubiquitin ligase complex*; SCF β TrCP) kompleksi tarafından ubiquitininlenmesinin ardından NF- κ B'nin bir alt birimi olan RelB ile bağlanmak üzere yarışan p52'ye proteazom tarafından işlenmesi (*processing*) sonucunda oluşan RelB/p52 heterodimerleri yavaş ve kalıcı (*persistent*) bir biçimde nükleusa geçmektedir; bu yolun etkinleşmesi geç gen transkripsiyonu ile sonuçlanmaktadır.



Şekil 2.5. Klasik ve klasik olmayan NF- κ B yollarının şematik gösterimi (140). *BAFFR*, *B-cell-activating factor belonging to tumor necrosis factor family receptor*; *CD*, *cluster of differentiation*; *I κ B*, *κ B inhibitor*; *IKK*, *I κ B kinase*; *LT β R*, *lymphotoxin- β receptor*; *NIK*, *nuclear factor κ B-inducing kinase*; *RANK*, *receptor activator for nuclear factor κ B*; *TAK*, *transforming growth factor-activated kinase*; *TCR*, *T-cell receptor*; *TLR*, *toll-like receptor*; *TNFR*, *tumor necrosis factor receptor*; *Ub*, *ubiquitization*.



Şekil 2.6. Klasik ve klasik olmayan yollarda NF- κ B etkinleşme kaskadının şematik gösterimi (121). A, acetylation; ATF, activating transcription factor-2; BAFF/Blys, B-cell activating factor/B lymphocyte stimulator; CBP, cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein binding protein; CD, cluster of differentiation; C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; CREB, cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein; DA, deacetylation; HMG I(Y), high mobility group I(Y); I- κ B, κ B inhibitor; IKK, κ B inhibitor kinase; IRF, interferon regulating factor; junD, jun protein D; LT- β R, lymphokine- β receptor; NF- κ B, nuclear factor κ B; NF-AT, nuclear factor of activated T cell; NIK, nuclear factor κ B-inducing kinase; Oxy, S-glutathionylation; P, phosphate; SCF, Skp1-Cul1-Roc1-F-box ubiquitin ligase complex; S-NO, S-nitrosylation; STAT, signal transducer and activator of transcription; TR, transcription; U, ubiquitination.

Öte yandan, klasik olmayan yolda etkinleşen NIK'in klasik yolda IKK kompleksindeki IKK α 'nin fosforilasyonu, ayrıca klasik olmayan yolda etkinleşen p100'ün klasik yolda p50/p65 kompleksine bağlanması sonucunda p50/p65 heterodimerlerinin salıverilmesine neden olabileceği ileri sürülmüştür (142). I κ B proteinlerinin yapıları, NF- κ B dimerlerine bağlanma tercihleri, biyolojik işlevleri ve etkinleşme mekanizmaları farklıdır. I κ B- α , I κ B- β ve I κ B- ϵ 'nin NH₂ ucunda gelen bir uyarının ardından I κ B'nin degradasyonu için gerekli olan düzenleyici bir bölge bulunur (128). I κ B- α ve I κ B- β tercihen transaktivasyondan sorumlu alt birimler (p65, RelB ve c-Rel) içeren dimerik kompleksler ile etkileşirlerken (126, 128), I κ B- γ ve I κ B- ζ p50 içeren dimerleri yeğlerler (130, 131). I κ B- α p65, RelB veya c-Rel içeren herhangi bir önceden bağlı NF- κ B kompleksini ilgili DNA bölgelerinden etkin bir biçimde ayırabilmesine karşın, DNAYA bağlı p50/p52 heterodimerinin ayrılmasını sağlamada etkisiz kalmaktadır (128). I κ B- γ p50/p65 dimeri ile (p65/p65 veya c-Rel/c-Rel dimeri ile değil) etkileşmektedir (130). I κ B- ζ tercihen p65'ten daha çok p50 ile birleşir ve p50/p65 heterodimeri olduğu kadar p50/p50 homodimerinin de DNA'ya bağlanmasını inhibe eder (130). I κ B- ϵ yalnızca p65 ve c-Rel ile birlikte bulunmaktadır (143). p105 tercihen p50 içeren dimerler ile birlikte bulunurken (130), p100 RelB içeren dimerler ile birlikte (129). RelB içeren NF- κ B dimerlerinin sitoplazmada tutulmasına yalnızca p100 aracılık etmektedir. I κ B protein genlerinin düzenlenmesinde de farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, I κ B- α , I κ B- β ve I κ B- ϵ yapısal olarak eksprese edilirken (127), I κ B- ζ ve MAIL LPS ve enflamatuvar sitokinler tarafından indüklenmektedir (131, 144). I κ B- α , I κ B- β ve I κ B- ϵ pek çok yerde eksprese edilirken, I κ B- γ öncül B hücreleri gibi yalnızca bazı hücre türlerinde eksprese edilmektedir (145). I κ B- α , I κ B- ζ ve MAIL'nin NF- κ B ile düzenlenen genler olmasına karşın (127, 144, 146), I κ B- β 'nin gen ekspresyonu NF- κ B ile düzenlenmemektedir (127). I κ B proteinleri NF- κ B'yi etkinleştiren uyarılara da farklı yanıt vermektedirler. Örneğin, I κ B- β protein degradasyonu LPS veya IL-1 ile uyarılmasının ardından gözlenirken, TNF- α veya forbol miristat asetat uyarısından sonra görülmemektedir; tersine, bütün bu uyarılar I κ B- α degradasyonuna neden olmaktadır (147). Yapılan çalışmalarda, LPS'nin hem I κ B- α hem de I κ B- β 'nin degradasyonuna neden

olurken, iskemi/reperfüzyonun yalnızca IκB-α'nın degradasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (148). IκB-ζ ve MAIL'nin indüklenebilir proteinler olmasına karşın, IκB-ζ LPS ve IL-1, ancak TNF-α değil, ile indüklenebilirken, MAIL bütün bu uyarılar ile indüklenebilmektedir (126). Yapısal olarak eksprese edilen sitoplazmik çoğu IκB proteinlerinin tersine, IκB-ζ ve MAIL indüklenebilir nükleer proteinlerdir (131, 149). Öteki IκB'lerin tersine, MAIL bir transkripsiyonel artırıcı olarak görev yapmaktadır; örneğin, LPS'nin neden olduğu IL-6 ekspresyonunda yirmi kattan çok bir artışa neden olmaktadır (149). IκB-α, IκB-β ve IκB-ε'nun değişik biyolojik işlevleri de bulunmaktadır. Örneğin, IκB-α'nın NF-κB yanıtının hızla sona ermesine izin veren güçlü bir negatif geri besleme mekanizması olarak işlev görmesine karşın, IκB-β ve IκB-ε uzun süren bir uyarı sırasında NF-κB'yi stabilize edici yönde bir işlevi bulunmaktadır (150). IκB'ler esas olarak NF-κB dimerlerinin sitoplazmada kalmasını sağlayarak, DNA'ya bağlanma bölgelerinden DNA'ya bağlı NF-κB dimerlerinin ayrılmasını kolaylaştırarak ve nükleusta NF-κB dimerlerini çıkartarak NF-κB'nin etkinleşmesini inhibe ederler (133). NF-κB'nin etkinleşmesi sonucunda nükleusta NF-κB dimerlerine bağlanan IκB-α ve IκB-ζ'nin ekspresyon ve sentezi artmaktadır; böylece NF-κB dimerlerinin DNA'dan ayrılmaları sağlanmakta ve sitoplazmaya geçişleri artmaktadır. NF-κB'nin tam olarak etkinleşebilmesi için, 26S proteazomlar tarafından IκB'nin (veya p100 ve p105'in inhibitör *pro-domain*lerinin) degradasyonu sonucunda IκB'den salıverilmesi gerekir. IκB veya inhibitör *pro-domain*lerinin sinyal ile indüklenen proteazomal degradasyonu için SCF^{βTrCP} türü E3 ligazlar tarafından poliubikuitinasyon olayının gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu olay, IκB'nin N ucundaki sinyal-yanıt bölgesinde bulunan serin rezidülerinin (Ser³²/Ser³⁶) fosforilasyonu ile tetiklenmektedir. IκB'nin bu iki bölgeden fosforilasyonunun gerçekleşmesinde rol oynayan iki kinaz olduğu bildirilmiştir: IKKα (IκB kinaz α, IKBKA, IKK1) ve IKKβ (IKBKB, IKK2) (151, 152). IKK iki katalitik alt birim (IKKα ve IKKβ) ile bir düzenleyici alt birimden (IKKγ veya nükleer faktör κB esansiyel düzenleyicisi [*nuclear factor κB essential modulator*; NEMO]) oluşan ve "IKK sinyalozomu" olarak da adlandırılan trimerik bir komplekstir (153-155). Klasik yolda TLR'yi uyarıcı LPS, TNF-α

ve IL-1 gibi enflamatuvar moleküller ile TCR'yi uyaran sinyaller tarafından NF- κ B'nin etkinleşmesinde IKK signalozomundaki en önemli rolü olan kinaz IKK β 'dir (156-158). Son yıllarda, IL-1'e, ancak TNF- α 'ya değil, yanıt olarak IKK α 'nın da IKK β yokluğunda bile NEMO ile işlevsel IKK kompleksleri oluşturarak NF- κ B'yi etkinleştirebildiği gösterilmiştir (159). Sitozolde olduğu kadar, NF- κ B'ye bağımlı ve bağımsız gen ekspresyonunu düzenlemek üzere nükleusta da bulunduğu gösterilen IKK β (160, 161), çeşitli kinazlar (mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz/ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz [*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase*; MEKK] 1, MEKK3, TAK1, NIK, nükleer faktör κ B etkinleştirici kinaz [*nuclear factor κ B-activating kinase*; NAK], protein kinaz C [*protein kinase C*; PKC]- θ vb.) tarafından serin rezidülerinin (Ser¹⁷⁷ ve Ser¹⁸¹) fosforilasyonu sonucunda etkinleşebilmektedir (156); öte yandan, IKK moleküllerinin kendilerini homodimerleri veya heterodimerlerinin transotofosforilasyonu mekanizmasıyla etkinleştirebildikleri de gösterilmiştir (162, 163). IKK β , I κ B- α ve kendisi dışında, NF- κ B yolunda başka moleküllerin de fosforilasyonuna neden olmaktadır. Bunlardan biri gerek nükleusa geçmeden önce sitozolde gerekse nükleusta Ser⁵³⁶ üzerinden p65'in fosforilasyonudur (164-168); tam bir transkripsiyonel etkinlik için önemli olan p65/p65'in bu bölgeden fosforilasyonu, NF- κ B etkinliğindeki artışı yansıtmaktadır. Öte yandan, p105'in IKK β tarafından fosforilasyonu, I κ B- α 'ye benzer biçimde, poliubikuitinasyonuna ve degradasyonuna neden olmaktadır (169). NF- κ B'nin etkinleşmesi ile ilgili olarak IKK β 'nin fosforilasyonuna neden olduğu bir başka substrat TCR sinyal yolu aracılığıyla IKK β 'nin etkinleşmesinde rolü olan B hücre lenfoma protein (*B-cell lymphoma protein*; Bcl) 10 adlı moleküldür; ancak, IKK β bir yandan TCR'nin aracılık ettiği yolda NF- κ B'nin etkinleşmesi için esas olan Carma1/Bcl10/MALT1 kompleksinin oluşumu için gerekliyken, öbür yandan Bcl10'u fosforilleyerek bu sinyalleme azaltmaktadır. IKK'ler sitoplazmada olduğu kadar nükleusta da NF- κ B proteinleri ve NF- κ B ile ilişkili proteinleri fosforile ederek transkripsiyonel yanıtları düzenleyebilmektedir (137). Nükleusta bulunan etkinleşmiş NF- κ B hedef genlerin düzenleyici (*promoter*) veya artırıcı (*enhancer*) κ B elementleri olarak bilinen özgül DNA bölgelerine bağlanarak başlıca enflamasyon, bağışıklık, karsinogenez, hücre çoğalması ve farklılaşması ile apoptoz gibi

olaylardan sorumlu olan 500'den çok sayıdaki enzimin genlerinin transkripsiyonel düzeyde ekspresyonlarının artmasına veya baskılanmasına neden olmaktadır. Öte yandan, nükleustaki etkinleşmiş NF- κ B fosforilasyon, asetilasyon ve metilasyon gibi kendisinin etki gücünü ve süresini düzenleyen bir dizi translayon sonrası modifikasyonlara uğramaktadır. p65 siklik guanozin 5'-monofosfat (*guanosine 5'-monophosphate*; AMP)'ye bağımlı protein kinaz, kazein kinaz ve IKK tarafından sırasıyla Ser²⁷⁶, Ser⁵²⁹ ve Ser⁵³⁶ rezidüleri üzerinden doğrudan fosforillenmektedir (170, 171). Protein fosfataz 2A tarafından p65'in defosforilasyonunun ise NF- κ B'nin etkinliğini azalttığı bildirilmiştir (171). p300/siklik adenosin 5'-monofosfat yanıt elementini bağlayıcı proteini bağlayıcı protein (*cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein binding protein*; CBP) tarafından asetillenen p65'in I κ B- α ile etkileşmesi daha az derecede olsa da, yine de NF- κ B'nin nükleer yerleşimini transkripsiyonel yanıtını sürdürmesini sağlayabilmektedir (172, 173). p65, ayrıca, "Set7" veya "KMT7" olarak da adlandırılan lizin metiltransferaz Set9 tarafından Lys^{314/315} rezidüleri üzerinden metilasyona uğramaktadır (174). Öte yandan, Chew ve ark. (175) tarafından bir Ser/Thr fosfataz olan WIP1 tarafından Ser⁵³⁶ rezidüsü üzerinden defosforile edilen NF- κ B'nin etkinliğinin negatif yönde düzenlendiği gösterilmiştir (105, 116, 117, 119-125, 136-141, 142, 176, 177).

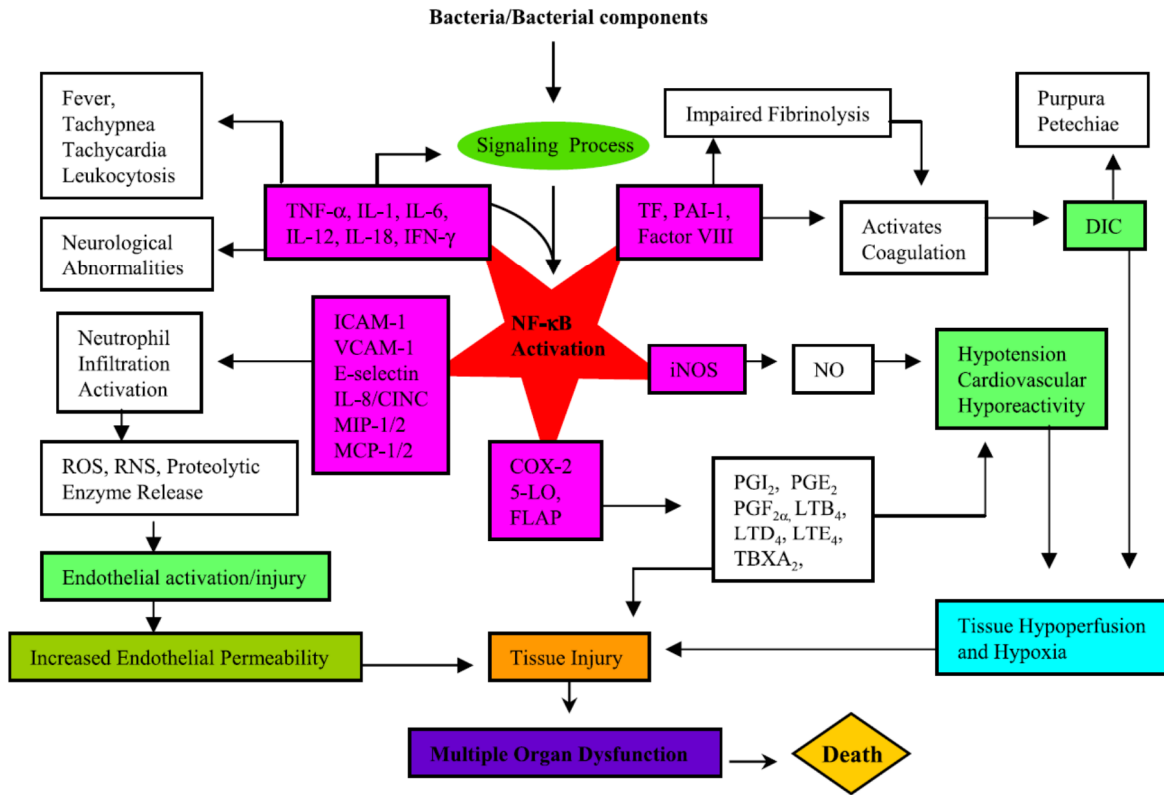
Etkinleşmemiş hücrelerde NF- κ B dimerlerinin, NF- κ B'nin DNA'ya bağlanmasını önleyen (178) ve sitozolde kalmasını sağlayan (156) I κ B proteinlerinden esas olarak I κ B- α , I κ B- β ve I κ B- ϵ ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, NF- κ B ve I κ B- α moleküllerinin sitozol ve nükleus arasında gidip geldiği, ancak I κ B- α varlığında, I κ B- α /NF- κ B kompleksinin esas olarak sitozolde yerleştiği gösterilmiştir (179-181). I κ B- α /NF- κ B kompleks oluşumu, p65, ancak p50 değil, nükleer yerleşim bölgelerini (*nuclear localization sequences*) maskelemekte ve böylece NF- κ B dimerlerinin nükleusa geçişini kısmen önlemektedir (182). Bazı I κ B- α /NF- κ B kompleksleri p50 üzerindeki maskelenmemiş nükleer yerleşim bölgeleri aracılığıyla nükleusa girebilmektedir. Öte yandan, nükleusa giren bu I κ B- α /NF- κ B kompleksleri I κ B- α üzerindeki nükleer dışarı çıkarma bölgeleri (*nuclear export sequences*) aracılığıyla sitoplazmaya etkin bir biçimde

geri taşınabilmektedirler (133). Sonuç olarak, IκB-α/NF-κB komplekslerinin nükleusa girişi ve çıkışının sürekli olarak gerçekleştiği söylenebilir. Öte yandan, nükleer dışarı çıkarma bölgelerinin etkisinin, nükleer yerleşim bölgelerinkinden daha baskın olduğundan dolayı, NF-κB dimerlerinin başlıca yerleşim yerinin sitoplazma olduğu ileri sürülmüştür (133). Ayrıca, bu nükleusa giriş ve çıkış mekanizması yeni sentezlenen IκB-α'nın, etkinleşmiş NF-κB dimerlerini DNA'dan ayırması ve nükleus dışına çıkarmasından da sorumludur (133). IκBε ise, IκB-α'ninkilere benzer mekanizmalarla, NF-κB dimerlerinin sitoplazmada dağılımına neden olmaktadır (156). Arjinin-lizinden zengin nükleer yerleşim bölgeleri içeren moleküllerin nükleusa taşınması importin α/β yolu aracılığıyla olmaktadır. Günümüze dek insanlarda importin-α1, importin-α3, importin-α4, importin-α5, importin-α6 ve importin-α7 olmak üzere altı importin-α izoformu tanımlanmıştır (183, 184). Bütün importin-α izoformlarının nükleer yerleşim bölgesi içeren substratların nükleusa girişine aracılık etme yeteneği bulunmaktadır. Importin-α ile birlikte olan importin-β ise, nükleer por kompleksleri aracılığıyla importin-kargo kompleksinin translokasyonunun ardından, nükleer por komplekslerinin sitoplazmik tarafına yerleştirilmesinden (*docking*) sorumludur (185). TNF-α'nın neden olduğu p50/p65 heterodimerinin (veya p50/p50 homodimerinin) nükleusa girişine importin-α3 ve daha az derecede olmak üzere importin-α4'ün aracılık ettiği gösterilmiştir (186, 187). p65 veya p50 üzerindeki nükleer yerleşim bölgeleri doğrudan importin-α3'ün nükleer yerleşim bölgelerine bağlanmakta ve böylece NF-κB dimerlerinin nükleer translokasyonuna neden olmaktadır (186, 187). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, mitokondriyal işlev ve protein katlanması (*fold*ing), çoğalmanın kontrolü, onkojenezin baskılanması ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi çeşitli hücreyel olaylarda rolü olduğu gösterilen prohibitin 1'in de TNF-α'nın neden olduğu p65'in nükleusa girişi, NF-κB/DNA bağlanması ve NF-κB aracılıklı transkripsiyonel etkinleşmeyi importin-α3 ekspresyonunu azaltarak önlediği gösterilmiştir (188). IκB-β'nın NF-κB dimerlerine bağlanması bir NF-κB alt biriminin nükleer yerleşim bölgeleri ile bir başka alt biriminin nükleer yerleşim bölgelerini maskeleymektedir (130). Öte yandan, bir başka NF-κB alt birimi üzerindeki nükleer yerleşim bölgelerini etkin bir biçimde baskılayan IκB-β/NF-κB/κB-Ras kompleksini oluşturmak üzere, IκB-β/NF-κB

kompleksi Ras'a benzeyen G proteini (κ B-Ras) ile etkileşmektedir (189). Böylece, I κ B- β /NF- κ B kompleksleri nükleus ve sitoplazma arasında gidip gelememekte ve sitoplazmada kalmaktadır (133). Ayrıca, üçlü kompleksteki I κ B- β çoğu sinyal tarafından fosforilasyona ve degradasyona dirençlidir ki, bu durum da NF- κ B'nin etkileşmesini önlemektedir (189). Öte yandan, yalnızca p50 üzerindeki nükleer yerleşim bölgeleri maskelenmiş olmasına karşın, I κ B- β /NF- κ B ve p105/NF- κ B kompleksleri sitoplazmiktir (130). I κ B ζ , NF- κ B'nin DNA'ya bağlanmasını negatif yönde düzenlediği ve NF- κ B aracılıklı gen transkripsiyonunu inhibe ettiği nükleusta yerleşmiştir (131). Ayrıca, NF- κ B'nin nükleustan sitozole geçişinde, nükleer eksport sinyali içeren moleküllerin nükleustan sitoplazmaya geçişine aracılık eden bir nükleer eksport reseptörü olan Crm1 gibi eksportinler ile etkileşmesinin de rol oynadığı bildirilmiştir (190). Zerfaoui ve ark. (191) tarafından yapılan bir çalışmada, LPS/TLR4 yolunun etkinleşmesinin ardından nükleusa geçen p65'in, poli (adenozin difosfat-riboz) polimeraz (*poly [adenosine diphosphate-ribose] polymerase*; PARP) 1 tarafından poli(ADP-ribosil)asyonunun (PARilasyonunun) Crm1 ile etkileşmesini önlediği, böylece p65'in nükleusta kalabildiği gösterilmiştir (117, 119, 121, 122, 124, 136, 140, 141, 176, 192).

NF- κ B, özellikle çok sayıda enflamatuvar moleküllerin oluşumundan sorumlu olan enzimlerin genlerinin transkripsiyonel düzeyde ekspresyonlarının artmasına neden olduğundan dolayı, septik şokun patojenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2.7). Bu genlerin arasında sepsis ve septik şok patojenezinde önemli rol oynayan iNOS ve COX-2 gibi enzimler, akut faz proteinleri ile IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi enflamatuvar sitokinler yer almaktadır. Özellikle iNOS ve COX-2 etkinliğinin artması sonucunda oluşumu artan NO ve prostaglandin I₂ (prostasiklin, *prostacyclin*; PGI₂) gibi vazodilatör ürünlerin yanı sıra, CYP4A, CYP3A ve CYP4F enzimlerinin katalizlediği tepkimeler sonucunda oluşan AA'nın bir ω -hidroksilasyon ürünü 20-HETE gibi enflamasyona neden olduğu kadar vazokonstriktör etkisi de olan ürünlerin oluşumunun azalmasının yanında, antiinflamatuvar etkisi olan epoksieikozatrienoik asit (*epoxyeicosatrienoic acid*; EET)'ler gibi vazodilatör ürünlerin oluşumunun artması da kardiyovasküler sistemin baskılanmasına

neden olmaktadır. Sonuç olarak, sepsis şok patojenezinde vazodilatör/vazokonstriktör ve enflamatuvar/anti-enflamatuvar dengeler daha çok vazodilatör etkili ve enflamatuvar ürünlerin oluşumunun artışı yönünde bozulmuştur. Bozulan bu dengenin yeniden kurulması için de ürünler ve/veya enzimler düzeyinde birbirlerinin oluşumlarını ve/veya etkilerini önleyecek biçimde etkileşimler de görülmektedir. Bütün bu olaylar sepsis ve sepsis şok hastalarında uygun biçimde yapılan vazokonstriktör tedaviye karşın, geri çevrilemeyen vasküler hiporeaktiviteyi açıklamaktadır (2, 3, 99, 116, 119, 121-123, 125, 139, 140-142, 193, 194).

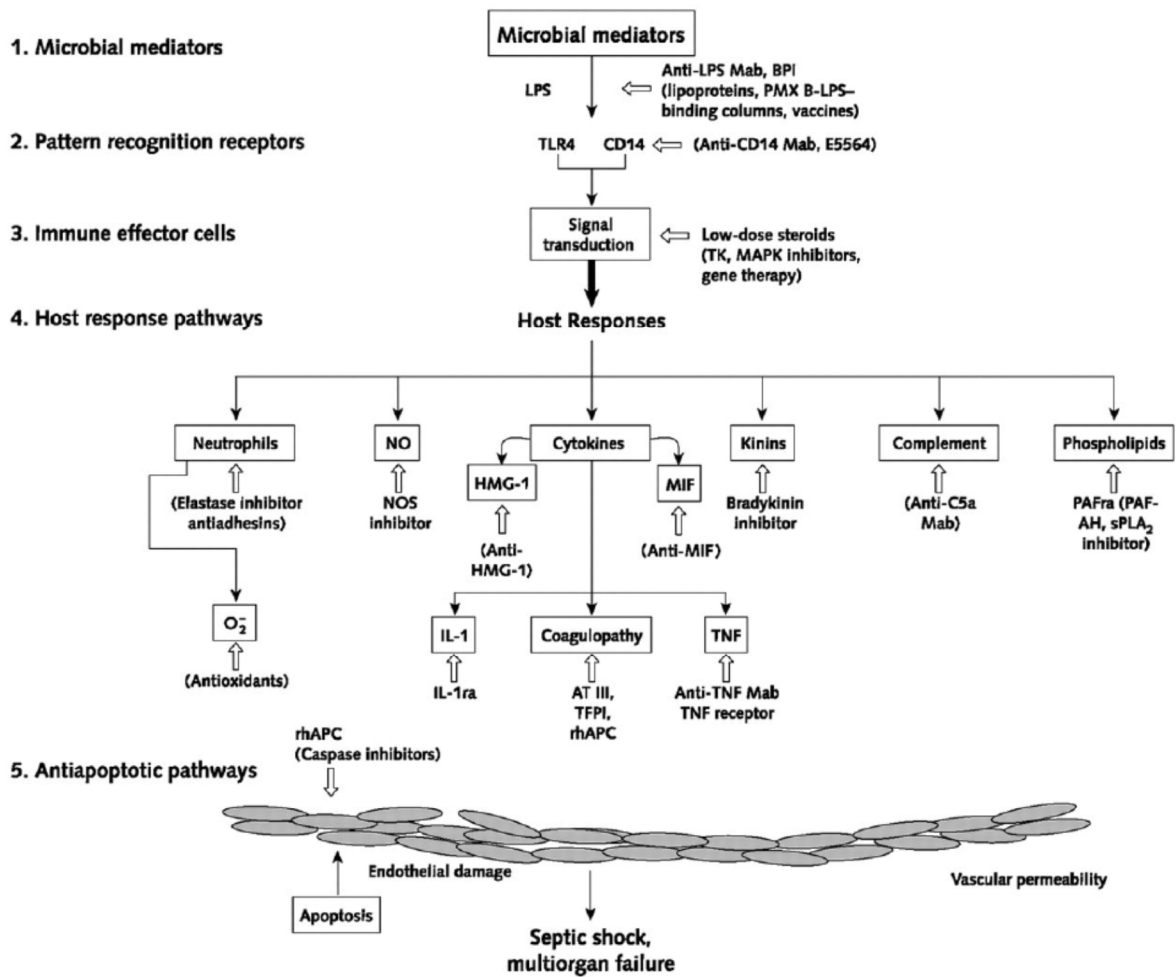


Şekil 2.7. NF-κB'nin sepsis şok patofizyolojindeki rolünün şematik gösterimi (121). 5-LO, 5-lipoxigenase; CINC, cytokine-induced neutrophil chemoattractant; COX, cyclooxygenase; DIC, disseminated intravascular coagulation; FLAP, 5-lipoxigenase-activating protein; ICAM, intercellular adhesion molecule; IFN, interferon; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LTB, leukotriene B; LTD, leukotriene D; LTE, leukotriene E; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, macrophage inflammatory protein; NF-κB, nuclear factor κB; NO, nitric oxide; PAI, plasminogen-activator inhibitor type; PGE, prostaglandin E; PGF, prostaglandin F; PGI₂, prostaglandin I₂; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; TBXA, thromboxane A₂; TF, tissue factor; TNF, tumor necrosis factor; VCAM, vascular cell adhesion molecule.

Öte yandan, aşırı düzeylerde oksidan oluşumu ve/veya antioksidanların azalmasına bağlı olarak ortaya çıkan oksidan/antioksidan dengenin bozulması sonucunda gelişen enflamasyon oksidatif strese neden olmaktadır. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin aşırı düzeylerde oluşumuna bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres ise, septik şok gibi çeşitli hastalıklarda sıklıkla görülen mortaliteye neden olabilmektedir. Endotoksemi sırasında oksidatif stres ve doku zedelenmesinin göstergelerinin arttığı çeşitli hayvan modellerinde ve insanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (2, 195-200). Septik şokta görülen sistemik hipotansiyon, vasküler hiporeaktivite, çoklu organ yetmezliği ve yüksek mortalite oranından sorumlu tutulan ve reaktif nitrojen türlerinden NO ve peroksinitritin endotoksemi sırasında oksidatif DNA zedelenmesi ile birlikte olan doku zedelenmesine katkısı ile ilgili bulgular çelişkilidir (2, 195, 199). Öte yandan, iNOS inhibitörlerinin endotoksin ile azalan antioksidan kapasite ve doku zedelenmesinin önlenmesinde etkili olabileceği pek çok klinik araştırmada gösterilmiştir (2, 199, 200).

2.1.4. Tedavisi

Sepsis ve septik şok tedavisinin başlıca hedefleri arasında patojenin zamanında tanımlanması, enfeksiyon kaynağının yok edilmesi, antimikrobiyal tedavi, septik şoka neden olabilecek olaylar zincirinin engellenmesi ve organlardaki işlev bozukluğunun düzeltilmesi bulunmaktadır. Günümüzde antibiyotik kullanılmadan yapılması gereken yaklaşımlarda ise destekleyici bakımın iyileştirilmesi (oksijenasyon/ventilasyon yaklaşımları, sıvı/vazopresör kullanımının optimize edilmesi, erken hedefe yönelik tedavi vb.), bakteriyel virülans faktörlerinin engellenmesi (antiendotoksin antikorlar, endotoksin uzaklaştırıcı kolonlar vb.) ve konağa ilişkin etkenlerin baskılanması (kortikosteroidler, antisitokin ilaçlar, antikoagülanlar vb.) hedeflenmektedir. Öte yandan, septik şokta onlarca sayıda değişik mediyatörün bulunması ve birbirleri ile etkileşmelerinden dolayı, sepsis ve septik şokun tek bir ilaç ile tedavisi olası gibi görünmemekte, mediyatör veya zarar gören organa özgü tedavi yaklaşımlarına gerek duyulmaktadır (Şekil 2.8). Bundan



Şekil 2.8. Septik şok tedavisinde patojenezde rol oynayan mediyatörlere yönelik tedavi yaklaşımları (203). *AT III*, antithrombin III; *BPI*, bactericidal permeability-increasing protein; *CD*, cluster of differentiation; *HMG-1*, high mobility group I; *IL*, interleukin; *IL-1ra*, interleukin-1 receptor antagonist; *LPS*, lipopolysaccharide; *Mab*, monoclonal antibody; *MAPK*, mitogen-activated protein kinase; *MIF*, macrophage migration inhibitory factor; *NO*, nitric oxide; *NOS*, nitric oxide synthase; *O₂⁻*, superoxide; *PAF-AH*, platelet-activating factor acetylhydrolase; *PAFra*, platelet activating factor receptor antagonist; *PMX B*, polymyxin B; *rhAPC*, recombinant human activated protein C; *sPLA₂*, secretory phospholipase A₂; *TFPI*, tissue factor pathway inhibitor; *TK*, tyrosine kinase; *TLR*, toll-like receptor; *TNF*, tumor necrosis factor.

dolayı, bakteriyel bileşenler, konak kökenli enflamasyon gelişmesinde rol oynayan mediyatörler ile doku zedelenmesine neden olan mediyatörlere karşı uygulanacak uygun tedavi yaklaşımları, özellikle enflamasyon sırasında gelişen olayları azaltarak, vasküler işlev bozukluğu ile hemodinamik bozuklukları düzelterek ve doku zedelenmesi ile çoklu organ yetmezliği gelişmesini önleyerek sepsis ve septik şokun tedavisinde mortalitenin azaltılarak yaşam süresinin uzatılmasında yarar sağlayabilecektir. Öte yandan, çeşitli tedavi yaklaşımları arasında olan glukokortikoidler, seçici veya seçici olmayan COX veya NOS inhibitörleri, NO veya NO donörleri, anti-LPS antikorlar, TNF- α ve IL-1 β reseptör antagonistleri kullanılarak yapılan klinik çalışmalarda istenilen başarıya ulaşılamamıştır (1, 2, 88, 90, 91, 201-211).

Erişkinlerde sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *Surviving Sepsis Campaign*'in yapılmasını şiddetle önerdiği ve en son 2012 yılında güncellenerek yayınlanan yaklaşımlar Çizelge 2.2'de özetlenmiştir (1). Dellinger ve ark. (1) tarafından yapılan yayında, septik şoklu pediatrik hastalar için önerilen yaklaşımlar ayrıca ayrıntılı bir biçimde açıklanmış olup, infantlar ve çocuklarda hemodinamik desteğin sürdürülmesinde zamana duyarlı ve amaca yönelik algoritma Şekil 2.9'da verilmiştir. Uluslararası düzeyde kabul görmüş olan ve özel durumlar dışında yapılması önerilen yaklaşımlara göre, ilk 3 saat içerisinde laktat düzeyleri ölçülmeli, antibiyotik uygulamasından önce kan kültürleri elde edilmeli, geniş spektrumlu antibiyotikler uygulanmalı ve hipotansiyon varsa ya da laktat düzeyleri ≥ 4 mmol/l ise 30 ml/kg kristaloit uygulanmalıdır. İlk 6 saat içerisinde ise, başlangıçtaki sıvı resüsitasyonuna yanıt vermeyen hipotansiyon olgularında ortalama arter basıncı (OAB)'nin ≥ 65 mmHg düzeyinde sürdürebilmesi için vazopresörler kullanılmalı, sıvı resüsitasyonuna karşın inatçı arteriyel hipotansiyonun olduğu durumda (septik şokta) veya başlangıçtaki laktat düzeyleri ≥ 4 mmol/l (36 mg/dl) olduğunda santral venöz basınç (≥ 8 mmHg olmalı) ile santral venöz oksijen doygunluğu ($\geq 70\%$ olmalı) ölçülmeli ve eğer başlangıçtaki laktat düzeyleri yüksekse, yeniden ölçüm yapılmalıdır (1).

Çizelge 2.2. Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *Surviving Sepsis Campaign*'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar (1).

İLK RESÜSİTASYON VE ENFEKSİYON SORUNLARI

A. İlk resüsitasyon

1. Sepsisin neden olduğu doku hipoperfüzyonu olan hastaların resüsitasyonu için ilk 6 saat içindeki hedefler şunlardır:
 - a) Santral venöz basınç 8-12 mmHg
 - b) OAB \geq 65 mmHg
 - c) İdrar çıkışı \geq 0.5 ml/kg/sa.
 - d) Santral venöz (süperiyor vena kava) veya karışık venöz oksijen doyunluğu sırasıyla %70 veya %65 (derece 1C)
2. Laktat düzeyi yüksek olan hastalarda laktat düzeyi normal değerlere getirilmelidir (derece 1C).

B. Sepsis için tarama ve performans iyileştirilmesi

1. Erken tedavi uygulanabilmesi için olasılıkla enfekte ve ciddi derecede hasta olan bireyler şiddetli sepsis açısından rutin olarak taranmalıdır (derece 1C).
2. Şiddetli sepsiste hastane temelli performans iyileştirme girişimlerinde bulunulmalıdır (derecelendirilmemiş).

C. Tanı

1. Antimikrobiyal tedaviye başlanmadan önce (eğer antimikrobiyal tedaviye başlanmışsa 45 dakikadan uzun süre geçmemiş olması koşuluyla) kültür yapılmalıdır (derece 1C). Aerobik ve anaerobik şişelerde en az 2 dizi kan kültürü yapılmalıdır (derece 1C).
2. Yapılabiliriyorsa ve enfeksiyon nedeni olarak yaygın kandidiyaz varsa, 1,3-beta-D-glukan testi (derece 2B), manan ve antimannan antikor testleri yapılmalıdır (derece 2C).
3. Enfeksiyonun olası kaynağını doğrulamak için hızla görüntüleme çalışmaları yapılmalıdır (derecelendirilmemiş).

Ç. Antimikrobiyal tedavi

1. Bir tedavi hedefi olarak etkili intravenöz antimikrobiyaller septik şok (derece 1B) ve septik şok olmaksızın şiddetli sepsis (derece 1C) tanısından sonraki ilk bir saat içinde uygulanmalıdır.
 - 2a. İlk ampirik antienfektif tedavi bütün olası patojenlere (bakteriyel ve/veya fungal ya da viral) karşı etkili ve olası enfeksiyon kaynağındaki dokulara yeterli miktarda geçebilen bir veya daha çok ilaç ile yapılmalıdır (derece 1B).
 - 2b. Antimikrobiyal tedavi günlük olarak yeniden değerlendirilmelidir (derece 1B).
 3. Başlangıçta septik olduğu görülen, ancak enfeksiyon olduğuna ilişkin yeterli kanıt olmayan hastalarda, ampirik antibiyotiklerin kullanımının bırakılması için hekime yardımcı olması açısından düşük prokalsitonin düzeyleri veya benzeri biyobelirteçler kullanılmalıdır (derece 2C).
 - 4a. Şiddetli sepsisi olan nötropenik hastalarda (derece 2B) ve tedavisi güç çoklu ilaca dirençli *Acinobacter* ve *Pseudomonas* spp. gibi bakteriyel patojenlerin saptandığı hastalarda (derece 2B) kombine ampirik tedavi yapılmalıdır. Solunum yetmezliği ve septik şok ile birlikte çeşitli enfeksiyonları olan hastalarda, geniş spektrumlu bir beta-laktam ile birlikte ya bir aminoglikozit veya bir florokinolon ile *P. aeruginosa* bakteremisi için kombinasyon tedavisi yapılmalıdır (derece 2B). Bakteremik *Streptococcus pneumoniae* enfeksiyonlarından dolayı septik şok gelişen hastalarda beta-laktam ve makrolit kombinasyonu kullanılmalıdır (derece 2B).
 - 4b. Ampirik kombinasyon tedavisi 3-5 günden uzun süre yapılmamalıdır. Şüphelenilen etken belirlenir belirlenmez uygun olan bir tek tedavi uygulanmalıdır (derece 2B).
 5. Tedavinin süresi tipik olarak 7-10 gündür; daha uzun süreli tedavi klinik yanıtın yavaş olduğu, enfeksiyon kaynağının boşaltılmadığı, *S. aureus*'un neden olduğu bakteremi, bazı fungal ve viral enfeksiyonlar ya da nötropeni gibi immünolojik yetersizliklerin olduğu hastalarda uygun olabilir (derece 2C).
 6. Viral kaynaklı şiddetli sepsis ve septik şoku olan hastalarda olabildiğince erken antiviral tedaviye başlanmalıdır (derece 2C).
 7. Enfeksiyöz bir nedenin olmadığı saptanan şiddetli enflamasyon ile belirgin bir durumu olan hastalarda antimikrobiyal ilaçlar kullanılmamalıdır (derecelendirilmemiş).
-

Çizelge 2.2 (devam). Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *Surviving Sepsis Campaign*'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar (1).

D. Kaynak kontrolü

1. Acil kaynak kontrolünün önemli olduğu durumlarda enfeksiyonun özgül bir anatomik tanısının konulması düşünülebilir ve olabildiğince hızlı ya tanı konulabilir ya da dışlanabilir, eğer yapılabiliyorsa tanı konulduktan sonra ilk 12 saat içinde kaynak kontrolü için girişim yapılabilir (derece 1C).
2. Olası enfeksiyon kaynağı olarak enfekte peripankreatik nekroz tanımlanmışsa, canlı ve cansız dokuların sınırları belirleninceye dek kesin girişim geciktirilir (derece 2B).
3. Şiddetli septik bir hastada kaynak kontrolü gerektiğinde, apsenin cerrahiden çok perkütanöz olarak boşaltılması gibi en az fizyolojik zarar oluşturabilecek biçimde etkili bir girişim yapılmalıdır (derecelendirilmemiş).
4. Damar içi giriş aygıtları, şiddetli sepsis veya septik şokun olası kaynaklarından biri olduklarından, öteki damar girişleri yerleştirildikten sonra hızla çıkarılmalıdırlar (derecelendirilmemiş).

E. Enfeksiyonun önlenmesi

- 1a. Ventilatör ile ilişki pnömoni insidensini azaltmak için bir yöntem olarak, seçici oral dekontaminasyon ve seçici dijestif dekontaminasyon uygulanmalı ve araştırılmalıdır (derece 2B).
- 1b. Yoğun bakım birimlerinde şiddetli sepsisi olan hastalarda, ventilatör ile ilişkili pnömoni riskini azaltmak için orofaringeal dekontaminasyon amacıyla oral klorheksidin glukonat kullanılabilir.

HEMODİNAMİK DESTEK VE YARDIMCI TEDAVİ

F. Şiddetli sepsiste sıvı tedavisi

1. Şiddetli sepsis ve septik şokun resüsitasyonunda ilk seçenek kristaloitlerdir (derece 1B).
2. Şiddetli sepsis ve septik şokta sıvı resüsitasyonu için hidroksietil nişastaları kullanılmalıdır (derece 1B).
3. Şiddetli sepsis ve septik şokun sıvı resüsitasyonunda hastaların kristaloitlere gereksinimi olduğunda albümin kullanılabilir (derece 2C).
4. Hipovolemiden şüphelenildiği sepsisin neden olduğu doku hipoperfüzyonu olan hastalarda en az 30 ml/kg kristaloit düzeyini (bir miktarı albümine eşdeğer olabilir) sağlamak için başlangıçta sıvı uygulanmalıdır. Bazı hastalarda daha fazla miktarda sıvının hızla uygulanması gerekebilir (derece 1C).
5. Sıvı uygulanmasına ya dinamik (nabız basıncı, vuru hacmi değişikliği vb.) ya da statik (arteriyel basınç, kalp hızı vb.) değişkenler açısından hemodinamik düzelleme sağlanıncaya dek devam edilir (derecelendirilmemiş).

G. Vazopresörler

1. OAB'nin 65 mmHg olmasını sağlamak için ilk olarak vazopresör tedavi yapılmalıdır (derece 1C).
 2. İlk seçilecek vazopresör noradrenalindir (derece 1B).
 3. Kan basıncının yeterli düzeyde sürdürebilmesi için bir başka ilaç gerektiğinde, adrenalin eklenebilir veya yerine noradrenalin uygulanabilir (derece 2B).
 4. OAB'yi yükseltmek veya noradrenaline gereksinimi azaltmak amacıyla, vazopresin 0.03 ünite/dk. dozda noradrenaline eklenebilir (derecelendirilmemiş).
 5. Sepsisin neden olduğu hipotansiyon tedavisi için başlangıçta tek ilaç olarak düşük dozda vazopresin önerilmemektedir; vazopresin 0.03-0.04 ünite/dk.'dan yüksek dozlarda kurtarma tedavisinde uygulanmalıdır (derecelendirilmemiş).
 6. Yalnızca seçilmiş hastalarda (takiaritmi ve bradikardi riski düşük olan hastalar vb.) noradrenaline karşı bir başka vazopresör seçenek olarak dopamin kullanılabilir (derece 2C).
 7. Noradrenalin ile ciddi aritmilerin ortaya çıktığı, kalp debisinin yüksek ve kan basıncının sürekli düşük olduğu ve kurtarma tedavisi olarak inotropik/vazopresör ilaçlar ile düşük doz vazopresin birlikte uygulandığında OAB'nin hedeflenen düzeye getirilemediği gibi bazı özel durumlar dışında, fenilefrin septik şok tedavisinde önerilmemektedir (derece 1C).
 8. Düşük dozda dopamin böbrekleri korumak amacıyla kullanılmalıdır (derece 1A).
 9. Eğer kaynaklar yeterliyse, vazopresörlere gerek duyan bütün hastalara olabildiğince kısa sürede bir arteriyel kateter yerleştirilmelidir (derecelendirilmemiş).
-

Çizelge 2.2 (devam). Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *Surviving Sepsis Campaign*'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar (1).

Ç. İnotropik tedavi

1. Yükselmiş kardiyak dolum basıncı ve düşük kalp debisinin olduğu miyokardiyal işlev bozukluğu veya yeterli intravasküler hacim ve OAB sağlanmasına karşın devam eden hipoperfüzyon belirtilerinin olması durumunda, dobutamin 20 µg/kg/dk. dozda infüzyon ile tek başına uygulanabilir veya uygulanmaya başlanmış olan bir vazopresöre eklenebilir (derece 1C).
2. Kardiyak indeksi önceden belirlenmiş normalin üzerindeki değerlere yükseltmek bir strateji olarak kullanılmamalıdır (derece 1B).

H. Kortikosteroidler

1. Yeterli sıvı resüsitasyonu ve vazopresör tedavisi ile hemodinamik durumun düzeltilebildiği erişkin septik şoklu hastaların tedavisinde intravenöz hidrokortizon kullanılmamalıdır. Hemodinamik durumun düzeltilemediği durumlarda, günde bir kez 200 mg dozda olmak üzere hidrokortizon tek başına intravenöz yoldan uygulanabilir (derece 2C).
2. Hidrokortizon uygulanması gereken septik şoklu erişkin hastalarda ACTH uyarı testi yapılmamalıdır (derece 2B).
3. Vazopresörlerin kullanımına gerek kalmadığında, tedavi gören hastalarda hidrokortizon dozu giderek azaltılmalıdır (derece 2D).
4. Kortikosteroidler şokun olmadığı sepsis tedavisinde kullanılmamalıdır (derece 1D).
5. Düşük dozda hidrokortizon kullanıldığında, yinelenen bolus enjeksiyonlar yerine, sürekli infüzyon ile uygulanmalıdır (derece 2D).

ŞİDDETLİ SEPSİSİN TEDAVİSİNDE ÖTEKİ DESTEKLEYİCİ YAKLAŞIMLAR

I. Kan ürünü uygulanması

1. Doku hipoperfüzyonu sağlandığında ve miyokardiyal iskemi, şiddetli hipoksemi, ıveğen hemoraji veya iskemik kalp hastalığı gibi hafifletici durumların yokluğunda, yalnızca erişkinlerde hemoglobini 7-9 g/dl arasında olmasını sağlamak amacıyla, hemoglobini < 7 g/dl'ye düştüğünde kırmızı kan hücresi transfüzyonu yapılmalıdır (derece 1B).
2. Şiddetli sepsis ile birlikte olan aneminin özgül bir tedavisi olarak eritropoietin kullanılmamalıdır (derece 1B).
3. Kanama olmaması veya invazif bir girişim tasarlanmaması durumunda, taze dondurulmuş plazma laboratuvar pıhtılaşma anormalliklerini düzeltmek için kullanılmamalıdır (derece 2D).
4. Şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için antitrombin kullanılmamalıdır (derece 1B).
5. Şiddetli sepsisi olan hastalarda, görünürde bir kanama olmaması durumunda eğer sayıları < 10.000 mm³ (10 x 10⁹/l) ise profilaktik olarak trombosit uygulanmalıdır. Hastada anlamlı bir kanama riski olduğunda, sayıları < 20.000 mm³ (20 x 10⁹/l) ise ise profilaktik olarak trombosit uygulanmalıdır. Etkin kanama, cerrahi girişim veya girişimsel işlemler için daha yüksek miktarda trombosit sayısı (≥ 50.000 mm³ [50 x 10⁹/l]) önerilmektedir (derece 2D).

İ. İmmünoglobulinler

1. Şiddetli sepsis ve septik şoku olan erişkin hastalarda intravenöz immünoglobulinler kullanılmamalıdır (derece 2B).

J. Selenyum

1. Şiddetli sepsis tedavisi için intravenöz selenyum kullanılmamalıdır (derece 2C).

K. Rekombinant etkinleştirilmiş protein C

1. Piyasadan çekildiğinden kullanımı için öneride bulunulmamıştır.
-

Çizelge 2.2 (devam). Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *Surviving Sepsis Campaign*'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar (1).

L. Sepsisin neden olduğu ARDS için mekanik ventilasyon

1. Sepsisin neden olduğu ARDS'li hastalarda 6 ml/kg (kestirilen vücut ağırlığına göre) tidal hacim hedeflenmelidir (12 ml/kg'a karşı derece 1A).
2. ARDS'li hastalarda plato basınçları ölçülmelidir ve pasif olarak şişirilmiş bir akciğerdeki plato basınçları için başlangıçtaki üst sınır hedefi ≤ 30 cm H₂O olmalıdır (derece 1B).
3. Son ekspirasyonda alveolar kolapstan (atelektotravma) kaçınmak amacıyla pozitif son ekspiratuvar basınç uygulanmalıdır (derece 1B).
4. Sepsisin neden olduğu orta veya şiddetli ARDS'li hastalarda düşük pozitif son ekspiratuvar basınç değerlerinden daha yüksekini temel alan stratejiler kullanılmalıdır (derece 2C).
5. Şiddetli refrakter hipoksemisi olan sepsis hastaları için iyileştirme girişimlerinde bulunulmalıdır (derece 2C).
6. Uygun koşulların sağlanmasında yeterli deneyimin olması durumunda, Pao₂/Fio₂ değeri ≤ 100 mmHg olan sepsisin neden olduğu ARDS'li hastalar yüzüstü yatırılmalıdır (derece 2B).
7. Mekanik olarak solutulan sepsis hastaları, aspirasyon riskini sınırlandırmak ve ventilatör ile birlikte olan pnömoni gelişmesini önlemek amacıyla, baş tarafının 30-45 derece yükseltilmiş olduğu bir yatakta yatırılmalıdır (derece 1B).
8. Yararlı olabileceği düşünülen sepsisin neden olduğu ARDS'li hastaların bazılarında girişimsel olmayan maske solunumu kullanılmalıdır (derece 2B).
9. Uyandırılabilir, hemodinamik açıdan stabil (vazopresör ilaç kullanmaksızın), yeni bir ciddi olası durumun olmadığı, düşük ventilatör ve son ekspiratuvar basınç gereksinimi olan ve bir yüz maskesi ya da nazal kanül aracılığıyla güvenli bir biçimde sağlanan düşük Fio₂ gereksinimi olan mekanik olarak solutulan şiddetli sepsisi olan hastalarda, mekanik ventilasyona devam edilip edilmeyeceğini değerlendirmek amacıyla düzenli olarak kendiliğinden soluma denemeleri yapılmalıdır. Kendiliğinden soluma denemeleri başarılı olursa, tüpün çıkarılması düşünülmelidir (derece 1A).
10. Sepsisin neden olduğu ARDS'li hastalar için pulmoner arter kateteri rutin olarak kullanılmamalıdır (derece 1A).
11. Doku hipoperfüzyonu için kanıt olmayan sepsisin neden olduğu ARDS'li hastalar için serbestten çok, konservatif bir strateji uygulanmalıdır (derece 1C).
12. Bronkospazm gibi özgül endikasyonların olmaması durumunda, sepsisin neden olduğu ARDS tedavisi için β_2 -adrenerjik reseptör agonistleri kullanılmamalıdır (derece 1B).

M. Sepsiste sedasyon, analjezi ve nöromüsküler blokaj

1. Mekanik olarak solutulan sepsis hastalarında sedasyon, özgül titrasyon sonlanım noktaları hedeflenerek, sürekli veya aralıklı olarak en aza indirilmelidir (derece 1B).
2. Kullanımlarının bırakılmasının ardından uzun süre nöromüsküler blokaj riskinden dolayı, ARDS olmayan septik hastalarda nöromüsküler blokaj yapan ilaçlardan olabildiğince kaçınılmalıdır. Bu ilaçların kullanımının sürdürülmesi gerekiyorsa, ya gerektiği kadar aralıklı bolus olarak ya da blokajın derinliği izlenerek sürekli infüzyonla kullanılmalıdırlar (derece 1C).
3. Erken sepsisin neden olduğu ARDS'li ve Pao₂/Fio₂ değeri < 150 mmHg olan hastalar için 48 saatten uzun bir süre olmamak üzere nöromüsküler blokaj yapan ilaçlar kullanılabilir (derece 2C).

N. Glukoz kontrolü

1. Yoğun bakım birimlerindeki şiddetli sepsisi olan hastaların, eğer ardışık olarak iki kez ölçülen kan glukoz düzeyleri > 180 mg/dl ise, glukoz düzeylerinin kontrolünün sağlanabilmesi için insülin kullanılması gibi belirli bir yaklaşım uygulanmalıdır. Bu yaklaşımda kan glukoz düzeylerinin, ≤ 110 mg/dl değil, ≤ 180 mg/dl olması hedeflenmelidir (derece 1A).
 2. Kan glukoz değerleri ve insülin infüzyon hızları stabil oluncaya dek, glukoz düzeyleri önce her 1-2 saatte bir, daha sonra her 4 saatte bir ölçülmelidir (derece 1C).
 3. Arteriyel kan veya plazma glukoz düzeylerini tam olarak yansıtmabileceğinden, kapiler kanda glukoz düzeylerinin ölçümü dikkatli bir biçimde yapılmalıdır (derecelendirilmemiştir).
-

Çizelge 2.2 (devam). Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *Surviving Sepsis Campaign*'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar (1).

O. Renal replasman tedavisi

1. Şiddetli sepsisi ve ıveğen böbrek yetmezliği olan hastalarda sürekli renal replasman tedavisi ve aralıklı yapılan hemodiyaliz eődeęerdir (derece 2B).
2. Hemodinamik olarak stabil olmayan septik hastalarda sıvı dengesinin sürdürülmesini kolaylaőtırmak amacıyla sürekli tedavi uygulanmalıdır (derece 2D).

. Bikarbonat tedavisi

1. Hipoperfüzyon sonucunda pH değerinin ≥ 7.15 olduğu laktik asidemili hastalarda hemodinamik parametreleri düzeltmek veya vazopresör kullanımını azaltmak amacıyla sodyum bikarbonat tedavisi uygulanmamalıdır (derece 2B).

P. Derin ven tromboz profilaksisi

1. Şiddetli sepsisi olan hastalar venöz tromboembolizme karőtı her gün farmakoprofilaksi tedavisi alırlar (derece 1B). Farmakoprofilaksi günlük olarak subkütan düşük molekül ağırlıklı heparin uygulanmasıyla yapılmalıdır (günde iki kez fraksiyonlanmamıő heparine karőtı derece 1B, günde üç kez fraksiyonlanmamıő heparine karőtı derece 2C). Kreatinin klirensi < 30 ml/dk. ise dalteparin (derece 1A) veya renal metabolizması düşük olan bir baőtka düşük molekül ağırlıklı heparin (derece 2C) ya da fraksiyonlanmamıő heparin (derece 1A) kullanılmalıdır.
2. Şiddetli sepsisi olan hastalar farmakolojik tedavi ile birlikte uygun olduğunda aralıklı (*intermittent*) pnömatik kompresyon aygıtları ile tedavi edilmelidirler (derece 2C).
3. Heparin kullanımı için trombositopeni, şiddetli koagülopati, etkin kanama, yeni geçirilmiő intraserebral hemoraji gibi kontrendikasyon olan septik hastalarda farmakoprofilaksi yapılmamalıdır (derece 1B); ancak, bu hastalara eğer kontrendikasyon yoksa dereceli kompresyon çorapları veya aralıklı (*intermittent*) kompresyon aygıtlarının kullanımı gibi mekanik profilaktik özellikte bir tedavi uygulanabilir (derece 2C). Risk azaldığında farmakoprofilaksiye baőtlanmalıdır (derece 2C).

R. Stres lseri profilaksisi

1. Kanamaya neden olabilecek risk etkenleri olan şiddetli sepsis/septik Şoklu hastalarda stres ülseri profilaksisi H₂-reseptör blokörü veya proton pompa inhibitörü kullanılarak yapılmalıdır (derece 1B).
2. Stres lseri profilaksisinde H₂-reseptör blokrlerinden çok proton pompa inhibitörleri yeğlenmelidir (derece 2D).
3. Risk etkeni olmayan hastalara profilaksi uygulanmamalıdır (derece 2B).

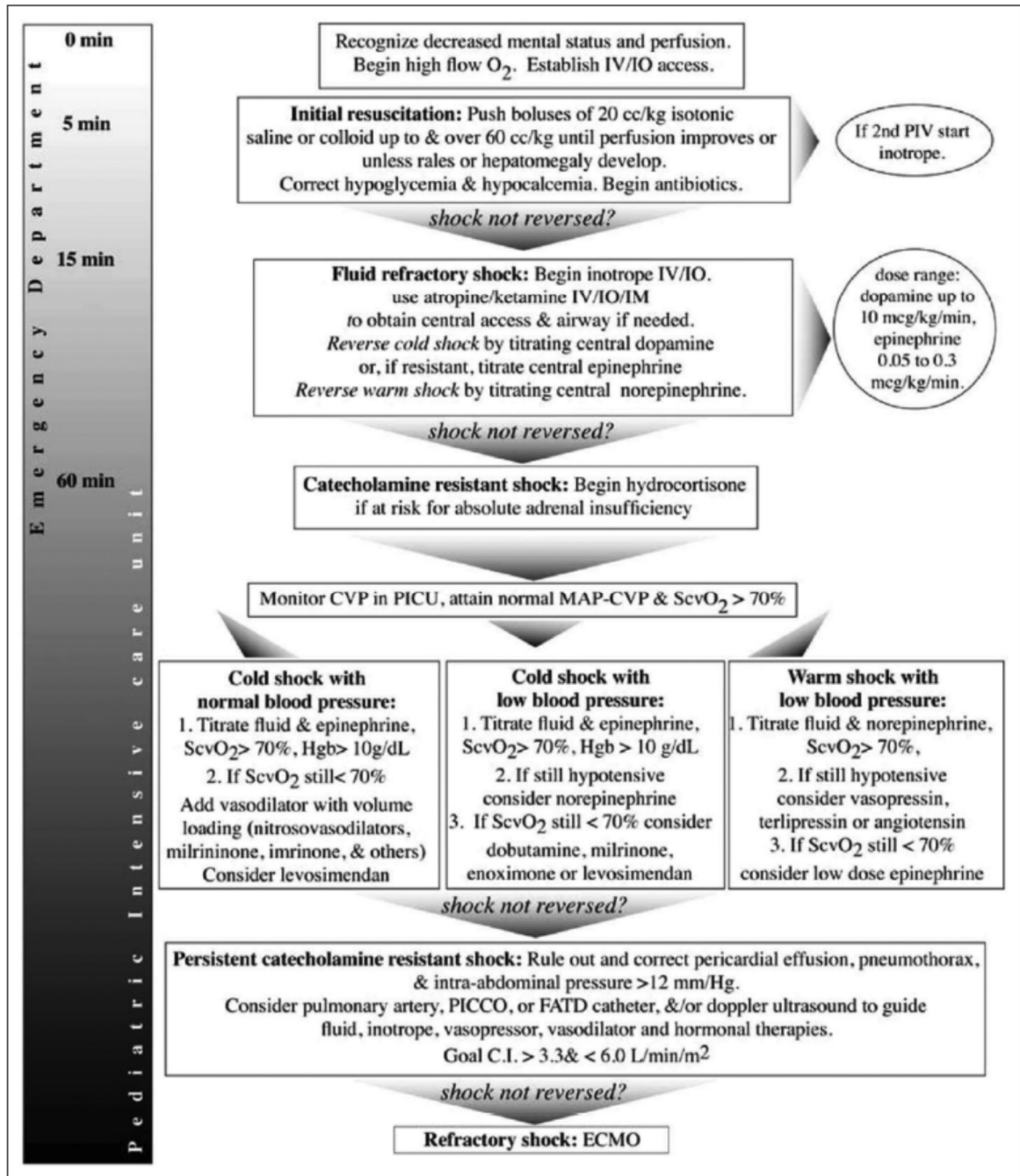
S. Beslenme

1. Şiddetli sepsis/septik Şok tanısından sonra ilk 48 saat içinde tam olarak a bırakma veya yalnızca intravenöz glukoz uygulanmasından çok, hastalar tolere edebiliyorsa, oral veya gerekiyorsa enteral yoldan besinler uygulanmalıdır (derece 2C).
2. İlk hafta içinde yüksek kalorili yiyeceklerden kaçınılmalı, ancak tolere edilebiliyorsa düşük kalorili yiyeceklerin (en çok günde 500 kalori olacak biçimde) uygulanması düşünülmelidir (derece 2B).
3. Şiddetli sepsis/septik Şok tanısından sonra ilk 7 gün içinde tek baőtına toplam parenteral beslenme veya enteral uygulama ile birlikte parenteral beslenmeden çok, intravenöz glukoz ve enteral beslenme uygulanmalıdır (derece 2C).
4. Şiddetli sepsisi olan hastalarda bağışıklık sistemini düzenlemeye özgü destekleme yerine, bağışıklık sistemini düzenlemeye özgül olmayan destekleme ile beslenme uygulanmalıdır (derece 2C).

Ő. Bakım amaçlarının düzenlenmesi

1. Hasta ve ailesi ile bakımın amaçları ve prognoz tartıŐılmalıdır (derece 1B).
2. Uygun olduğunda palyatif bakım prensipleri kullanılarak, bakımın amaçları tedavi ve yaşam sonunun planlanması ile birlikte ele alınmalıdır (derece 1B).
3. Yoğun bakım birimine baŐvurudan sonra 72 saat içinde, ancak daha geç değil, bakımın amaçları belirlenmelidir (derece 2C).

Kanıtın özelliğine göre sınıflandırma: Derece A, yüksek (randomize klinik denemelere dayanılarak); derece B, orta (*downgraded* randomize klinik denemelere veya *upgraded* gözlemsel çalıŐmalara dayanılarak); derece C, düşük (kontrol randomize klinik denemeler ile birlikte iyi yapılmış gözlemsel çalıŐmalara dayanılarak); derece D, çok düşük (*downgraded* kontrollü çalışmalar veya baőtka kanıtlara göre uzman görüŐüne dayanılarak). Önerinin gücüne göre sınıflandırma: Derece 1, gcl; derece 2, zayıf. ACTH, adrenokortikotropik hormon; ARDS, ıveğen solunum sıkıntısı sendromu; FıO₂, inspirasyonla alınan oksijen fraksiyonu; OAB, ortalama arter basıncı; PaCO₂, kan kısmi karbondioksit basıncı.



Şekil 2.9. Septik şoklu infantlar ve çocuklarda hemodinamik desteğin sürdürülmesi için önerilen zamana duyarlı ve amaca yönelik algoritma (1). CVP, central venous pressure; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; FATD, femoral artery thermodilution; Hgb, hemoglobin; IM, intramuscular; IO, intraosseous; IV, intravenous; MAP, mean arterial pressure; PICCO, pulse index contour cardiac output; PICU, pediatric intensive care unit; PIV, peripheral intravenous; ScvO₂, central venous oxygen saturation.

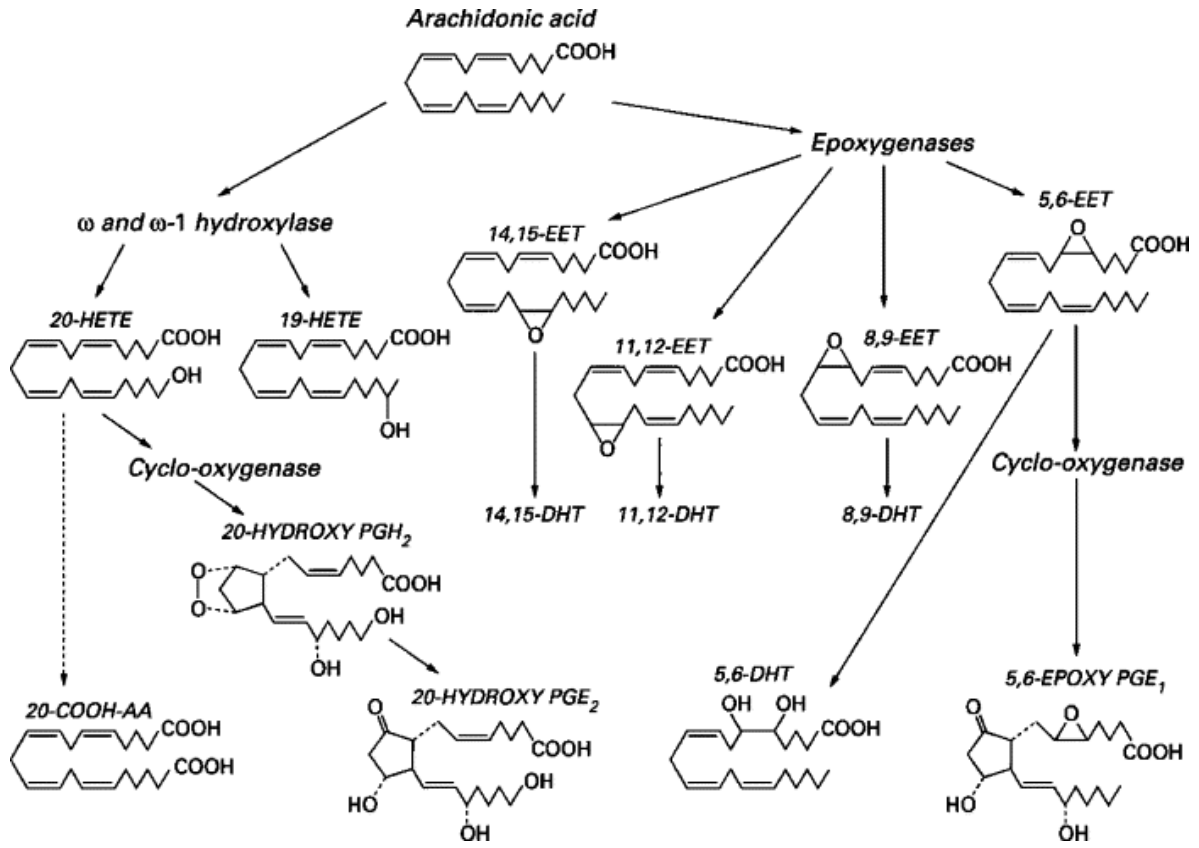
2.2. 20-HETE

2.2.1. Özellikleri

AA'nın bir ω -hidroksilasyon ürünü olan 20-HETE, böbrek, kalp, karaciğer, beyin, akciğer ve çeşitli damarlarda başlıca CYP4A ve CYP4F izoformları olmak üzere, CYP enzimleri tarafından oluşturulmaktadır. Sıçanların çeşitli dokularında CYP4A izoformlarından CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3 ve CYP4A8 ile CYP4F izoformlarından CYP4F1, CYP4F4, CYP4F5 ve CYP4F6 enzimlerinin 20-HETE oluşumundan sorumlu oldukları gösterilmiştir. İnsanlarda ise, 20-HETE oluşumunu katalizleyen homolog izoformlar CYP4A11, CYP4A22, CYP4F2 ve CYP4F3'tür. 20-HETE β -oksidasyon sonucunda daha kısa zincir uzunluğunda ve daha az etkili olan ürünlerine metabolize olmaktadır. 20-HETE, ayrıca, vazokonstriktör epoksitler veya vazodilatör prostanoitler oluşturmak üzere COX enzimleri tarafından da metabolize edilebilmektedir (2, 3, 39, 40, 42, 43, 45-47, 49, 50, 52-55, 212) (Şekil 2.10).

2.2.2. Fiziopatolojik Olaylardaki Rolü

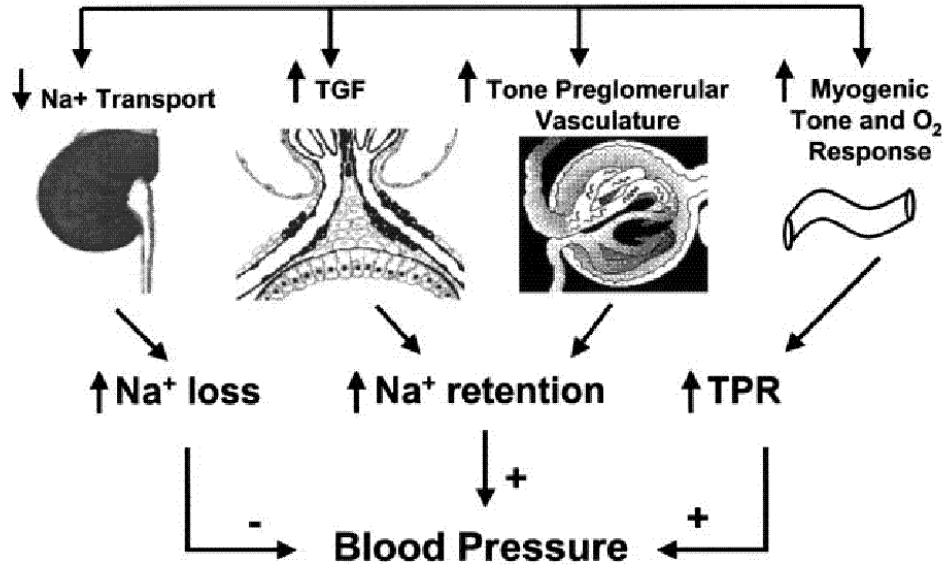
20-HETE damar geriminin düzenlenmesi, böbrek işlevi ve arteriyel kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hipertansiyon, iskemik vasküler, serebral, kardiyak ve renal hastalıklar, neovaskülarizasyon, diyabet, enflamasyon, polikistik böbrek hastalıkları, üremi, siroz gibi karaciğer hastalıkları, hepatorenal sendrom, gebelik toksemisi ve kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda 20-HETE oluşumunda değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, alkole bağlı karaciğer hastalığı, siklosporin veya sisplatinin neden olduğu nefrotoksisitede de 20-HETE düzeyleri değişmektedir. Diyet ile alınan sodyum veya potasyum miktarlarının değişmesi ve açlık durumlarında da 20-HETE düzeylerinin değişebildiği bildirilmiştir (2, 3, 39-55, 212-214).



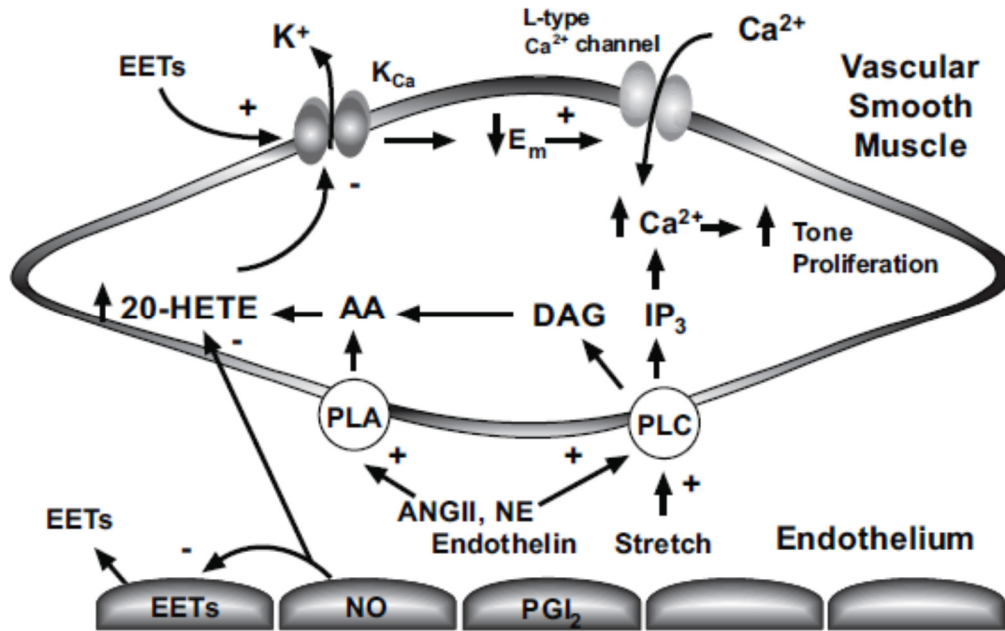
Şekil 2.10. Arakidonik asidin CYP'ye bağımlı monooksijenazlar (ω -hidroksilazlar ve epoksijenazlar) tarafından ω - ve $\omega-1$ -HETE'ler, epoksitler (EET'ler) ve diollere (DHT'lere) metabolizması (212). AA, arachidonic acid; CYP, cytochrome P450; DHT, dihydroxyicosatrienoic acid; EET, epoxyicosatrienoic acid; HETE, hydroxyicosatetraenoic acid; PGE, prostaglandin E; PGH, prostaglandin H.

20-HETE başlıca sistemik damar geriminin sağlanması ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. 20-HETE'nin böbreklerde sodyum kaybını artırarak kan basıncını düşürmesine karşın, tübüloglomerüler geri besleme ve preglomerüler damar yatağının gerimini artırması, ayrıca damarlarda miyojenik gerim ve oksijene verilen yanıtı artırarak toplam periferik damar direncini artırması sonucunda kan basıncını yükseltebilmektedir (49) (Şekil 2.11). 20-HETE'nin damar gerimini düzenleyici etkisinin mekanizması Şekil 2.12'de özetlenmiştir (49).

Pro- and Anti-Hypertensive Actions of 20-HETE

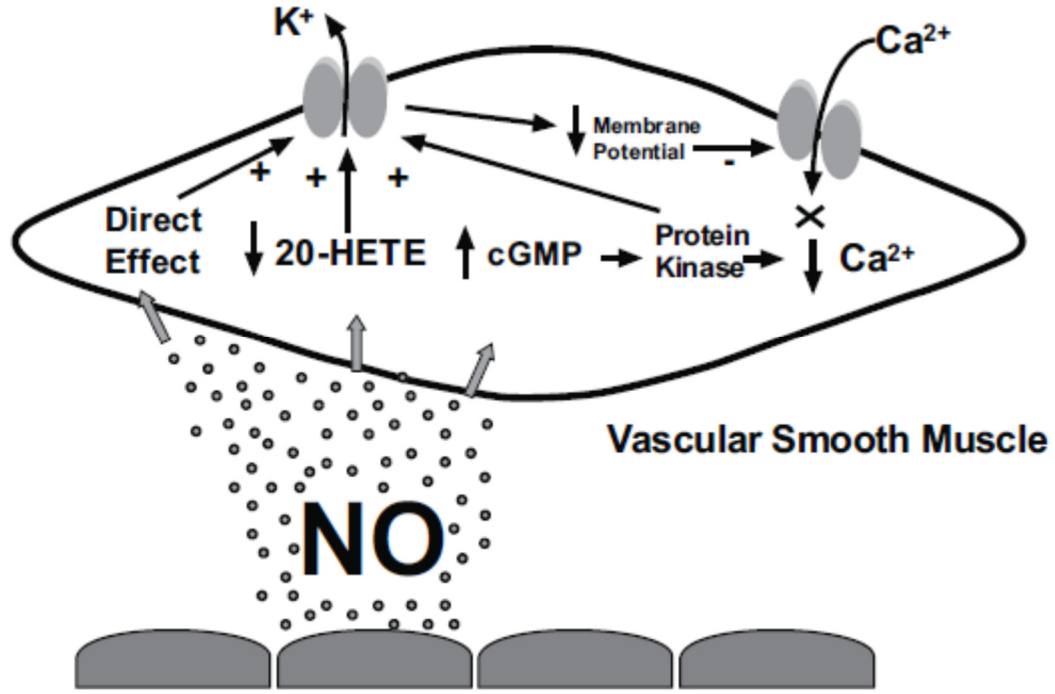


Şekil 2.11. 20-HETE'nin kan basıncını düzenleyici etkisi ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizma (49). 20-HETE, 20-hydroxieicosatetraenoic acid; TGF, tubuloglomerular feedback; TPR, total peripheral resistance.



Şekil 2.12. CYP aracılığı ile oluşan arakidonik asit metabolitlerinin damar gerimi üzerindeki etkileri ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar (49). 20-HETE, 20-hydroxieicosatetraenoic acid; AA, arachidonic acid; AngII, angiotensin II; CYP, cytochrome P450; DAG, diacyl glycerol; EETs, epoxyeicosatrienoic acids; IP₃, inositol-1,4,5-triphosphate; NE, norepinephrine; NO, nitric oxide; PGI₂, prostaglandin I₂; PLA, phospholipase A; PLC, phospholipase C.

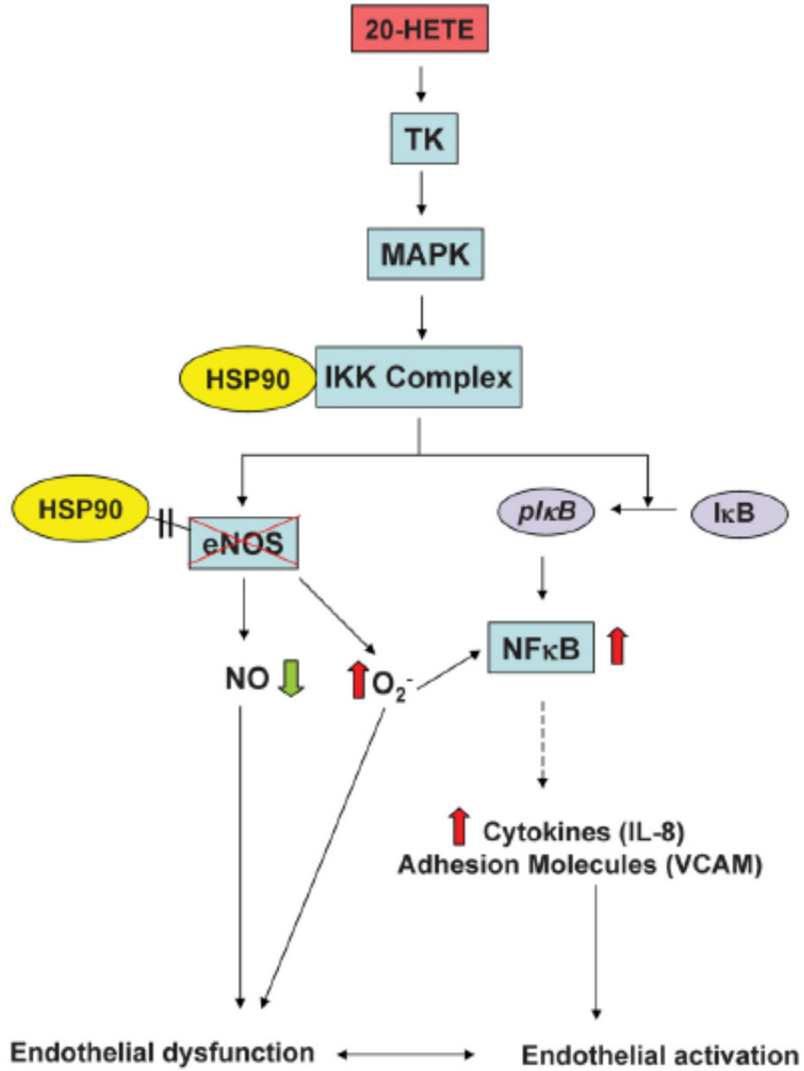
Vasküler dokularda 20-HETE oluşumu anjiyotensin II (215-217), endotelin (217, 218), noradrenalin (219, 220) ve serotonin (221) ile uyarılabilmektedir. 20-HETE renal, serebral, aortik, mezenterik ve koroner arterler gibi çeşitli damarlarda vazokonstriksiyona neden olmaktadır (222-226). 20-HETE'nin damar gerimini düzenleyici etkisine etkinliğini artırdığı PKC (227-230), MAPK, MEK ve ERK (230-232) ile Rho-kinaz (224) gibi kinazların aracılık ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, 20-HETE kalsiyum ile etkinleştirilen potasyum kanalını fosforile ederek etkinliğini azaltmakta, PKC'nin etkinleşmesi sonucunda L türü kalsiyum kanallarının iletkenliğini ve etkinliğini artırarak kalsiyum girişine neden olmakta ve böylece damar düz kasının sürekli depolarizasyonuna neden olmaktadır (226, 227, 230, 233). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, 20-HETE'nin miyojenik yanıtta rolü olduğu gösterilen geçici potansiyel reseptör kanalları aracılığıyla içeri yönelik seçici olmayan katyon akımlarını artırdığı bildirilmiştir (234, 235). Renal ve serebral arterlerde 20-HETE oluşumunun NO (236-240), karbon monoksit (241, 242) ve süperoksit radikalleri (243) ile inhibe edilebildiği, ayrıca 20-HETE düzeylerindeki düşmenin NO'nun K_{Ca} kanalları ve damar gerimi üzerindeki siklik guanozin 5'-monofosfat (*guanosine 5'-monophosphate*; GMP)'den bağımsız etkilerine kısmen aracılık ettiği gösterilmiştir (236-238, 240, 244) (Şekil 2.13). 20-HETE'nin neden olduğu vazokonstriksiyonun indometasin (223, 225) ve diklofenak (224) gibi COX inhibitörleri veya endoperoksit/tromboksan reseptör antagonisti SQ-29548 (224, 225) ile de önlenemediği bildirilmiştir. Ayrıca, damar endotel hücrelerinde COX aracılığı ile 20-HETE'den oluşan 20-OH-PGG₂ ve 20-OH-PGH₂'nin de 20-HETE'nin vazokonstriktör etkilerine aracılık ettiği gösterilmiştir (223, 225). Vazokonstriktör etkisinin tersine, 20-HETE'nin renal, koroner, pulmoner ve baziler arterlerde gevşetici etkisinin de olduğu bildirilmiştir (225, 245-249). 20-HETE'nin vazodilatör etkilerine NO salınması (249), 20-HETE'nin COX tarafından 20-OH-PGE₂ ve 20-OH-PGF_{2α}'ya dönüştürülmesi (224, 245, 247) ile PGE₂ (247) ve PGI₂ (245-248) oluşumundaki artmanın aracılık ettiği ileri sürülmüştür.



Şekil 2.13. Renal ve serebral arterlerde potasyum kanal etkinliği ve damar gerimi üzerinde NO'nun etkileri ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar (49). *20-HETE*, *20-hydroxycosateetraenoic acid*; *cGMP*, *cyclic guanosine 5'-monophosphate*; *NO*, *nitric oxide*.

Daha önce yapılan çalışmalarda, özellikle CYP4A8 izoformu aracılığı ile olan 20-HETE'nin vasküler oluşumunun arttığı durumlarda endotelial işlevsizlik ve hipertansiyon arasında neden/etki ilişkisinin olduğu sonucuna varılmıştır (50). Araştırmacılar, 20-HETE'nin, bütün NOS izoformlarının etkinleştirilmesinde rolü olduğu bilinen hsp90'ın (250-256) eNOS ile etkileşmesini önleyerek NO oluşumunu azaltırken, süperoksit oluşumunu artırabileceği ve böylece endotelial işlevsizliğe neden olabileceğini ve damar gerimini artırabileceğini ileri sürmüşlerdir (257, 258). Ayrıca, 20-HETE'nin süperoksit, gp91^{phox} p47^{phox} ve nitrozillenmiş proteinlerin vasküler ekspresyonunu artırarak (259) ve endotel hücrelerinde doğrudan etkisi ile de (260) süperoksit oluşumuna neden olabileceği gösterilmiştir. Damar yatağında 20-HETE ile oluşumu artan süperoksidin ise NO'nun biyoyararlanımını azaltabileceği ve böylece endotelial işlevsizlik ve hipertansiyona neden olabileceği ileri sürülmüştür (50). Gerçekten de, Cheng ve ark. (261) tarafından 20-HETE

oluşumundaki artmanın, NF- κ B'nin etkinleşmesinin ardından eNOS'un kenetsizlenmesi (*uncoupling*) ve böylece NO'nun oluşumu ve yararlanımının azalması sonucunda vasküler oksidatif stresi artırabileceği ve endotelial işlev bozukluğuna neden olabileceği gösterilmiştir (Şekil 2.14).

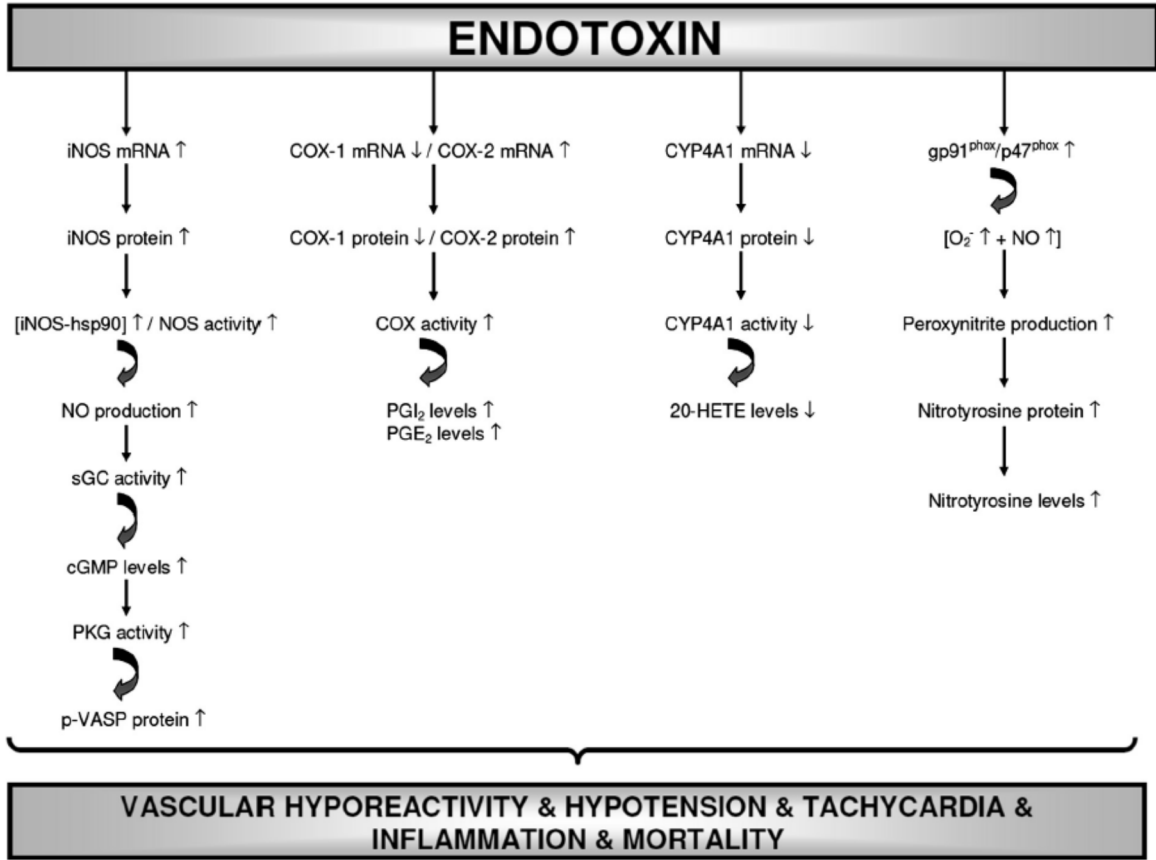


Şekil 2.14. 20-HETE'nin neden olduğu endotelial işlev bozukluğu ve etkinleşmesi ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar (261). 20-HETE, 20- hydroxieicosatetraenoic acid; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; HSP90, heat shock protein 90; IκB, κB inhibitor; IL, interleukin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NFκB, nuclear factor κB; NO, nitric oxide; O₂⁻, superoxide; pIκB, phosphorylated inhibitor of κB; TK, tyrosine kinase; VCAM, vascular cell adhesion molecule.

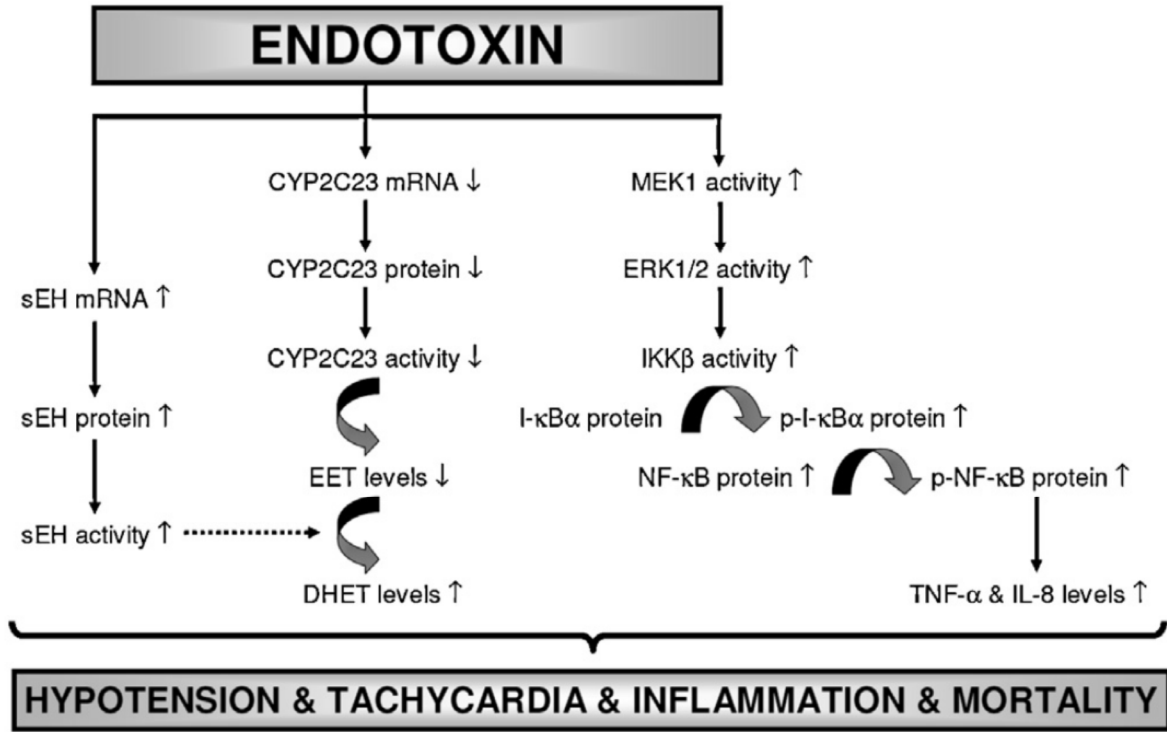
Son yıllarda yapılan çalışmalarda, 20-HETE'nin insan endotel hücrelerinde MEK1/ERK1/2/NF-κB yolunun etkinliğinin artması ve NF-κB p65'in nükleer translokasyonu sonucunda enflamasyon gelişmesinde rol oynayan mediyatörlerden hücre içi adezyon molekülü (*intercellular adhesion molecule*; ICAM), 3-nitrotirozin, PGE₂, 8-epi-izoprostan PGF_{2α}, IL-4, IL-8 ve IL-13 düzeylerini artırdığı, böylece güçlü bir biçimde enflamasyona neden olabileceği bildirilmiştir (262). Sığır endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, 20-HETE'nin NO oluşumunu inhibe ettiği, ancak NF-κB etkinliğini artırdığı, 20-HETE'nin bu etkilerinin ise tirozin kinaz ve MEK1/ERK1/2 inhibitörleri ile önlenebildiği gösterilmiştir (261). Endotoksemi sırasında sıçanların hepatik iNOS mRNA'sı olduğu kadar (263), öbür çoğu hepatik CYP gen ürünlerinin *down*-regülasyonuna karşın (264-267), karaciğer ve böbreklerinde CYP4A1, CYP4A2 ve CYP4A3 mRNA'larının indüklendiği gösterilmiştir (263, 268). Endotoksinin neden olduğu hepatik CYP2C11, CYP2E1 ve CYP3A2 mRNA ve/veya protein ekspresyonundaki *down*-regülasyonun iNOS inhibisyonu ile değişmediği bildirilmiştir (265). Öte yandan, endotoksemi sırasında sıçanlarda NO oluşumundaki artmanın hepatik mikrozomal toplam CYP içeriği, CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2C6, CYP2C11, CYP3A1 ve CYP3A2 mRNA ve protein ekspresyonu ile etkinliğindeki azalma ile birlikte olduğu, ayrıca NO oluşumu ve CYP ekspresyonundaki değişikliklerin NOS inhibitörleri ile önlenebildiği gösterilmiştir (267, 269-271). Bunlara ek olarak, gebelik sırasında oluşumu artan NO'nun sıçanların küçük renal damarlarında CYP4A ekspresyonu ve 20-HETE sentezini inhibe ettiği, NOS inhibisyonundan sonra renal 20-HETE sentezindeki artmanın CYP4A inhibitörü aminobenzotriazol ile önlenebilen kan basıncında yükselme ile birlikte olduğu bildirilmiştir (272). Son yıllarda sıçan veya farelere LPS enjeksiyonu ile oluşturulan süreğen sistemik enflamasyon modelinde yapılan çalışmalarda ise, CYP4A ve CYP4F aracılığı ile oluşan 20-HETE'nin enflamatuvar mediyatörlerden biri olarak rol oynadığı gösterilmiştir (56, 57). Öte yandan bulgularımızın tersine, Anwar-Mohamed ve ark. (56) Sprague-Dawley sıçanlara LPS (*E. coli* LPS, O127:B8, 1 mg/kg, i.p.) uygulanmasının ardından 6, 12 ve 24 saat sonra kardiyak CYP4A1 mRNA ekspresyonunun sırasıyla %400, %900 ve %6000 oranında arttığını göstermişlerdir. Benzer olarak, ancak daha az derecede sıçanların karaciğer ve böbreklerinde CYP4A1 mRNA düzeyleri LPS uygulanmasından yalnızca 24 saat sonra

sırasıyla %100 ve %200 oranında artmıştır. Ayrıca, LPS hepatik ve renal CYP4A3 mRNA düzeylerinde bir değişikliğe neden olmazken, kardiyak CYP4A3 mRNA düzeyleri LPS uygulanmasından 12 ve 24 saat sonra sırasıyla %100 ve %200 oranında artmıştır. Öte yandan, kardiyak CYP4F mRNA düzeylerinin LPS uygulanmasından 6 saat sonra artmasına ve yalnızca CYP4F4 dışındaki enzimlerin ekspresyonu 12 ve 24 saat sonra azalmasına karşın, kardiyak ve hepatik CYP4F1 ve CYP4F4 mRNA düzeylerinde zamana bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca, kardiyak CYP4F5 mRNA düzeyleri LPS uygulanmasından 6 saat sonra %150 ve 24 saat sonra %60 oranında azalırken, renal CYP4F5 mRNA düzeyleri LPS uygulanmasından 24 saat sonra %40 oranında azalmıştır. Aynı zamanda, endotoksemik sıçanların dokularında TNF- α ve IL-6 ekspresyonunda artış ile birlikte olan bu değişikliklere, kardiyak mikrozomlarda 20-HETE oluşumunda artış eşlik etmiştir. Bu araştırmacılar, ıveğen enflamasyonun kardiyak CYP aracılıklı AA metabolizmasının 20-HETE oluşumu yönünde olduğu sonucuna vararak, CYP ω -hidroksilaz inhibitörlerinin enflamasyon aracılıklı kalp hastalıklarına karşı korunmada yararlı olabileceklerini ileri sürmüşlerdir. Theken ve ark. (57) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, C57BL/6 farelere LPS (*E. coli* LPS, O111:B4, 1 mg/kg, i.p.) uygulanmasından 6 ve 24 saat sonra böbrek, karaciğer ve akciğerlerde, ancak kalpte değil, 20-HETE oluşumunun azaldığı bildirilmiştir. Bu araştırmacılar ise, farelerde doğal bağışıklık yanıtının ıveğen biçimde etkinleşmesinin CYP ekspresyonu ve eikozanoit metabolizmasını değiştirdiği sonucuna vararak, 20-HETE oluşumunu azaltma yaklaşımının renal enflamasyonun önlenmesi amacıyla doğru bir terapötik yaklaşım olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Öte yandan, endotoksemi sırasında CYP4A ekspresyon ve etkinliğinin azalması sonucunda oluşumu azalan 20-HETE gibi vazokonstriktör ürünlerin dayanıklı analoglarının sepsis ve septik şok tedavisinde yararlı olabileceğine ilişkin literatürde tarafımızdan yapılan çalışmalar dışında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Endotoksemik sıçanlarda *in vivo* olarak yaptığımız çalışmaların sonuçlarına göre, subletal dozda (10 mg/kg, i.p.) LPS (*E. coli* LPS O111:B4) enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel septik şok modelinde gelişen vasküler hiporeaktivite ve hipotansiyona böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterde çEH, MEK1, ERK1/2, IKK β , I κ B- α , NF- κ B, iNOS, çGS, PKG ve/veya COX-2 ekspresyon/etkinliği ile TNF- α ve IL-8 oluşumunda artmaya,

aynı zamanda CYP2C23, AA epoksijenazlar, CYP4A1/A3 ve eNOS ekspresyon/etkinliğinde azalma eşlik etmektedir (Şekil 2.15 ve Şekil 2.16). Ayrıca, oksidatif stresin göstegelerinden toplam antioksidan etkinlik, SOD etkinliği, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz etkinliği ile indirgenmiş glutatyon düzeyleri azalmaktadır. Dayanıklı bir 20-HETE analogu olan ve endojen olarak oluşan 20-HETE'nin etkilerini taklit ettiği bilinen 5,14-HEDGE (59, 60, 75-77, 80, 81, 83, 84) uygulanması sonucunda sıçanların renal ve/veya kardiyovasküler dokularında enflamatuvar sitokinlerden IL-8 ve TNF- α oluşumu ile birlikte artmış olan cEH , MEK1, ERK1/2, IKK β , I κ B- α , NF- κ B p65, iNOS, hsp90, cGS , PKG, COX-2, gp91^{phox}, p47^{phox} ve/veya nitrotirozin ekspresyon/etkinliği ile azalmış olan CYP2C23, AA epoksijenazlar ve CYP4A1 ekspresyon/etkinliği, oksidan/antioksidan durum, lipid peroksidasyonu ve enflamasyon ile ilgili değişiklikler normal düzeylere getirilebilmekte, ayrıca güçlü bir vazokonstriktör olan 20-HETE oluşumunun artması ile vasküler hiporeaktivite, hipotansiyon, takikardi ve enflamasyonu düzeltilebilmektedir. Ayrıca, 20-HETE'nin vazokonstriktör etkilerinin yarışmalı antagonisti olan 20-HEDE (30 mg/kg, s.k.; LPS'den 1 saat sonra) ise, 5,14-HEDGE'nin endotoksemik sıçanlarda OAB, kalp hızı (KH), fosforile vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein (*phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein*; VASP), COX-2, CYP4A1, p47^{phox}, gp91^{phox} ve 3-nitrotirozin protein ekspresyonu, iNOS-hsp90 kompleks oluşumu ve NOS etkinliği ile siklik GMP, 6-keto-PGF_{1 α} , PGE₂, PGF_{2 α} , 20-HETE ve 3-nitrotirozin düzeyleri üzerindeki etkisini geri çevirebilmektedir. Bunlara ek olarak, 5,14-HEDGE uygulanan farelerde LPS uygulanmasından 72 saat sonra yaşam süresi %84'ten %98'e çıkarılabilmektedir. Öte yandan, Anwar-Mohamed ve ark. (56) ile Theken ve ark. (57) tarafından yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile çelişkili olan kendi bulgularımız arasında LPS'ye verilen yanıt açısından görülen farklılıkların, hayvanların türü ve ırkı, uygulanan doz ve uygulama zamanı, LPS'nin türü ile enzim ekspresyon ve etkinliği için ölçüm zamanlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği ileri sürülebilir.



Şekil 2.15. Endotoksinin neden olduğu vasküler hiporeaktivite, hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve yaşam süresi üzerinde iNOS, çGS, PKG, COX-1, COX-2, CYP4A1 ve gp91^{phox}’un katkısı ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar (83). 20-HETE, 20-hydroxieicosatetraenoic acid; cGMP, cyclic guanosine 5′-monophosphate; COX, cyclooxygenase; CYP, cytochrome P450; çGS, çözünebilir guanilil siklaz; hsp90, heat shock protein; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; O₂⁻, superoxide; PGE, prostaglandin E; PGI₂, prostaglandin I₂; PKG, protein kinase G; p-VASP, phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein; sGC, soluble epoxide hydrolase.



Şekil 2.16. Endotoksinin neden olduğu hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve yaşam süresi üzerinde çEH, CYP2C23 ve MEK1/ERK1/2/IKKβ/IκB-α/NF-κB yolu ile enflamatuvar sitokin oluşumunun katkısı ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar (84). *CYP*, cytochrome P450; *çEH*, çözünebilir epoksid hidrolaz; *DHET*, dihydroxyeicosatrienoic acid; *EET*, epoxyeicosatrienoic acid; *ERK*, extracellular signal-regulated kinase; *I-κB*, *κB* inhibitor; *IKK*, *IκB* kinase; *IL*, interleukin; *MEK*, mitogen-activated protein kinase kinase; *NF-κB*, nuclear factor *κB*; *p-I-κB*, phosphorylated inhibitor of *κB*; *p-NF-κB*, phosphorylated nuclear factor *κB*; *sEH*, soluble epoxide hydrolase; *TNF*, tumor necrosis factor.

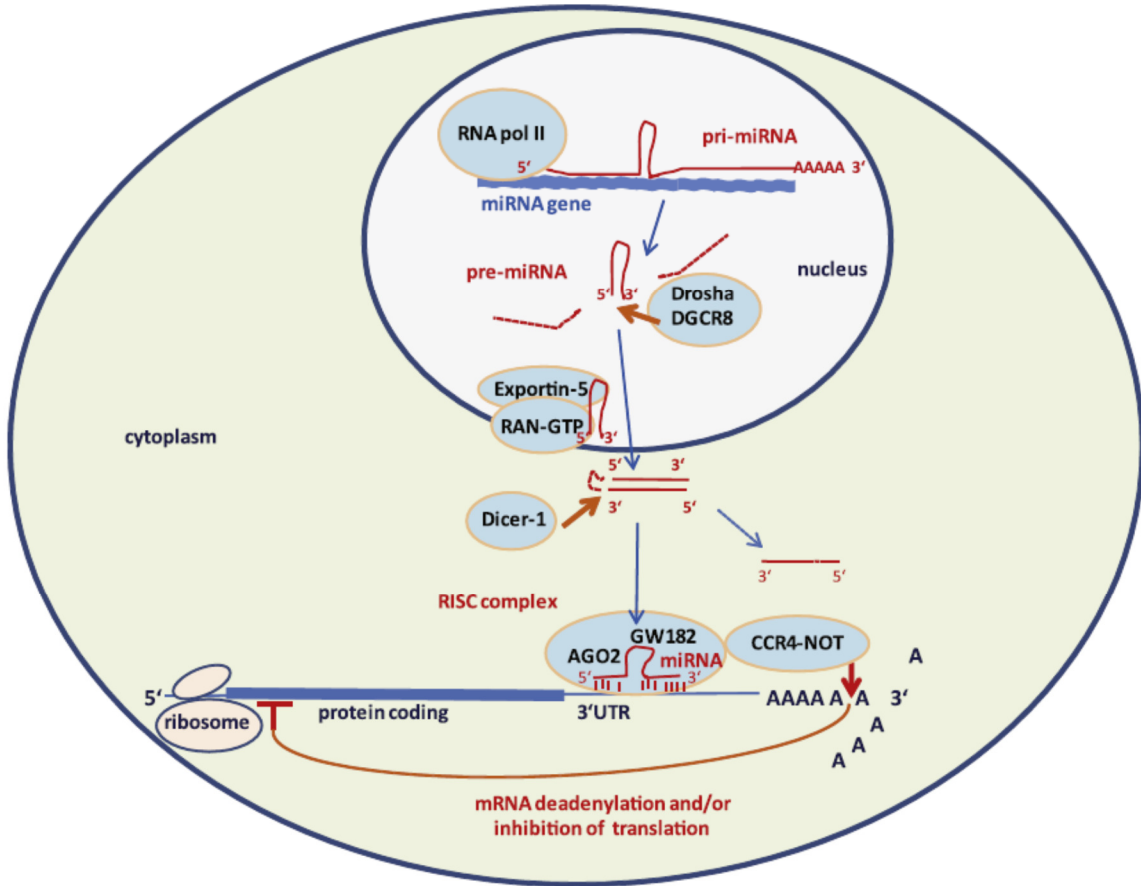
2.3. miRNA

2.3.1. Özellikleri

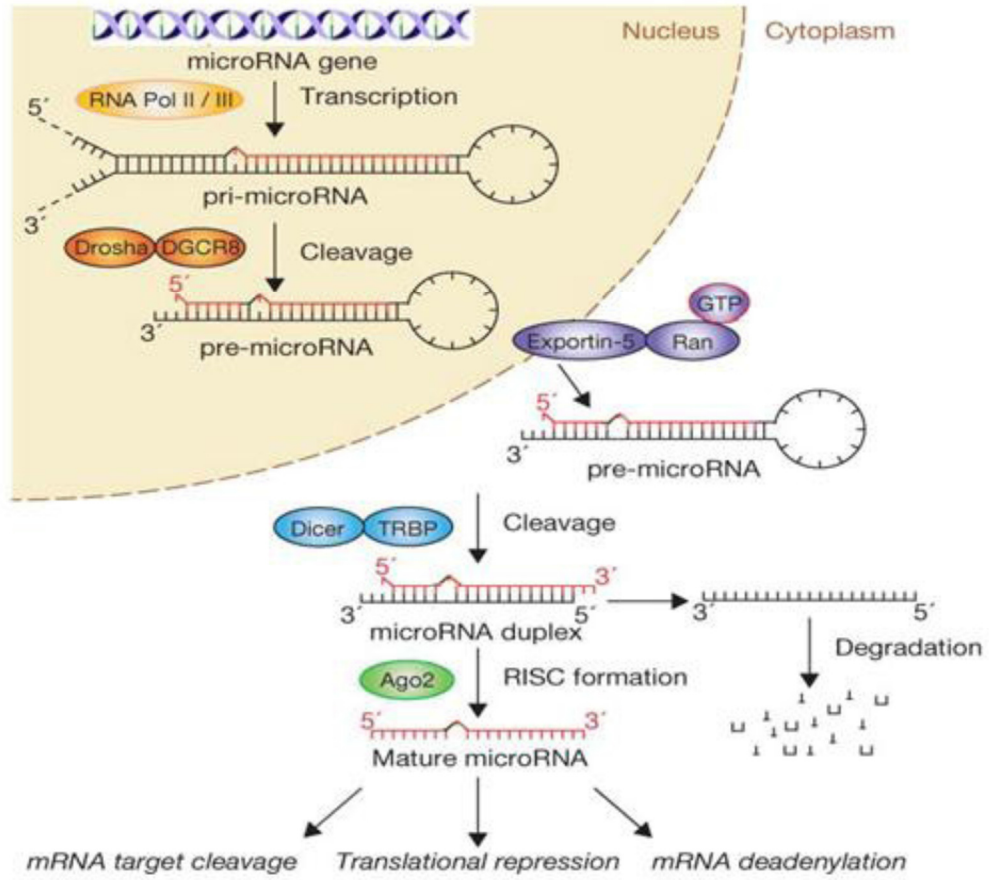
Bir bilgi kodlamayan miRNA'lar, mRNA'lar ile doğrudan etkileşmeleri sonucunda onların degradasyonuna neden olarak veya protein translasyonunu inhibe ederek protein kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen, ancak mRNA'lardan farklı olarak protein sentezine neden olmayan küçük RNA'lardır. miRNA'lar, DNA'dan transkripsiyonu yapılan, ancak proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanmaktadır. Günümüzde yaklaşık 20-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülleri olarak tanımlanan miRNA'lar, ilk kez 1993 yılında Victor Ambros ve ark. tarafından keşfedilmiştir (273). İlk keşfedilen miRNA, lin-14'ün translasyonunu ve böylece bir toprak solucanı olan *Caenorhabditis elegans*'ın larva gelişiminin zamanlamasını negatif olarak düzenleyen 22 ribonükleotit uzunluğunda "lin-4" adlı moleküldür (273). Lin-4, lin-14 mRNA'sının translasyonu yapılmamış 3' bölgesindeki (3'UTR'deki) tamamlayıcı sekanslarına bağlanması sonucunda lin-14'ün stabilitesini etkilemeksizin translasyonunu baskılayarak işlevini yerine getirmektedir (274). Daha sonra, Reinhart ve ark. (275) tarafından çok veya az ekspresyonunun erken gelişim veya hücre soylarının yinelenmesiyle sonuçlandığı benzer bir mekanizma let-7 ve *C. elegans*'ta let-7 tarafından düzenlenen lin-14, lin-28, lin-41, lin-42 ve daf-12 adlı bir dizi gen için tanımlanmıştır. İnsanlarda bütün hücre türlerinde bulunan miRNA'lar dokuya özgü olup, farklı hücrelerde değişik miRNA'lar eksprese edilmektedir. Günümüzde, insan genomunda yaklaşık 1.000 değişik türde miRNA'nın olduğu ve genlerin yaklaşık %30 kadarının ekspresyonunu etkilediği kestirilmektedir. Ayrıca, son zamanlarda insan genomunda 239 değişik miRNA ailesi olduğu ileri sürülmüştür (5, 7-9, 12-14, 18, 20, 24, 276).

miRNA genlerinin çoğunun intronik olmasına karşın, bazıları intergenik veya eksonik bölgelerde yerleşmiştir. miRNA'ların biyojenezi DNA metilazlar ile transkripsiyon faktörleri gibi pek çok mediyatörün kontrolü altındadır. Protein kodlayan mRNA'lara

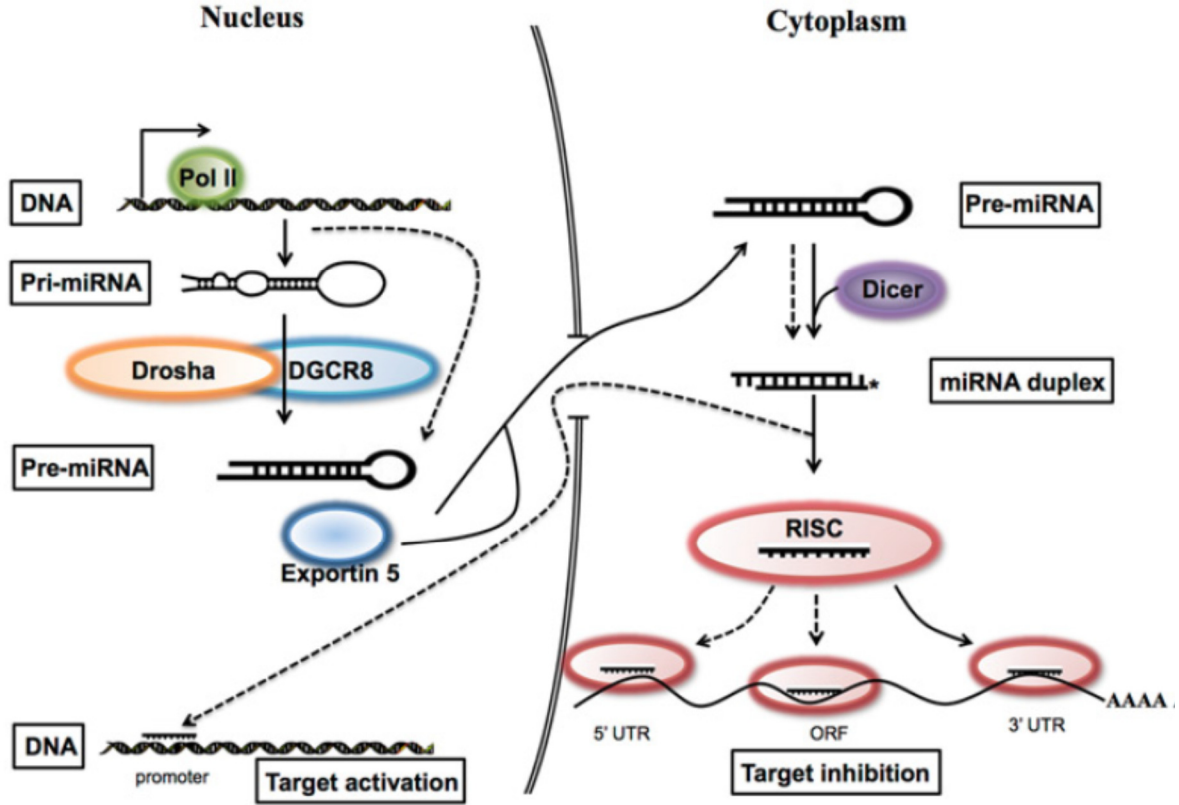
benzer olarak, miRNA'ların çoğu ilk önce nükleusta RNA polimeraz II tarafından "pri-miRNA'lar" olarak adlandırılan uzun transkriptlerin bir parçası olarak sentezlenmektedir (277-282) (Şekil 2.17, Şekil 2.18 ve Şekil 2.19). Pri-miRNA'lar polisistronik transkriptler gibi bağımsız *promoter*lar tarafından kodlanabilmekte veya protein kodlayan genlerin intronları içinde gömülü olarak bulunabilmektedir. Uzun pri-miRNA'lar bir RNAaz III türü endonükleaz olan *Drosha-DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8, *pasha*) kompleksi tarafından saç tokası biçimindeki "pre-miRNA'lar" adı verilen küçük prekürsörlerine ayrılırlar. Nükleusta oluşan bu pre-miRNA'lar, eksportin-5-Ran-guanozin 5'-trifosfat (*guanosine 5'-triphosphate*; GTP) kompleksi aracılığıyla nükleustan sitoplazmaya taşındıktan sonra orada "*Dicer*" adı verilen bir enzim aracılığıyla kısa RNA ikililerine dönüştürülürler. Bu ikililerin bir parçası dört argonat (AGO) proteinlerinden birini (sıklıkla AGO2) ve "*glycine-tryptophan 182-kDa protein* (GW182)" olarak da adlandırılan *trinucleotide repeat-containing 6 protein* (TNRC6) içeren ribonükleik asit ile indüklenen susturma kompleksine (*RNA-induced silencing complex*, RISC) aktarılır. RISC kompleksi içinde bulunan bu miRNA'lar en az 6-8 nükleotitli tamamlayıcı aracılığıyla kendi hedef mRNA'larına bağlanarak protein ekspresyonunun baskılanmasına (represyonuna) ve mRNA degradasyonunun indüklenmesine aracılık ederler. Öte yandan, miR-373 gibi bazı miRNA'ların *promoter* bölgelerine bağlanarak ve *promoter* bağlanmasını baskılayıcı ile yarışarak gen ekspresyonunu indükleyebildiği gösterilmiştir (283) (Şekil 2.18). RISC kompleksi içindeki anahtar protein GW182'nin, mRNA'nın translasyonu, deadenilasyonu ve degradasyonunun ardından, mRNA'nın translasyonunu inhibe eden ve deadenilasyonunu başlatan CCR4-NOT nükleaz kompleksinin toplanmasına aracılık ettiği bildirilmiştir (284, 285). AGO2 proteininin çift iplikli RNA'yı ayırma ve böylece RNA degradasyonunu başlatma yeteneği olsa da, miRNA ve mRNA arasında %100 tamamlayıcılık az olduğundan dolayı, RISC-miRNA kompleksi mRNA'ya bağlandığında katalitik etkinliği yeterli değildir. RISC yapısında bulunan substrat miRNA ise, hedef mRNA'nın 3'-translasyonu olmayan bölgesindeki belirli nükleotitler ile eşleşebilmektedir (278). Bazı durumlarda mRNA-miRNA ikilisini içeren RISC kompleksi, "P cisimciği (*P-body, processing body*)" adı verilen bir organel içerisinde daha sonra işlenmek üzere



Şekil 2.17. miRNA biyogenezi ve etki mekanizması ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar (18). *AGO*, argonaute; *DGCR8*, DiGeorge syndrome critical region gene 8; *DNA*, deoxyribonucleic acid; *GTP*, guanosine 5'-triphosphate; *GW182*, glycine-tryptophan 182-kDa protein; *miRNA*, microribonucleic acid; *mRNA*, messenger ribonucleic acid; *RISC*, ribonucleic acid-induced silencing complex; *RNA pol*, ribonucleic acid polymerase; *UTR*, untranslated region.



Şekil 2.18. miRNA biyogenezi ve etki mekanizması ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar (21). Ago, argonaute; DGCR8, DiGeorge syndrome critical region gene 8; GTP, guanosine 5'-triphosphate; miRNA, microribonucleic acid; messenger ribonucleic acid; RISC, ribonucleic acid-induced silencing complex; RNA Pol, ribonucleic acid polymerase.



Şekil 2.19. miRNA biyogenezisi ve etki mekanizması ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmalar (276). *DGCR8*, *DiGeorge syndrome critical region gene 8*; *DNA*, *deoxyribonucleic acid*; *GW182*, *glycine-tryptophan 182-kDa protein*; *miRNA*, *microribonucleic acid*; *ORF*, *open reading frame*; *Pol*, *ribonucleic acid polymerase*; *RISC*, *ribonucleic acid-induced silencing complex*; *UTR*, *untranslated region*.

saklanabilmektedir (286). P cisimciği, RNA ve RNA ile etkileşen enzimler ve proteinlerden zengindir; burada miRNA'ya bağlı mRNA parçalanabileceği gibi, bir süre bekletilip daha sonra sitoplazmaya bırakılarak yeniden translasyona girmesi de sağlanabilir. Ancak, miRNA'ların esas etki mekanizmasını translasyonun baskılanması oluşturur. Normal bir translasyon işlemi için öncelikle başlangıç faktörlerinin mRNA'ya bağlanmaları ve bu yolla mRNA'nın ribozoma yerleştirilmesi gerekir. RISC kompleksinin mRNA'nın 3' translasyonu olmayan bölgeye (3'-UTR'ye) yerleşerek miRNA-mRNA etkileşimini gerçekleştirmesi, başlangıç faktörlerinin mRNA'ya bağlanmasını bozarak translasyonunu baskılar. Bu temel mekanizmaya ek olarak, RISC kompleksi translasyonun başlamasından sonra da mRNA'ya

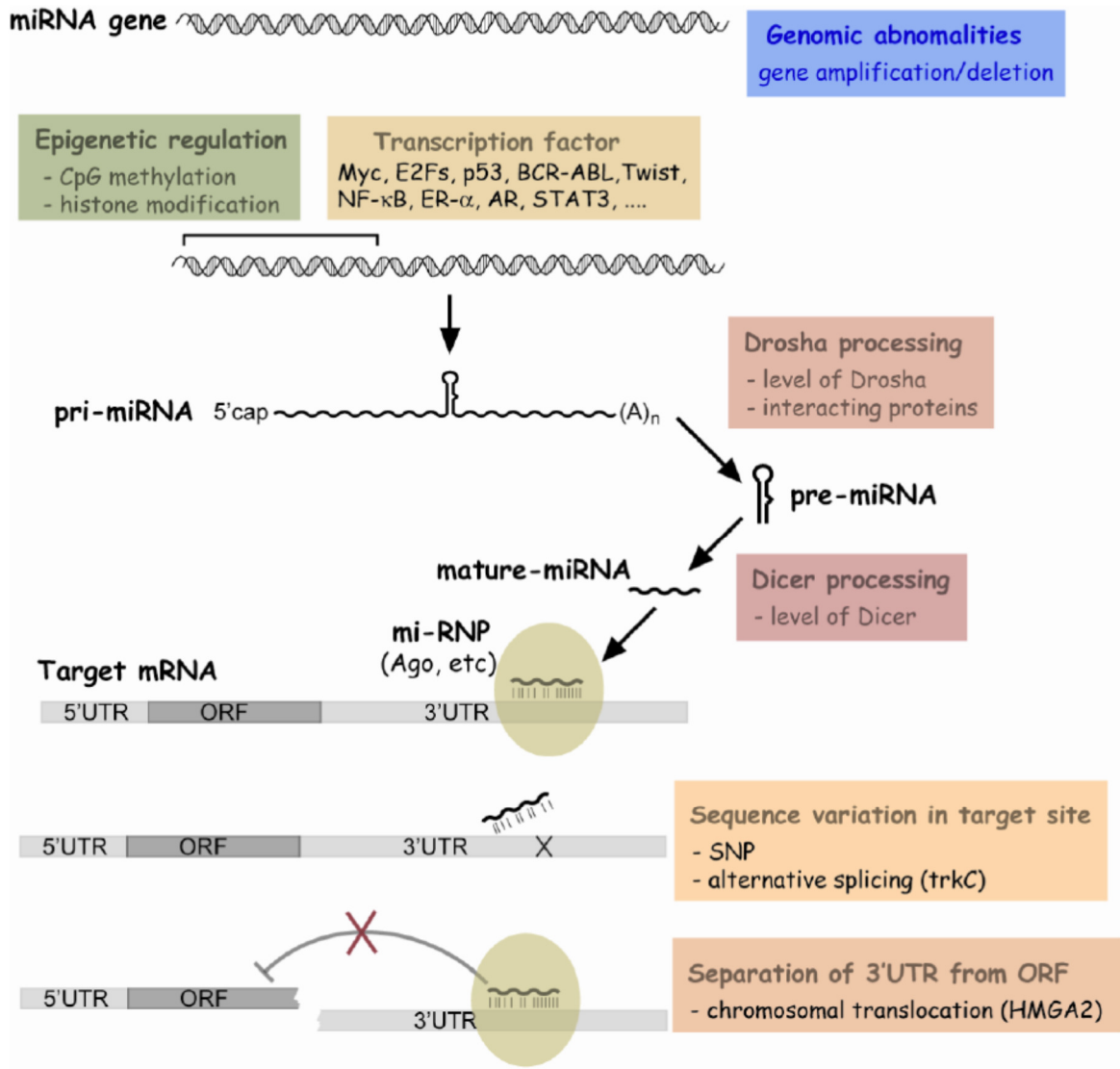
bağlanabilir ve bu durumda da ribozomların ayrılmasıyla translasyon erken sonlanır. RISC ile birlikte olan AGO'nun ayırıcı etkinliği, miRNA'ların hedefleriyle yüksek derecede tamamlayıcı olduğu ve RNA virüslerinin uzaklaştırılması amacıyla RNA susturulmasının geniş ölçüde kullanıldığı bitkilerde daha sık görülmektedir (287). Memeli hücrelerinde AGO2'nin ayırıcı etkinliği kendi mRNA'ları ile bütünüyle tamamlayıcı olan "*small interfering RNAs* (siRNAs)" adı verilen moleküller hücrelere uygulandığında ortaya çıkmaktadır (288). Bunlara ek olarak, miRNA biyogenezinde AGO2'nin katalitik etkinliğinin gerekli olduğu *Dicer*'dan bağımsız bir yol olduğu da bildirilmiştir (289, 290). Protein kodlayan mRNA'lara benzer olarak miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin kontrolü transkripsiyonunun, işlenmesinin (*processing*) ve işlevlerinin düzenlenmesi, RNA edisyonu ve nükleustan dışarı çıkma sırasında kontrollü degradasyon aracılığıyla olduğu kadar, epigenetik düzeyde de yapılmaktadır (5, 7, 9, 10, 12, 18, 20-22, 24, 174, 276, 291-293).

2.3.2. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

Hücre çoğalması, farklılaşması, migrasyonu ve invazyonu, apoptoz, anjiyogenez, metastaz, metabolizma ve immün yanıt gibi çeşitli biyolojik işlevlerin düzenlenmesine katkıda bulunan miRNA'ların, ayrıca kanser, karaciğer, kalp ve böbrek hastalıkları, SIRS, sepsis, enflamasyon, bakteriyel enfeksiyonlar, psöriyaz, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Tourette sendromu, şizofreni ve diyabet gibi pek çok hastalığın başlaması ve ilerlemesinde önemli rolü bulunmaktadır. Son yıllarda, özellikle dolaşımda bulunan miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin çeşitli hastalıklarda tanı amacı ile kullanılabileceğine ilişkin çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (4, 6-12, 15-19, 21-24).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın etiyopatogenezinde miRNA'lar ile ilgili işlev bozukluklarının yer aldığı gösterilmiştir. İşlev bozukluğunun oluşmasında çeşitli mekanizmalar söz konusudur (Şekil 2.20). Bunlar içindeki en önemli mekanizma miRNA'nın ekspresyon düzeyinde oluşturduğu değişikliklerdir. Genetik etkenlerden kaynaklanan ekspresyon değişikliklerine delesyonlar,

amplifikasyonlar veya translokasyonlar gibi büyük ölçekli genom değişiklikleri neden olmaktadır. miRNA kodlayan dizideki delesyonlar söz konusu miRNA'nın miktarını ileri derecede azaltırken, hedefi olan mRNA'nın ve ondan kodlanan proteinin artmasına neden olur. Amplifikasyonlar ise miRNA miktarını artırırken, hedef mRNA'nın etkinliğini ve bundan kodlanan proteini azaltır. Translokasyonların etkisi ise, yer değiştiren DNA parçasının yerleşme yerine göre artırıcı veya azaltıcı yönde olabilir. Büyük ölçekli genom değişikliklerine ek olarak, nokta mutasyonları da miRNA işlevini bozabilir. miRNA'yı ya da hedefi olan mRNA'yı kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarına bağlı olarak oluşan dizi değişiklikleri, miRNA-mRNA etkileşimini bozarak artırıcı veya azaltıcı yönde etki yapabilir. Bunlar dışında, miRNA'nın ekspresyon düzeyini epigenetik değişiklikler ve miRNA'nın kodlandığı genin promotor etkinliğindeki değişiklikler etkileyebilir. Epigenetik değişiklikler kromatin yapısını ve dolayısıyla transkripsiyon için gerekli proteinlerin DNA ile etkileşimini değiştirmektedir. miRNA'nın kodlandığı gen bölgesinde DNA'nın metillenmesi ve buna bağlı olarak kromatinin kapanması transkripsiyonu engellemekte ve miRNA sentezini bozmaktadır. Sonuç olarak, miRNA miktarı azalırken, hedefi olan mRNA ve ondan kodlanan protein artmaktadır. Transkripsiyonun başlamasına öncülük eden, RNA polimerazın bağlanabileceği bir DNA dizisi olan promotor etkinliği ise ya promotor dizisindeki ya da bu promotora bağlanan transkripsiyon faktörlerindeki değişikliklerden dolayı değişebilir. Bu olaylar her iki yönde yani promotor etkinliği artırıcı veya azaltıcı (dolayısıyla miRNA miktarını artırıcı veya azaltıcı) biçimde sonuçlanabilir. miRNA'nın işlenmesinden sorumlu enzimlerle ilgili bir sorun olması durumunda da olgun miRNA oluşamayacağından dolayı miRNA düzeyi azalır. Bazı seyrek durumlarda enzimler normal olmasına karşın, pri-miRNA dizisindeki bir değişiklik nedeniyle işlenme gerçekleşmeyebilir. miRNA kodlayan diziler, DNA zincirinin yapısal olarak daha savunmasız olduğu ve buna bağlı olarak delesyon, amplifikasyon ve virüs insersiyonu gibi olayların daha sık görüldüğü bölgeler olan kırılgen genom bölgelerinde, normal genom bölgelerine göre daha yüksek oranda bulunmaktadır. Dolayısıyla, miRNA kodlayan genlerin bu bölgelerde öbür bölgelere göre daha fazla bulunmaları onları işlev bozukluğuna yatkın duruma getirmektedir (7, 10-12, 15-18, 23, 293).



Şekil 2.20. miRNA ekspresyonu veya işlevinin deregülasyonu için ileri sürülen mekanizmalar (12). Ago, argonaute; BCR, B-cell receptor; ER; estrogen receptor; HMGA2, high-mobility group AT-hook 2; miRNA, microribonucleic acid; mRNA, messenger ribonucleic acid; miRNP, microribonucleic acid particle; NF-κB, nuclear factor κB; ORF, open reading frame; SNP, single nucleotide polymorphism; STAT, signal transducer and activator of transcription; trkc, tropomyosin-related kinase C; UTR, untranslated region.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanı

Deneyleerde 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyodunda senkronize edilen 200-300 g ağırlığında 24 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından sağlanmıştır. Bu tezde sıçanlar üzerinde yapılan tüm işlemler için Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır (Kurulun 18/05/2012 tarihli ve 15 sayılı kararı).

3.1.2. Sarf Malzemesi

β -Aktin proteini için primer antikor (*monoclonal anti- β -actin*) (A1978, Sigma)

β -Gliserofosfat (G9891, Sigma)

β -Merkaptoetanol (A1108, AppliChem)

α -Sarkomerik aktin proteini için primer antikor (*monoclonal anti- α -sarcomeric actin*) (A2172, Sigma)

5,14-HEDGE (Department of Biochemistry University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, Amerika)

96 kuyucuklu optik tepkime plağı (*MicroAmp® optical 96-well reaction plate*) (N8010560, Applied Biosciences)

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

Aktin proteini için primer antikor (*anti-actin antibody [2Q1055]*) (ab14128, Abcam)

Amonyum persülfat (A2941, AppliChem)
Aprotinin (A2132, AppliChem)
Asetik asit (64-197, Climax)
Askorbik asit (1.00127, Merck)
Ayrıcı cam (*spacer plate*) (10.1 x 8.2 cm, 1.5 mm) (165-3312, Bio-Rad)
Benzamidin (B6506, Sigma)
Bradford rejanı (B6916, Sigma)
Bromfenol mavisi (A3640, AppliChem)
Coomassie *brilliant blue* R 250 (1.12553, Merck)
Disodyum hidrojen fosfat, 12 sulu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (1.06566, Merck)
Ditiyotreytol (*dithiothreitol*; DTT) (A2948, AppliChem)
DNA saklama kutusu (81 gözlü) (3122278, Greiner)
Düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plağı (655160, Greiner)
Etilendiamintetraasetik asit (*ethylenediaminetetraacetic acid*; EDTA) (A2937, AppliChem)
Etanol (%96) (3221, Riedel-de Haen)
Filtre kağıdı (*Whatman grade no 3MM chr chromatography paper, cellulose*) (3030-917, Whatman)
Fosforile I κ B- α proteini için primer antikor (*p-I κ B- α (Ser32) goat IgG*) (SC-7977, Santa Cruz)
Fosforile NF- κ B p65 proteini için primer antikor (*p-NF- κ B p65 (Ser536) mouse monoclonal IgG*) (SC-33020, Santa Cruz)
Fosforile TAK1 proteini için primer antikor (*phospho-TAK1 [Ser412] antibody*) (9339, Cell Signalling)
Gliserol (A2926, AppliChem)
Glisin (A1067, AppliChem)
Hidroklorik asit (*hydrochloric acid*; HCl) (100314, Merck)
HEPES (A3724, AppliChem)
I κ B- α proteini için primer antikor (*I κ B- α mouse monoclonal IgG*) (SC-1643, Santa Cruz)
İzobütanol (A1150, AppliChem)
Potasyum klorür (*potassium chloride*; KCl) (1.04936, Merck)

Potasyum dihidrojen fosfat (*potassium dihydrogen phosphate*; KH_2PO_4) (1.04873, Merck)

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

Kloroform (1.02431, Merck)

Kriyopreservasyon tüpü (*cryo's sterile*, 1 ml, 12, 5/38 mm, *Skirt*) (3123278, Greiner)

Kriyopreservasyon tüpü (*cryo's sterile*, 2 ml, 12, 5/38 mm, *Skirt*) (3122278, Greiner)

Kültür plağı (*microplate*) (655160, Greiner)

Kültür plağı için yapışkanlı kapak (676001, Greiner)

Löpeptin (L9783, Sigma)

LPS (*Escherichia coli* lipopolisakaridi, O111:B4) (LPS) (L4130, Sigma)

Metanol (1.06008, Merck)

Mikrosantrifüj tüpü (*microcentrifuge tube*) (1.5 ml) (616201, Greiner)

miRNeasy Serum/Plasma Kit (217184, Qiagen)

miRNeasy Serum/Plasma Spike-in Control (219610, Qiagen)

miScript II RT Kit (218161, Qiagen)

miScript PCR control set (218380, Qiagen)

miScript primer assay (218300, Qiagen)

miScript SYBR Green PCR Kit (218073, Qiagen)

Molekül ağırlığı belirteci (*rainbow marker, full-range*) (RPN 800E, Amersham)

Molekül ağırlığı belirteci (*kaleidoscope prestained standard*) (161-0324, Biorad)

MyD88 proteini için primer antikor (*MyD88 [F-19]*) (sc-8197, Santa Cruz)

Sodyum klorür (*sodium chloride*; NaCl) (1.06404, Merck)

Sodyum bikarbonat (*sodium bicarbonate*; NaHCO_3) (1.02405, Merck)

NF- κ B p65 proteini için primer antikor (*NF- κ B p65 mouse monoclonal IgG*) (SC-8008, Santa Cruz)

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (*N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*; TEMED) (A1148, AppliChem, Almanya)

Nitroselüloz membran (*nitrocellulose membrane*) (162-0112, Bio-Rad)

Nükleer ekstraksiyon kiti (*nuclear extraction kit*) (10009277, Cayman)

Polymerase chain reaction (PCR) tüpü (*PCR reaction tube*) (0.2 ml) (683201, Greiner)

PCR tüpü (*thin-walled, DNase-free, RNase-free PCR tube*) (0.2 ml) (671201, Greiner)

Pipet ucu (3685290, Greiner)

Pipet ucu (3686290, Greiner)

Pipet ucu (685290, Greiner)

Pipet ucu (686290, Greiner)

Pipet ucu (770291, Greiner)

Polistiren tüp (15 ml) (188271, Greiner)

Polistiren tüp (50 ml) (227261, Greiner)

Ponceau S (A1405, AppliChem)

Primer antikorlara özgü sekonder antikor (*goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4301)

Primer antikorlara özgü sekonder antikor (*sheep anti-mouse IgG-horseradish Peroxidase*) (RPN4201)

Proteinleri görüntüleme çözültüsü (*ECL Plus Western Blotting Detection Reagent*) (RPN2133, Amersham, İngiltere)

Proteinleri görüntüleme çözültüsü (*ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*) (RPN2232, Amersham, İngiltere)

Sodyum dodesil fosfat (*sodium dodecyl sulfate; SDS*) (A2263, AppliChem)

Serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter)

Sodyum ortovanadat (A2196, AppliChem)

Sodyum pirofosfat (A2197, AppliChem)

Sığır serum albümini (*bovine serum albumin; SSA*) (A7906, Sigma)

Sülfosalisilik asit (A0416, AppliChem)

TAK1 proteini için primer antikor (*TAK1 [D94D7] rabbit mAb*) (5206, Cell Signalling)

Trikloroasetik asit (A1431, AppliChem)

Tris baz (A2264, AppliChem)

Tris HCl (A3452, AppliChem)

Tween 20 (A4974, AppliChem)

Yağsız kurutulmuş süt tozu (*non-fat dry milk*) (YKST) (A0830, AppliChem, Almanya)

3.1.3. Teçhizat

- Çalkalayıcı (*red rotor orbital shaker*) (PR500-176, Hofer)
- Derin dondurucu (dik tip, 410 L, -80°C) (Model U410, New Brunswick)
- Derin donduruculu buzdolabı (Model 1060 T, Arçelik)
- Derin donduruculu buzdolabı (Model 4240 T FH, Arçelik)
- Elektroforez sistemi (*mini-protean tetra 1 mm*) (165-8001, Biorad)
- Elektroforez sistemi (*wide mini sub cell, 15x10*), (170-4469, Biorad)
- Güç desteği (*power supply*) (*EV 265 consort power supply, 230 VAC*) (PS265-230V, Hofer)
- Güç kaynağı (1 KVA)
- Güç kaynağı (3 KVA)
- Hassas terazi (Model APX 200, Denver)
- Homojenizatör (Ultra-Turrax, T25, Ika)
- Jel dökümentasyon ve analiz sistemi (*EC3-CHEMI HR Imaging System*) (Ultra-Violet Products, UVP)
- Kan basıncı kayıt sistemi ve ısıtıcılı bölme (*Indirect Blood Pressure Recorder System*, Model BPHR 9610, Commat İletişim Ltd.)
- Manyetik karıştırıcı (BOE 8056500 *magnetic stirrer*) (MMS-3000, ACAAdapter 220V, Boeco)
- pH metre (*Orion 3 Star*, Thermo, Amerika)
- Plak okuma aygıtı (405, 450, 490, 550 ve 630 nm olmak üzere beş adet filtrelili) (ELX800, Biotek)
- Soğutmalı santrifüj (Model Mikro 22R, Hettich)
- Ultrasonik banyo (ısıtmalı, frekans ayarlı) (Elmasonic S 40 / (H), Elma)
- Üstten kefeli terazi (Model SPB 52, Scaltec)
- ViiA 7 Real-Time PCR System* (Model 4453536, Applied Biosystems)
- Yarı-kuru transfer birimi (*TE 77X semi-dry transfer unit*) (TE77X, Hofer)

3.2. Yöntem

3.2.1. *In Vivo* Çalışmalar

Endotoksik şok modeli daha önce tarafımızdan kullandığımız yöntemle oluşturularak (70), aşağıda belirtilen gruplara ayrılan sıçanlarda *in vivo* çalışmalar yapılmıştır:

Grup 1: Serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) (n= 6)

Grup 2: LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik şok grubu) (n= 6)

Grup 3: 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) (n= 6)

Grup 4: LPS + 5,14-HEDGE (n= 6)

OAB ve KH'nin kaydı için, sıçanların kuyruğundan ölçüm yapılmasına olanak veren kan basıncı kayıt sistemi kullanılmıştır. Sodyum fosfat tamponu (100 mM, pH 9) içinde çözülerek hazırlanan 5,14-HEDGE, sıçanlara serum fizyolojik veya serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlanan LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır (59, 75, 83, 84). Serum fizyolojik veya LPS enjeksiyonundan önce ve 4 saat sonra OAB kaydı alınmıştır. Deneyle sonunda, sıçanların başı sert bir zemine hızla vurularak sersemletildikten sonra hızla boynundan kanatılarak ötenazi yapılmasının ardından kan, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterleri alınmıştır. Alınan kandan hazırlanan serum örnekleri miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerinin ölçülmesine dek -80°C'de dondurularak saklanmıştır. İzole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerden hemen sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanarak toplam protein düzeyleri, sitozolik MyD88, TAK1, fosforile TAK1, IκB-α ve fosforile IκB-α, sitozolik/nükleer NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, aktin, α-sarkomerik aktin ve β-aktin protein ekspresyonlarının ölçülmesi amacı ile -80°C'de saklanmıştır. Serum ve doku örneklerinde ölçülen parametreler Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Serum, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arter örneklerinde ölçülen parametreler.

Ölçülen Parametre	Serum	Böbrek	Kalp	Torasik Aort	Süperiyör Mezenterik Arter
miRNA ekspresyon düzeyi					
miR-150	+	---	---	---	---
miR-223	+	---	---	---	---
miR-297	+	---	---	---	---
Protein ekspresyonu					
Sitozolik MyD88	---	+	+	+	+
Sitozolik TAK1	---	+	+	+	+
Sitozolik fosforile TAK1	---	+	+	+	+
Sitozolik IκB-α	---	+	+	+	+
Sitozolik fosforile IκB-α	---	+	+	+	+
Sitozolik NF-κB p65	---	+	+	+	+
Sitozolik fosforile NF-κB p65	---	+	+	+	+
Nükleer NF-κB p65	---	+	+	+	+
Nükleer fosforile NF-κB p65	---	+	+	+	+
Aktin	---	+	---	---	---
α-Sarkomerik aktin	---	---	+	---	---
β-Aktin	---	---	---	+	+

(+), Ölçüm yapıldı; (-), ölçüm yapılmadı. IκB, κB inhibitörü; miR, mikroRNA; MyD, miyeloid farklılaşma faktörü; NF-κB, nükleer faktör κB; TAK, transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz.

3.2.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması ve miR-150, miR-223 ve miR-297 Ekspresyon Düzeylerinin Ölçülmesi

Kanlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra cam bir baget ile defibrinize edilip, 23.910 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Ayrılan serum örnekleri kullanılmaya kadar -80°C'de dondurularak saklanmıştır. Serum miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri *miRNeasy Serum/Plasma Kit*, *miScript II RT Kit* ve *miScript SYBR Green PCR Kit* adlı kitlerin prospektüslerinde yazıldığı biçimde hazırlanan örneklerde ViiA 7 Real-Time PCR System kullanılarak ölçülmüştür.

Serumdan miRNA içeren toplam RNA *miRNeasy Serum/Plasma Kit* adlı kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Kısaca, *miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control* üzerine 300 µl *RNase-free water* eklenerek 2×10^{10} *copies/µl* stok çözelti, 16 µl *RNase-free water* üzerine stok çözülden (2×10^{10} *copies/µl*) 4 µl eklenerek 4×10^9 *copies/µl*, 48 µl

RNase-free water üzerine 4×10^9 *copies/μl* çözeltisinden 2 μ l eklenerek 1.6×10^8 *copies/μl* ve 78 μ l *RNase-free water* üzerine 4×10^9 *copies/μl* çözeltisinden 2 μ l eklenerek 1×10^8 *copies/μl* değişik miktarlarda kopya içeren *miRNeasy serum/plasma spike-in control working solution* çözeltileri hazırlanmıştır. Dondurulmuş serumlar 37°C'de tümüyle çözünene dek bekletilmiş, mikrosantrifüj tüplerinde 200 μ l serum üzerine 1 ml *QIAzol lysis reagent* eklenip, karıştırılmıştır. Lizatlar 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek, üzerlerine 3.5 μ l *miRNeasy serum/plasma spike-in control* (1.6×10^8 *copies/μl*) *working solution* eklenip, karıştırıldıktan sonra üzerlerine 200 μ l kloroform eklenip, 15 saniye vorteks ile karıştırılmıştır. Lizatlar 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş, 4°C'de 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilerek oda sıcaklığına gelinceye dek bekletilmiştir. En üstteki renksiz sulu fazlardan (RNA içeren faz) 600 μ l alınıp mikrosantrifüj tüplerine konularak, üzerlerine 900 μ l etanol (%96) eklenmiş, tüpler aşağı yukarı sallanarak yavaşça karıştırılmıştır. Alınan 700 μ l örnek toplama tüpleri (2 ml) içindeki *RNeasy MinElute spin column* içine konulup, kolonların kapakları kapatılarak tüpler 15°C'de 12.000 x g'de 15 saniye santrifüj edilmiş, tüplerde toplanan sıvı atılarak, kalan örneklerin tümü alınıp, toplama tüpleri içindeki *RNeasy MinElute spin column* içine konulmuş, tüpler 15°C'de 12.000 x g'de 15 saniye santrifüj edilmiş ve tüplerde toplanan sıvı atılmıştır. *RNeasy MinElute spin column* içine 700 μ l *RWT working solution* (kit içerisindeki RWT şişesine 30 ml etanol [%96] eklenerek hazırlanmıştır) konulduktan sonra, kolonların kapakları kapatılarak tüpler 15°C'de 12.000 x g'de 15 saniye santrifüj edilmiş, tüplerde toplanan sıvı atılmış, *RNeasy MinElute spin column* içine 500 μ l *RPE working solution* (kit içerisindeki RPE şişesine 44 ml etanol [%96] eklenerek hazırlanmıştır) konularak, kolonların kapakları kapatılmış, tüpler 15°C'de 12.000 x g'de 15 saniye santrifüj edilmiş ve tüplerde toplanan sıvı atılmıştır. *RNeasy MinElute spin column* içine 500 μ l etanol (%80) konulmuş, kolonların kapakları kapatılmış, tüpler 15°C'de 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiş, *RNeasy MinElute spin column* dikkatlice çıkarılmış ve toplama tüpleri içindeki sıvı ile birlikte atılmıştır. *RNeasy MinElute spin column* yeni toplama tüpleri (2 ml) içine konularak, tüplerin içindeki kolonlar ağzı açık olarak aralarında bir boşluk bırakılıp santrifüje yerleştirildikten sonra 15°C'de 23.910 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiş, kolonlar dikkatlice çıkarılmış ve toplama tüpleri içindeki sıvı ile birlikte atılmıştır. Kolonların kapakları kesildikten sonra kriyoprezervatif tüpler (1 ml) içine konulmuş,

kolonların tam ortasına 14 µl *RNase-free water* eklenerek kapakları kapatılmış ve 15°C'de 10.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından, kolonlar atılmış ve kriyoprezervatif tüplerde yaklaşık 12 µl RNA elüatı (*template RNA*) elde edilmiştir. Elüatlar *quantitative real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

Serum miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri *miScript II RT Kit* ve *miScript SYBR Green PCR Kit* adlı kitler kullanılarak qRT-PCR yöntemi ile ölçülmüştür. Kısaca, serumdan elde edilen her bir RNA örneği için 0.5 ml'lik tüpler kullanılarak *reverse transcription master mix* (RTMM) çözeltisi (4 µl 5x *miScript HiFlex buffer*, 2 µl 10x *miScript nucleics mix*, 7 µl *RNase-free water*, 2 µl *miScript reverse transcriptase mix* ve 5 µl *template RNA*; toplam 20 µl) hazırlanmıştır. Ayrıca, *miRNAeasy serum/plasma spike-in control* standart eğrisi için *reverse transcription reaction* (RTR) çözeltisi (2.2 µl [2.2x10⁸ copies/µl] *miRNeasy serum/plasma spike-in control* [1x10⁸ copies/µl], 2 µl (100 ng) *total RNA sample*, 4 µl 5x *miScript HiFlex buffer*, 2 µl 10x *miScript nucleics mix*, 7.8 µl *RNase-free water* ve 2 µl *miScript reverse transcriptase mix*; toplam 20 µl) hazırlanmıştır. *Total RNA sample*, 1 µl 1.2kb *kanamycin positive control RNA* (0.5 µg/µl) üzerine 9 µl *RNase-free water* eklenerek hazırlanmıştır. RTMM ve RTR tüpleri yavaşça karıştırılmış, 1.000 x g'de 4°C'de santrifüj edildikten sonra buzda bekletilmiştir. Daha sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilen RTMM ve RTR tüpleri, *miScript reverse transcriptase mix*'i etkisizleştirmek için 95°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra buzda bekletilmiştir. RTMM ve RTR tüpleri üzerine 200 µl *RNase-free water* eklenerek *miRNeasy serum/plasma spike-in control* derişimi 1x10⁶ copies/µl olacak biçimde sırasıyla *template* Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit (*complementray deoxyribonucleic acid*; cDNA) ve *template cDNA* dilüsyonları elde edilmiştir. *miRNAeasy serum/plasma spike-in control* standart eğrisi için, Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi, 0.2 ml'lik tüpler kullanılarak *template cDNA dilüsyonları* hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. *miRNAeasy serum/plasma spike-in control* standart eğrisi için cDNA dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan cDNA/çözelti miktarları.

Tüp	cDNA	<i>RNase-Free Water</i>	<i>Concentration Spike-In Control</i>	PCR'da Kullanılan Hacim
1	20 µl dilüe cDNA	20 µl	5×10^3 copies/µl	2 µl (1×10^6 copies/µl)
2	Tüp 1'den 5 µl	45 µl	5×10^4 copies/µl	2 µl (1×10^5 copies/µl)
3	Tüp 2'den 5 µl	45 µl	5×10^3 copies/µl	2 µl (1×10^4 copies/µl)
4	Tüp 3'ten 5 µl	45 µl	5×10^2 copies/µl	2 µl (1×10^3 copies/µl)

cDNA, tamamlayıcı deoksiribonükleik asit; PCR, *polymerase chain reaction*.

miR-150, miR-223 veya endojen kontrol olarak Hs_RNU6B_2 (*small nuclear ribonucleic acid*; snRNA) kullanılmıştır. *miScript primer assays* ile *Ce_miR-39_1 miScript primer assay*, miR-150, miR-223, miR-297, Hs_RNU6B_2 ve *Ce_miR-39_1 miScript primer assay* içeren viyallerin 1 dakika santrifüj edilmesinin ardından, viyallerin içine 550 µl Tris/EDTA (TE) çözeltisi (pH 8; 1 ml Tris/HCl [1 M, pH 8, otoklavlanmış], 0.2 ml EDTA [0.5 M, pH 8, otoklavlanmış], 98.8 ml distile su) ve 4-6 kez vorteks ile karıştırılarak hazırlanmıştır. qRT-PCR için özel tasarlanmış olan 96 çukurlu plağın (*MicroAmp® optical 96-well reaction plate*) örnekler için ayrılan her bir çukura toplam hacim 25 µl olacak biçimde 12.5 µl 2x *QuantiTect® SYBR green PCR master mix*, 2.5 µl 10x *miScript universal primer*, 2.5 µl 10x *miScript primer assay* (miR-150, miR-223 veya Hs_RNU6B_2), 5.5 µl *RNase-free water* ve 2 µl *template cDNA* eklenmiştir. miR-297 ile yapılan çalışmalarda ise, örnekler için ayrılan her bir çukura toplam hacim 25 µl olacak biçimde 12.5 µl 2x *QuantiTect® SYBR green PCR master mix*, 2.5 µl 10x *miScript universal primer*, 4 µl 10x *miScript primer assay* (miR-297), 4 µl *RNase-free water* ve 2 µl *template cDNA* eklenmiştir. *miRNAeasy serum/plasma spike-in control* standart eğrisi için ayrılan her bir çukura toplam hacim 25 µl olacak biçimde 12.5 µl 2x *QuantiTect® SYBR green PCR master mix*, 2.5 µl 10x *miScript universal primer*, 2.5 µl 10x *Ce_miR-39_1 miScript primer assay*, 5.5 µl *RNase-free water* ve 2 µl *template cDNA* dilüsyonu eklenmiştir. Negatif kontrol için ayrılan her bir çukura ise toplam hacim 25 µl olacak biçimde 12.5 µl 2x *QuantiTect® SYBR green PCR master mix*, 2.5 µl 10x *miScript universal primer* ve 10 µl *RNase-free water* eklenmiştir. Plaklar Çizelge 3.3'te belirtilen koşullarda qRT-PCR'de inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.3. miR-150, miR-223, miR-297 ve Hs_RNU6B_2 ekspresyon düzeylerinin ölçülmesinde kullanılan qRT-PCR koşulları.

Aşama	Süre	Sıcaklık
Etkinleşme (<i>HotStarTaq DNA</i> polimerazın etkinleştirilmesi)	15 dakika	95°C
45 döngü		
Denatürasyon (<i>denaturation</i>)	15 saniye	94°C
Bağlanma (<i>annealing</i>)	30 saniye	55°C
Uzama (<i>extension</i>)	30 saniye	70°C

DNA, deoksiribonükleik asit; miR, mikroribonükleik asit; qRT-PCR, *quantitative real time polymerase chain reaction*.

miRNA düzeyleri karşılaştırmalı eşik döngü (*comparative threshold cycle*; CT) yöntemi kullanılarak hesaplanmış, sonuçlar endojen kontrol olarak kullanılan Hs_RNU6B_2 değerlerine normalize edilerek gösterilmiştir.

3.2.3. Doku Örneklerinde Toplam Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Doku örneklerinde toplam protein düzeyi Coomassie mavisı yöntemi ile ölçülmüştür (70, 294). Kısaca, standart olarak kullanılan SSA'nın %1 (ağırlık/hacim) biçiminde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, 0-50 µl SSA içeren dizi dilüsyonları (0-50 µg/ml) hazırlanmış ve toplam hacimleri distile su ile 800 µl'ye ayarlanmıştır. Aynı biçimde, 5 µl süpernatant üzerine 795 µl distile su eklenerek 800 µl hacimde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler üzerine 200 µl Bradford reajanı eklenmiş, bu çözeltilerden alınan 100 µl örnek (aynı örnekten 2 kez olmak üzere) kültür plağına aktarılmış ve örneklerin verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda, 630 nm'de okunmuştur. SSA derişimlerine karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, SSA'nın kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden protein düzeyleri bulunmuştur.

3.2.4. Doku Örneklerinde Sitozolik MyD88, TAK1, Fosforile TAK1, IκBα ve Fosforile IκBα ile Sitozolik/Nükleer NF-κB p65, Fosforile NF-κB p65 ve Aktin Protein Düzeylerinin Ölçülmesi

Doku örneklerinde sitozolik ve nükleer fraksiyonlar *Nuclear Extraction Kit* adlı kitin prospektüsünde yazıldığı biçimde hazırlanmıştır. Kısaca, dokular tartılarak, küçük parçalara ayrılmış ve önceden soğutulmuş cam-teflon homojenizasyon tüplerine konularak, buz içinde bekletilmiştir. 1 g doku üzerine 3 ml soğuk DTT ve Nonidet P-40 içeren 1X *hypotonic buffer* eklendikten sonra, dokular cam-teflon homojenizatörde homojenize edilerek, 15 dakika buzda inkübe edilmiştir. Homojenatlar önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra tüplerin 4°C'de 300 x g'de 10 dakika santrifüj edilmesinin ardından süpernatantlar önceden soğutulmuş ve "tüp 1" olarak kodlanan mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Pelletlerin üzerine 500 µl 1X *hypotonic buffer* eklendikten sonra pipet ile resüspande edilmiş ve örnekler 15 dakika buzda inkübe edilmiştir. Örneklerin üzerine 50 µl Nonidet P-40 (%10) eklenerek pipet ile karıştırıldıktan sonra, tüpler 4°C'de 14.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Sitozolik fraksiyonu içeren süpernatantlar üzerinde "Tüp 1" yazan mikrosantrifüj tüplerine küçük hacimlerde aktarıldıktan sonra -80°C'de saklanmıştır. Sitozolik fraksiyon elde edilen pelletlerin üzerine 50 µl soğuk 1X *nuclear extraction buffer* eklendikten sonra pipet ile resüspande edilmiş ve 15 saniye en yüksek devirde vorteks ile karıştırılmıştır. Buz içindeki tüpler 15 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiş, 30 saniye en yüksek devirde vorteks ile karıştırılmış, 15 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve 4°C'de 14.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Nükleer fraksiyonu içeren süpernatantlar önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine küçük hacimlerde aktarıldıktan sonra -80°C'de saklanmıştır.

Sitozolik MyD88, TAK1, fosforile TAK1, IκB-α ve fosforile IκB-α ile sitozolik/nükleer NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, aktin, α-sarkomerik aktin ve β-aktin protein düzeyleri daha önce tanımlanan yöntemlere göre ölçülmüştür (59, 61, 75, 83, 84). Çalışmalarda alt jel olarak 6.7 ml %30'luk akrilamid 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 ise 10 µl Laemmli örnek tamponu 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 Laemmli 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-merkaptotanol 10 ml distile su içinde) içeren doku homojenatlarından hazırlanan ve -80°C'de dondurulmuş olan örnekler çözüldükten sonra 2 dakika kaynar su içinde bekletilmiş, 4°C'de 23.810 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiş, 30 µl'de 75 µg toplam protein olacak biçimde üst jelde oluşturulan çukurlardan ikinci ve dokuzuncu çukurlara eklenmiş ve %10 SDS-poliakrilamit jel elektroforez yöntemi ile yaklaşık 2 saatlik bir sürede ayrılmıştır.

Jeldeki proteinler ise yarı-kuru aktarma (*semi-dry transfer*) yöntemi ile 4.5 saatlik bir sürede nitroselüloz membrana aktarılmıştır. Bu işlem için 800 ml distile su içinde 5.8 g tris, 2.9 g glisin ve 0.37 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce pH değeri 8.3'e ayarlanarak üzerine 200 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 (295). 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. Ayrıca, jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için 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; kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir) ile boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır (296).

Proteinlerin jelden membrana aktarımının sağlandığı görüldükten sonra, membranlar Tris tampon çözeltisi (TTÇ) (3 g tris, 8 g NaCl, 2 g KCl ve 0.5 ml Tween 20 [%0.05] 1 litre distile içinde, pH 7.4) ile 1 kez 5 dakika yıkanmış, %5 YKST içeren TTÇ ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiş ve TTÇ ile 5 kez 10 dakika süre ile yıkanmış, ardından da primer antikorlar ile 4°C'de 12 saat inkübe edilmiştir. Membranlar, bağlanmamış proteinler TTÇ ile 3 kez 5 dakika yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş, ardından da TTÇ ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkanmıştır. Bazı deneylerde MyD88, fosforile TAK1, fosforile IκB-α ve fosforile NF-κB 65 proteinleri için kullanılan membranlar, TTÇ ile 1 kez 5 dakika süre ile yıkandıktan sonra, %2 YKST + %2 SSA karışımı ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiş, TTÇ ile 5 kez 10 dakika süre ile yıkanmış ve aktin, TAK1, IκB-α ve/veya NF-κB 65 proteinleri için primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edilmeye hazır duruma getirilmiştir. Bu membranlar primer antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat veya 4°C'de 12 saat inkübe edilerek bağlanmamış proteinler TTÇ ile 3 kez 5 dakika yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ardından da TTÇ ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkanmıştır.

MyD88, TAK1, fosforile TAK1, IκB-α, fosforile IκB-α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, aktin, α-sarkomerik aktin ve β-aktin, protein ekspresyonlarının en iyi biçimde ölçülebilmesi için yapılan işlemler ve kullanılan antikorların özellikleri Çizelge 3.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Sitozolik MyD88, TAK1, fosforile TAK1, IκB-α ve fosforile IκB-α ile sitozolik/nükleer NF-κB p65, fosforile NF-κB p65 ve aktin protein düzeylerinin ölçülmesinde yapılan işlemler ve kullanılan antikorların özellikleri.

Protein	Molekül Ağırlığı (kDa)	Membran Blokajı	Primer Antikor	Sekonder Antikor
MyD88	33	%5 YKST içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında 1 saat; 4 kez 10 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>MyD88 (F-19) (sc-8197, Santa Cruz)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500 oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama
TAK1	67	---*	<i>TAK1 (D94D7) rabbit mAb (5206, Cell Signalling)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500) oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Goat Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase (RPN4301, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama
Fosforile TAK1	~ 67	%5 YKST içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında 1 saat; 4 kez 10 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Phospho-TAK1 (Ser412) antibody (9339, Cell Signalling)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500) oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Goat Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase (RPN4301, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama
IκB-α	~ 41	---*	<i>IκB-α mouse monoclonal IgG (SC-1643, Santa Cruz)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500) oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama
Fosforile IκB-α	~ 41	%5 YKST içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında 1 saat; 4 kez 10 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>p-IκB-α (Ser 32) goat IgG (SC-7977, Santa Cruz)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500) oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama

Çizelge 3.4. (devam) Sitozolik MyD88, TAK1, fosforile TAK1, IκB-α ve fosforile IκB-α ile sitozolik/nükleer NF-κB p65, fosforile NF-κB p65 ve aktin protein düzeylerinin ölçülmesinde yapılan işlemler ve kullanılan antikorların özellikleri.

Protein	Molekül Ağırlığı (kDa)	Membran Blokajı	Primer Antikor	Sekonder Antikor
NF-κB p65	65	---*	<i>NF-κB p65 mouse monoclonal IgG (SC-8008, Santa Cruz)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500 oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama
Fosforile NF-κB p65	~ 65	%5 YKST içeren TTÇ içinde, oda sıcaklığında 1 saat; 4 kez 10 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>p-NF-κB p65 (Ser 536) mouse monoclonal IgG (SC-33020, Santa Cruz)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500 oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama
Aktin	43	---*	<i>Anti-actin antibody [2Q1055] (ab14128, Abcam)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500 oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama
α-Sarkomerik aktin	43	---*	<i>Monoclonal anti-α-sarcomeric Actin (A2172, Sigma)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500 oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama
β-aktin	42-45	---*	<i>Anti-β-aktin mouse monoclonal IgG (A1978, Sigma)</i> %5 SSA içeren TTÇ içinde (1:500 oranında), 4°C'de 12 saat inkübasyon; 3 kez 5 dakika süre TTÇ ile yıkama	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)</i> %0.1 SSA içeren TTÇ içinde (1:1.000 oranında), oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon; 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkama

* Daha önce kullanılıp da yeniden kullanıma hazır duruma getirilen membranlar kullanılmıştır. IκB, κB inhibitörü; MyD, miyeloid farklılaşma faktörü; NF-κB, nükleer faktör κB; TAK, transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz; SSA, sığır serum albumini; TTÇ, tris tampon çözeltisi; YKST, yağsız kurutulmuş süt tozu.

3.2.5. İmmünoreaktif Proteinlerin Analizi

Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanan jeller doğrudan, nitroselüloz membranda bulunan immünoreaktif proteinler ise membranların görüntüleme çözeltisi ile inkübe edilmesinin ardından jel dökümantasyon ve analiz sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Jel dokümantasyon ve analiz sistemi ile görüntülenen immünoreaktif proteinlerin yoğunluk analizi bir yazılım programı (*NIH image software; ImageJ 1.46r, Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.6. Verilerin Analizi

Sonuçlar ortalama±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. İstatistiksel olarak 0.05'ten küçük P değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. 5,14-HEDGE'nin LPS'ye Verilen Kardiyovasküler Yanıt Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanan 5,14-HEDGE ile OAB ve KH'de oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

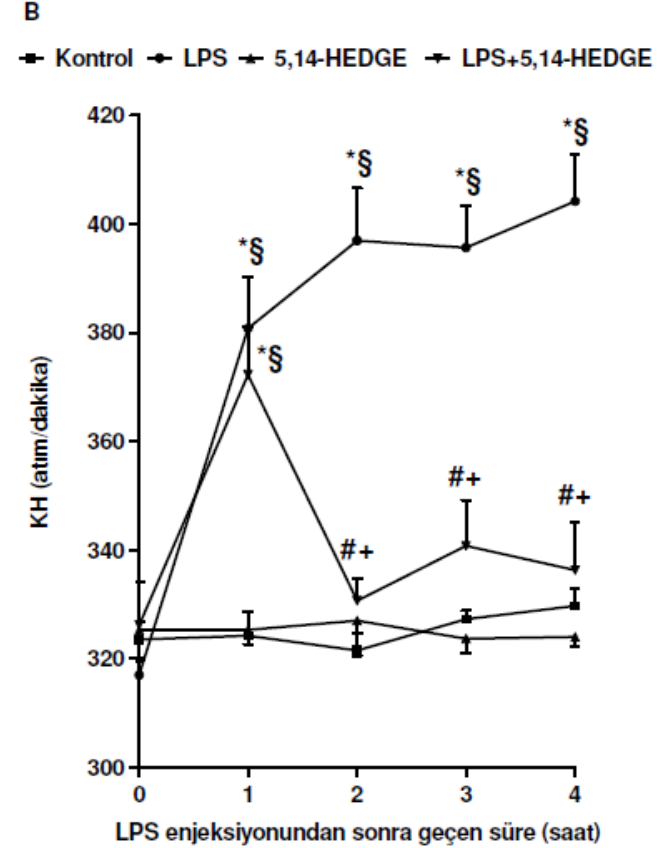
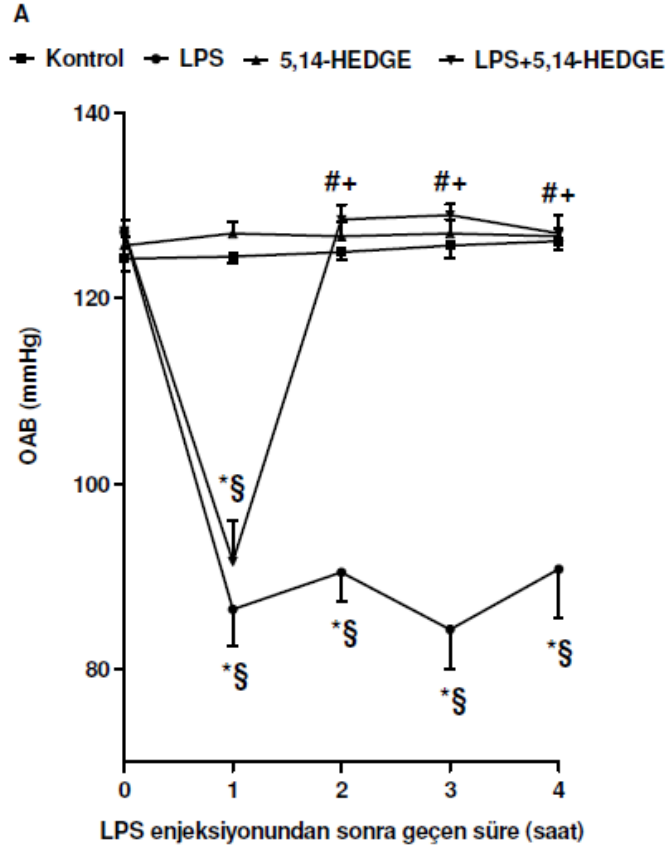
5,14-HEDGE tek başına uygulandığında OAB ve KH değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$). LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanan grupta, LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra azalan OAB ve artan KH, 5,14-HEDGE uygulanmasından sonraki birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde önlenmiştir ($P < 0.05$). LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanan grup, LPS grubu ile karşılaştırıldığında ise 5,14-HEDGE'nin, ET ile oluşan OAB'deki azalmayı ve KH'deki artmayı ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde önlediği görülmüştür ($P < 0.05$). LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanan grupta ölçülen OAB ve KH değerleri arasındaki farklılık birinci saat değerleri dışında kontrol grubundan farklı değildir ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 1 saat sonra oluşan hipotansiyon ve takikardiye endojen olarak 20-HETE oluşumundaki azalmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımız, ayrıca, LPS'nin OAB ve KH'de neden olduğu değişikliklerin 5,14-HEDGE ile önlenebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda 5,14-HEDGE'nin OAB ve KH üzerindeki etkisi.

	LPS uygulanmasından sonra geçen süre (saat)				
	0	1	2	3	4
Kontrol					
OAB	124.30±1.33 (n= 6)	124.50±0.67 (n= 6)	125.00±0.86 (n= 6)	125.70±1.38 (n= 6)	126.20±0.91 (n= 6)
KH	323.50±3.27 (n= 6)	324.20±4.44 (n= 6)	321.50±3.12 (n= 6)	327.30±1.56 (n= 6)	329.70±3.06 (n= 6)
LPS					
OAB	127.20±0.60 (n= 6)	86.50±3.93 ^{*§} (n= 6)	90.50±3.18 ^{*§} (n= 6)	84.33±4.26 ^{*§} (n= 6)	90.83±5.31 ^{*§} (n= 6)
KH	317.00±2.98 (n= 6)	380.80±9.44 ^{*§} (n= 6)	397.00±9.63 ^{*§} (n= 6)	395.70±7.68 ^{*§} (n= 6)	404.20±8.53 ^{*§} (n= 6)
5,14-HEDGE					
OAB	125.70±0.96 (n= 6)	127.00±1.34 (n= 6)	126.70±1.59 (n= 6)	127.00±1.53 (n= 6)	126.70±0.84 (n= 6)
KH	325.30±5.67 (n= 6)	325.30±2.62 (n= 6)	327.00±6.47 (n= 6)	323.70±2.70 (n= 6)	324.00±1.86 (n= 6)
LPS+5,14-HEDGE					
OAB	127.30±1.17 (n= 6)	91.67±4.33 ^{*§} (n= 6)	128.50±1.61 ^{#+} (n= 6)	129.00±1.13 ^{#+} (n= 6)	127.00±1.98 ^{#+} (n= 6)
KH	326.20±7.93 (n= 6)	372.30±8.74 ^{*§} (n= 6)	330.70±4.13 ^{#+} (n= 6)	340.80±8.37 ^{#+} (n= 6)	336.30±8.97 ^{#+} (n= 6)

5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikoz-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; KH, kalp hızı; LPS, lipopolisakarit, OAB, ortalama arter basıncı. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım/dk. olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; $P < 0.05$). § 0. ve + 1. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi ya da Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunns testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.1. Kontrol ve endotoksemik sıçanlarda 5,14-HEDGE'nin (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi. 5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; KH, kalp hızı; LPS, lipopolisakkarit, OAB, ortalama arter basıncı. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım/dk. olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi; $P < 0.05$). § 0. ve + 1. saat değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (tek-yönlü ANOVA ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi ya da Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunns testi; $P < 0.05$).

4.2. 5,14-HEDGE'nin Kontrol ve Endotoksemik Sıçanların Serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 Ekspresyon Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanan 5,14-HEDGE ile miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri üzerinde oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

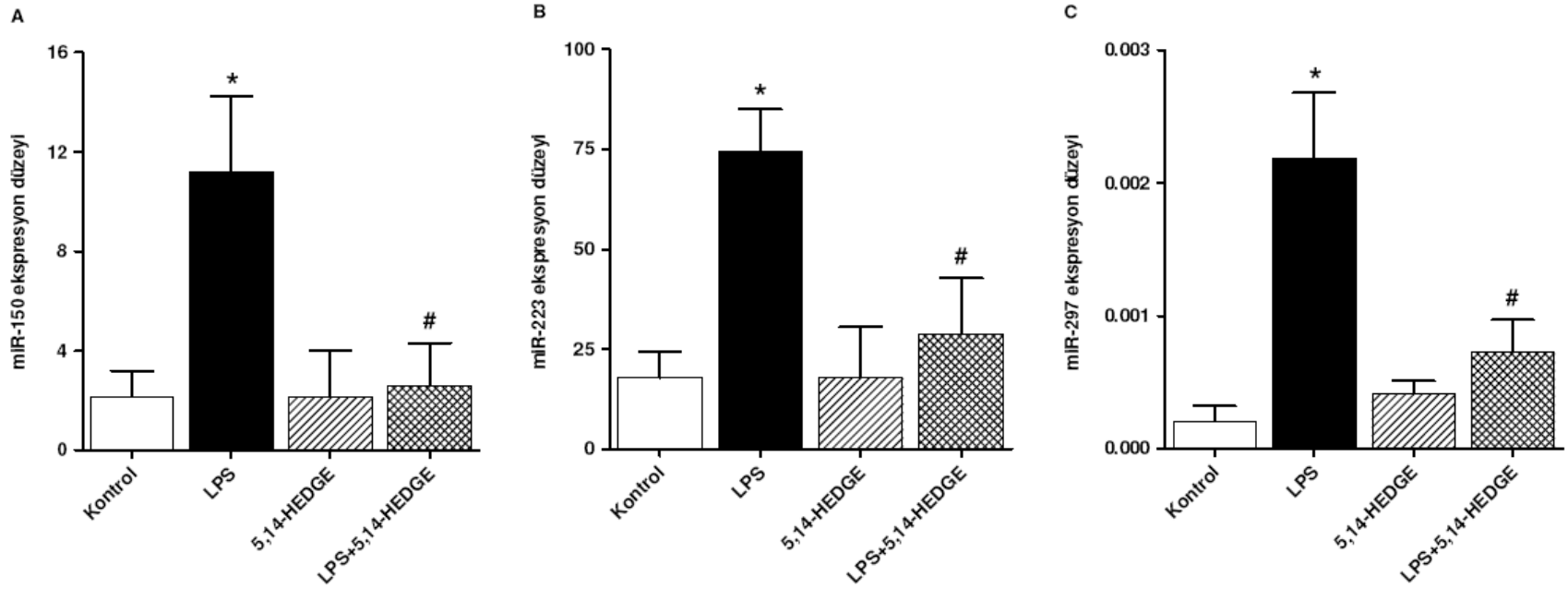
LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların serumlarında ölçülen miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerinde neden olduğu artma 5,14-HEDGE ile önlenmiştir ($P < 0.05$). 5,14-HEDGE tek başına uygulandığında doku miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra oluşan miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerindeki artışın endojen 20-HETE oluşumundaki azalma ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımız, ayrıca, LPS'nin miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerinde neden olduğu artışın 5,14-HEDGE ile önlenebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.2. Kontrol ve endotoksemik sıçanların serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi.

Serum miRNA ekspresyon düzeyleri	
miR-150	
Kontrol	2.15±1.03 (n= 4)
LPS	11.19±3.07 (n= 4)*
5,14-HEDGE	2.14±1.87 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	2.60±1.70 (n= 4)#
miR-223	
Kontrol	17.84±6.36 (n= 4)
LPS	74.57±10.44 (n= 4)*
5,14-HEDGE	17.97±12.60 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	28.82±13.86 (n= 4)#
miR-297	
Kontrol	0.00021±0.0001 (n= 4)
LPS	0.00218±0.0005 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.00042±0.0001 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.00073±0.0002 (n= 4)#

5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit, miR, mikroRNA. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların kanından elde edilen serumdan izole edilen toplam miRNA üzerinden ölçülen miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri miRNA düzeyleri CT yöntemi kullanılarak hesaplanmış, sonuçlar endojen kontrol olarak kullanılan Hs_RNU6B_2 değerlerine normalize edilerek ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.2. Kontrol ve endotoksemik sıçanların serumlarında (A) miR-150, (B) miR-223 ve (C) miR-297 ekspresyonu düzeyleri üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi. 5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit, miR, mikroRNA. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların kanından elde edilen serumdan izole edilen toplam miRNA üzerinden ölçülen miR-150, miR-22 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri miRNA düzeyleri CT yöntemi kullanılarak hesaplanmış, sonuçlar endojen kontrol olarak kullanılan *Hs_RNU6B_2* değerlerine normalize edilerek ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.3 5,14-HEDGE'nin Kontrol ve Endotoksemik Sıçanların Böbrek, Kalp, Torasik Aort ve Süperiyor Mezenterik Arterlerinde Aktin, MyD88, TAK1, IκB-α ile NF-κB p65 Protein Ekspresyonları ve/veya Fosforilasyonları Üzerindeki Etkisi

4.3.1. 5,14-HEDGE'nin Aktin Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanmasından sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerin sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında aktin, α-sarkomerik aktin ve/veya β-aktin protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Serum fizyolojik, LPS ve/veya 5,14-HEDGE uygulanan sıçanlardan izole edilen dokuların sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında aktin, α-sarkomerik aktin ve β-aktin protein ekspresyonunda oluşan değişiklikler bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Çizelge 4.3. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik ve nükleer aktin protein ekspresyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi.

	Sitozolik aktin protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/mg toplam protein)	Nükleer aktin protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/mg toplam protein)
Böbrek		
Kontrol	15163±398 (n= 4)	13851±645 (n= 4)
LPS	14501±499 (n= 4)	13853±506 (n= 4)
5,14-HEDGE	14245±517 (n= 4)	13842±573 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	14201±511 (n= 4)	13451±482 (n= 4)
	Sitozolik α-sarkomerik aktin protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/mg toplam protein)	Nükleer α-sarkomerik aktin protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/mg toplam protein)
Kalp		
Kontrol	13090±298 (n= 4)	12942±274 (n= 4)
LPS	12794±269 (n= 4)	12860±303 (n= 4)
5,14-HEDGE	12953±146 (n= 4)	12986±199 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	12995±173 (n= 4)	12732±436 (n= 4)
	Sitozolik β-aktin protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/mg toplam protein)	Nükleer β-aktin protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/mg toplam protein)
Torasik aort		
Kontrol	38386±749 (n= 4)	3430±214 (n= 4)
LPS	38499±704 (n= 4)	3200±256 (n= 4)
5,14-HEDGE	38904±593 (n= 4)	2995±534 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	38441±285 (n= 4)	2754±523 (n= 4)
Süperiyor mezenterik arter		
Kontrol	7927±342 (n= 4)	7710±357 (n= 4)
LPS	8091±332 (n= 4)	6521±502 (n= 4)
5,14-HEDGE	7689±383 (n= 4)	6922±568 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	7401±497 (n= 4)	7083±409 (n= 4)

5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir.

4.3.2. 5,14-HEDGE'nin Sitolik MyD88 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanmasından sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerin sitozolik fraksiyonlarında MyD88 protein ekspresyonu ile ilgili bulgular Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

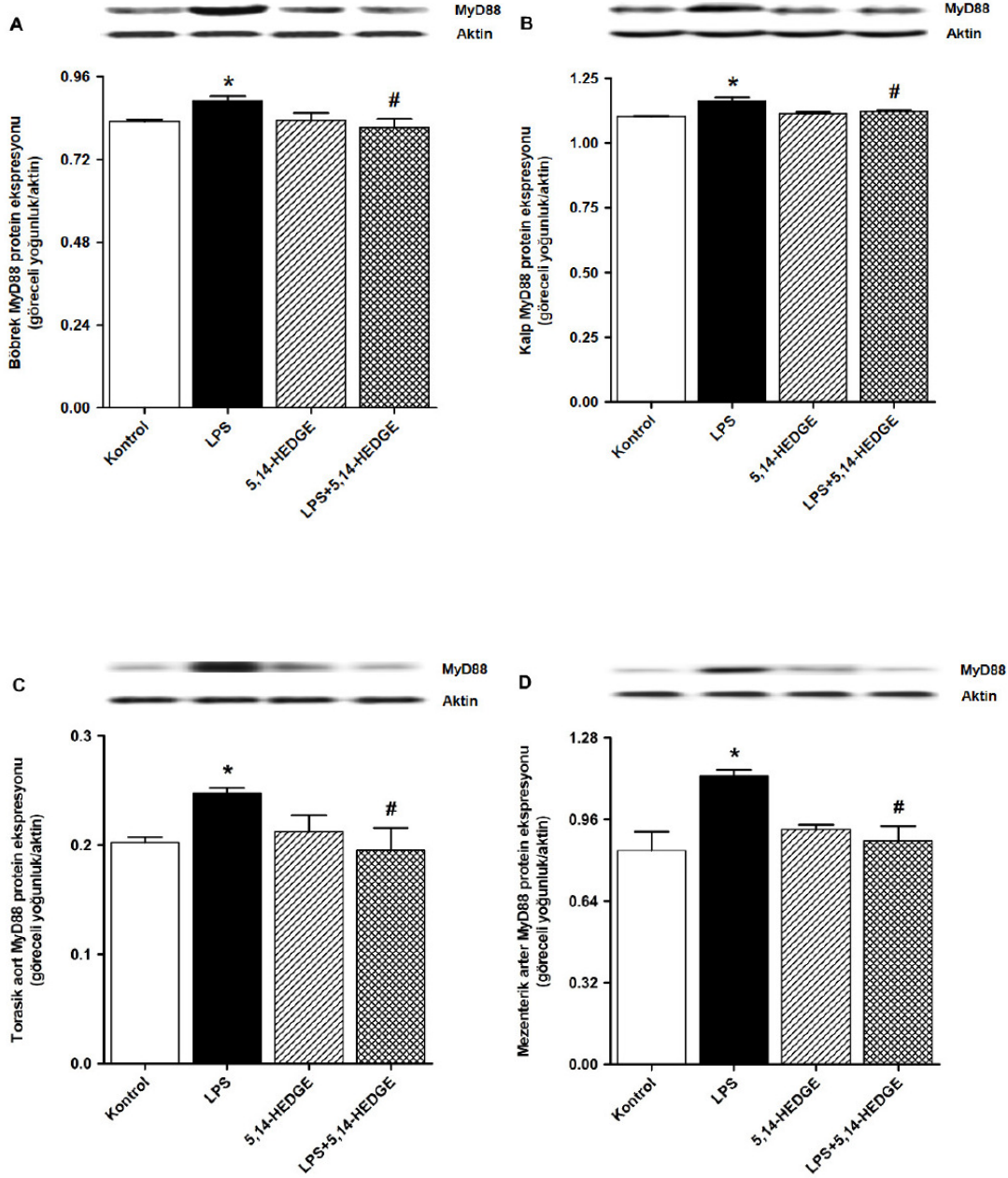
LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin sitozolik fraksiyonlarında ölçülen MyD88 protein ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin MyD88 protein ekspresyonunda neden olduğu artma 5,14-HEDGE ile önlenmiştir ($P < 0.05$). 5,14-HEDGE tek başına uygulandığında doku MyD88 protein ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterin sitozolik fraksiyonlarında MyD88 protein ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu sitozolik MyD88 protein ekspresyonundaki artma 5,14-HEDGE ile önlenmektedir.

Çizelge 4.4. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik MyD88 protein ekspresyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi.

MyD88 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	
Böbrek	
Kontrol	0.830±0.006 (n=4)
LPS	0.890±0.014 (n=4)*
5,14-HEDGE	0.833±0.023 (n=4)
LPS+5,14-HEDGE	0.813±0.025 (n=4)#
Kalp	
Kontrol	1.103±0.003 (n=4)
LPS	1.163±0.014 (n=4)*
5,14-HEDGE	1.115±0.005 (n=4)
LPS+5,14-HEDGE	1.123±0.005 (n=4)#
Torasik aort	
Kontrol	0.203±0.005 (n= 4)
LPS	0.248±0.005 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.213±0.015 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.195±0.021 (n= 4)#
Süperiyor mezenterik arter	
Kontrol	0.838±0.075 (n= 4)
LPS	1.130±0.024 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.920±0.019 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.875±0.059 (n= 4)#

5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit; MyD, miyeloid farklılaşma faktörü. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik fraksiyonlar hazırlanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.3. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) toraksik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde sitozolik MyD88 protein ekspresyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi. 5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit; MyD, miyeloit farklılaşma faktörü. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, toraksik aort ve süperiyör mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.3.3. 5,14-HEDGE'nin Sitolik TAK1 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanmasından sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterlerin sitozolik fraksiyonlarında TAK1 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu ile ilgili bulgular Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

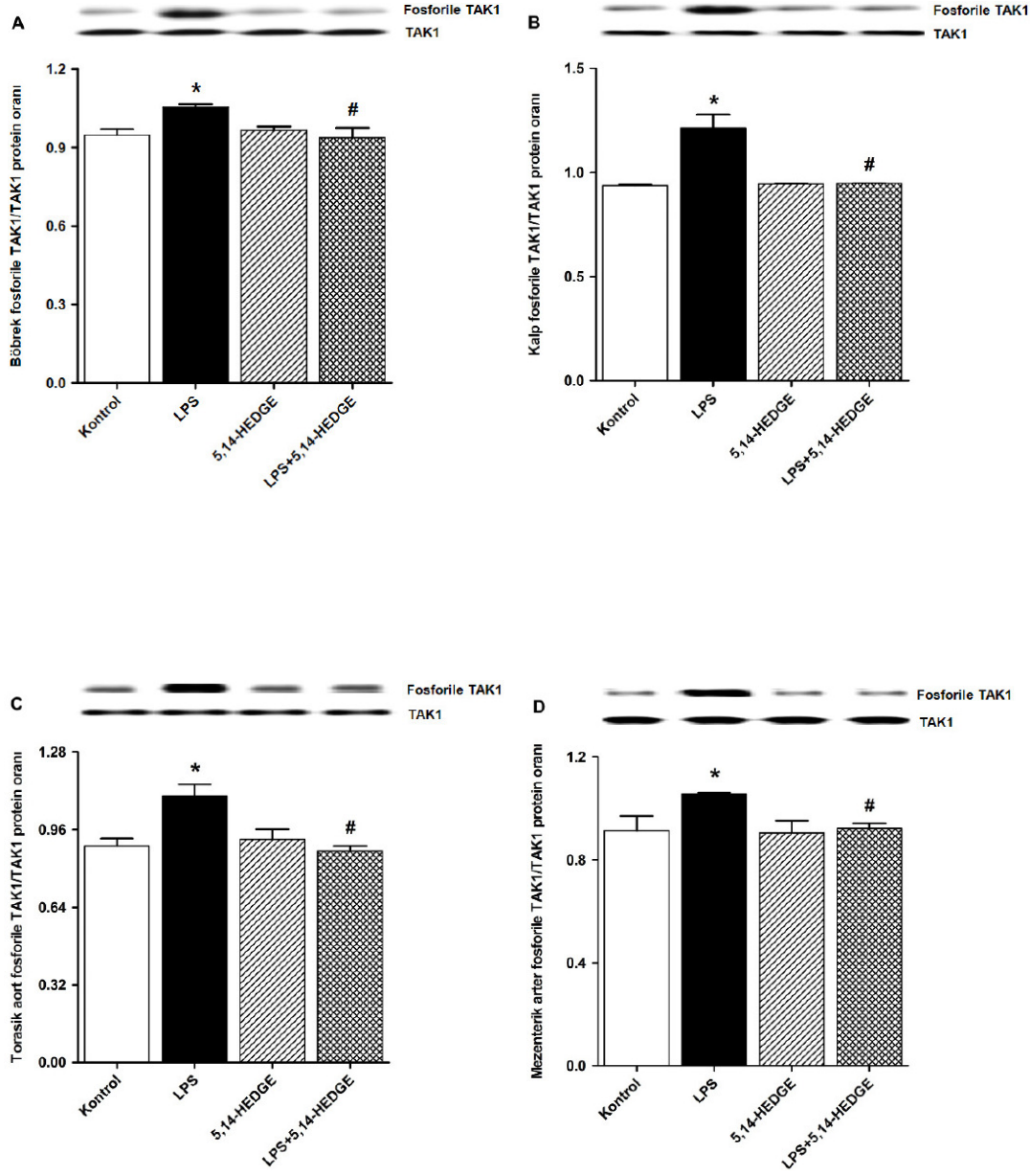
LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterlerinin sitozolik fraksiyonlarında ölçülen TAK1 protein ekspresyonu değişmezken ($P > 0.05$), fosforile TAK1 protein ekspresyonu ile fosforile TAK1/TAK1 protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin TAK1 protein fosforilasyonu ile fosforile TAK1/TAK1 protein oranında neden olduğu artma 5,14-HEDGE ile önlenmiştir ($P < 0.05$). 5,14-HEDGE tek başına uygulandığında doku TAK1 ve fosforile TAK1 protein ekspresyonu ile fosforile TAK1/TAK1 protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterin sitozolik fraksiyonlarında TAK1 protein ekspresyonu değişmezken, etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu doku sitozolik TAK1 etkinliğindeki artma 5,14-HEDGE ile önlenmektedir.

Çizelge 4.5. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik TAK1 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi.

	TAK1 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	Fosforile TAK1 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	Fosforile TAK1/TAK1 protein oranı
Böbrek			
Kontrol	1.278±0.026 (n= 4)	1.268±0.051 (n= 4)	0.948±0.023 (n= 4)
LPS	1.310±0.032 (n= 4)	1.293±0.030 (n= 4)*	1.055±0.010 (n= 4)*
5,14-HEDGE	1.335±0.035 (n= 4)	1.310±0.050 (n= 4)	0.965±0.015 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	1.340±0.032 (n= 4)	1.268±0.086 (n= 4)#	0.938±0.038 (n= 4)#
Kalp			
Kontrol	2.078±0.009 (n= 4)	1.943±0.010 (n= 4)	0.938±0.005 (n= 4)
LPS	2.110±0.014 (n= 4)	2.038±0.022 (n= 4)*	1.213±0.066 (n= 4)*
5,14-HEDGE	2.075±0.013 (n= 4)	1.963±0.019 (n= 4)	0.945±0.003 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	2.058±0.014 (n= 4)	1.950±0.009 (n= 4)#	0.948±0.003 (n= 4)#
Torasik aort			
Kontrol	0.215±0.003 (n= 4)	0.190±0.006 (n= 4)	0.893±0.030 (n= 4)
LPS	0.205±0.007 (n= 4)	0.225±0.005 (n= 4)*	1.098±0.049 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.210±0.04 (n= 4)	0.193±0.011 (n= 4)	0.920±0.042 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.198±0.006 (n= 4)	0.173±0.006 (n= 4)#	0.873±0.020 (n= 4)#
Süperiyor mezenterik arter			
Kontrol	1.430±0.011 (n= 4)	1.320±0.082 (n= 4)	0.913±0.057 (n= 4)
LPS	1.478±0.024 (n= 4)	1.538±0.006 (n= 4)*	1.055±0.007 (n= 4)*
5,14-HEDGE	1.545±0.048 (n= 4)	1.390±0.056 (n= 4)	0.905±0.046 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	1.550±0.044 (n= 4)	1.430±0.036 (n= 4)#	0.923±0.019 (n= 4)#

5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakarit; TAK, transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik fraksiyonlar hazırlanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.4. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) toraksik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik TAK1 protein fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi. 5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit; TAK, transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, toraksik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.3.4. 5,14-HEDGE'nin Sitolik IκB-α Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanmasından sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerin sitozolik fraksiyonlarında IκB-α protein ekspresyonu ve fosforilasyonu ile ilgili bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.

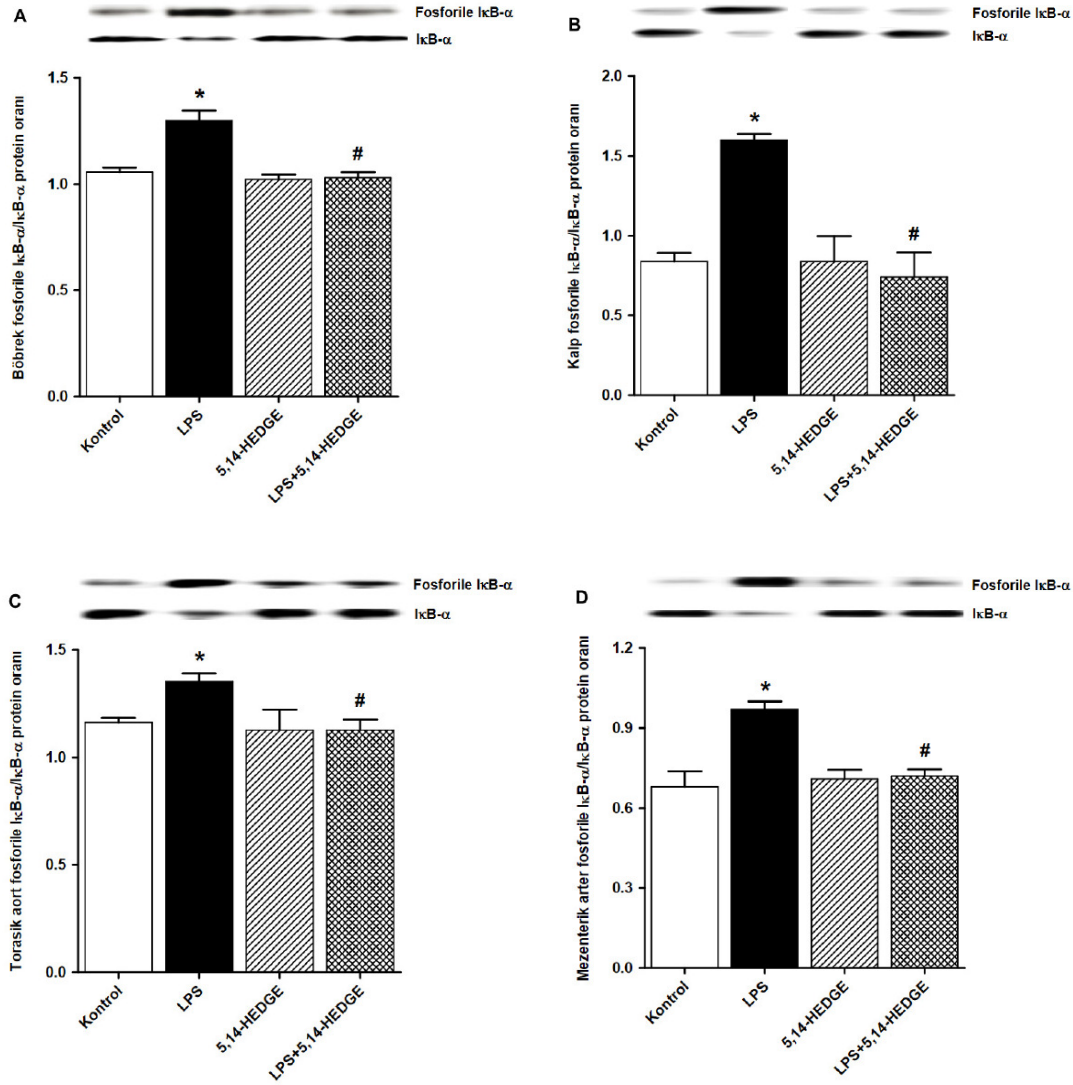
LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin sitozolik fraksiyonlarında ölçülen IκB-α protein ekspresyonu azalırken ($P < 0.05$), fosforile IκB-α protein ekspresyonu ile fosforile IκB-α/IκB-α protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin IκB-α protein ekspresyonunda neden olduğu azalma ile IκB-α protein fosforilasyonu ve fosforile IκB-α/IκB-α protein oranında neden olduğu artma 5,14-HEDGE ile önlenmiştir ($P < 0.05$). 5,14-HEDGE tek başına uygulandığında doku IκB-α ve fosforile IκB-α protein ekspresyonu ile fosforile IκB-α/IκB-α protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterin sitozolik fraksiyonlarında IKKβ etkinliğinin artması sonucunda IκB-α'nın etkinleştiğini ve degradasyona uğradığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu sitozolik IKKβ etkinliğinin artması sonucunda IκB-α'nın etkinleşmesi ve degradasyonu 5,14-HEDGE ile önlenebilmektedir.

Çizelge 4.6. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterlerinde sitozolik İκB-α protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi.

	İκB-α protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	Fosforile İκB-α protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	Fosforile İκB-α/İκB-α protein oranı
Böbrek			
Kontrol	0.730±0.015 (n=4)	0.773±0.014 (n=4)	1.058±0.021 (n=4)
LPS	0.683±0.011 (n=4)*	0.885±0.017 (n=4)*	1.300±0.046 (n=4)*
5,14-HEDGE	0.758±0.012 (n=4)	0.775±0.024 (n=4)	1.023±0.023 (n=4)
LPS+5,14-HEDGE	0.788±0.005 (n=4) [#]	0.810±0.022 (n=4) [#]	1.030±0.027 (n=4) [#]
Kalp			
Kontrol	0.933±0.046 (n=4)	0.775±0.016 (n=4)	0.838±0.056 (n=4)
LPS	0.550±0.013 (n=4)*	0.878±0.019 (n=4) [#]	1.598±0.041 (n=4)*
5,14-HEDGE	0.873±0.110 (n=4)	0.693±0.093 (n=4)	0.838±0.161 (n=4)
LPS+5,14-HEDGE	0.915±0.101 (n=4) [#]	0.648±0.091 (n=4) [#]	0.740±0.155 (n=4) [#]
Torasik aort			
Kontrol	0.219±0.003 (n= 4)	0.254±0.005 (n= 4)	1.163±0.022 (n= 4)
LPS	0.203±0.004 (n= 4)*	0.274±0.004 (n= 4)*	1.353±0.038 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.209±0.003 (n= 4)	0.235±0.017 (n= 4)	1.128±0.095 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.216±0.003 (n= 4) [#]	0.244±0.010 (n= 4) [#]	1.128±0.049 (n= 4) [#]
Süperiyör mezenterik arter			
Kontrol	1.623±0.045 (n= 4)	1.095±0.068 (n= 4)	0.680±0.059 (n= 4)
LPS	1.410±0.017 (n= 4)*	1.370±0.035 (n= 4)*	0.970±0.029 (n= 4)*
5,14-HEDGE	1.655±0.046 (n= 4)	1.173±0.049 (n= 4)	0.710±0.033 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	1.683±0.056 (n= 4) [#]	1.208±0.024 (n= 4) [#]	0.720±0.026 (n= 4) [#]

5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; İκB, κB inhibitörü; LPS, lipopolisakkarit. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik fraksiyonlar hazırlanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve [#] LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; *P* < 0.05).



Şekil 4.5. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyör mezenterik arterlerinde sitozolik IκB-α protein fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi. 5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; IκB, κB inhibitörü; LPS, lipopolisakarit. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.3.5. 5,14-HEDGE'nin Sitozolik ve Nükleer NF-κB p65 Protein Ekspresyonu ile Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya LPS ile birlikte 5,14-HEDGE uygulanmasından sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerin sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu ile ilgili bulgular Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8 ile Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

LPS uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$) (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6). LPS'nin NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında neden olduğu artma 5,14-HEDGE ile önlenmiştir ($P < 0.05$). 5,14-HEDGE tek başına uygulandığında doku NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$). Bu bulgulara ek olarak, LPS uygulanan sıçanların renal, kardiyak ve vasküler dokularında ölçülen nükleer/sitozolik NF-κB p65 protein oranı ile nükleer/sitozolik fosforile NF-κB p65 protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$) (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7). LPS'nin nükleer/sitozolik NF-κB p65 protein oranı ile nükleer/sitozolik fosforile NF-κB p65 protein oranında neden olduğu artma 5,14-HEDGE ile önlenmiştir ($P < 0.05$). 5,14-HEDGE tek başına uygulandığında doku nükleer/sitozolik NF-κB p65 protein oranı ile nükleer/sitozolik fosforile NF-κB p65 protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanan sıçanların renal, kardiyak ve vasküler dokularının sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında NF- κ B p65 ekspresyon ve etkinliği ile NF- κ B p65'in nükleer translokasyonunun arttığını, ayrıca fosforile NF- κ B p65'in nükleer fraksiyonda daha çok bulunduğunu göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu sitozolik/nükleer NF- κ B p65 ekspresyon ve etkinliği, NF- κ B p65 ve fosforile NF- κ B p65'in nükleer translokasyonu ile nükleer fraksiyondaki fosforile NF- κ B p65 miktarındaki artma 5,14-HEDGE ile önlenebilmektedir.

Çizelge 4.7. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterlerinde sitozolik ve nükleer NF- κ B p65 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi.

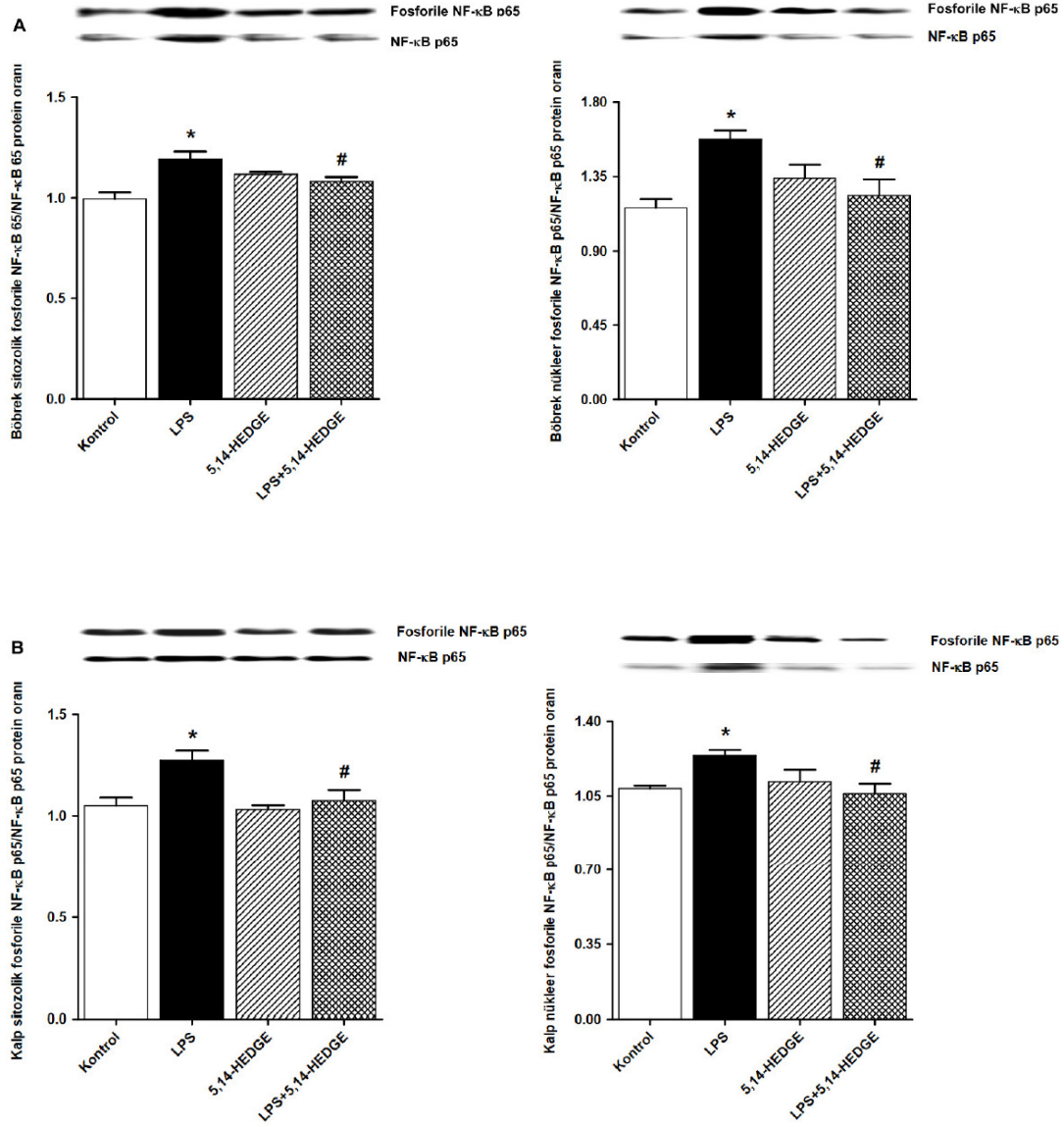
	NF- κ B p65 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	Fosforile NF- κ B p65 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	Fosforile NF- κ B p65/NF- κ B p65 protein oranı
Böbrek			
<i>Sitozolik</i>			
Kontrol	0.400±0.018 (n= 4)	0.425±0.016 (n= 4)	0.995±0.033 (n= 4)
LPS	0.453±0.003 (n= 4)*	0.493±0.011 (n= 4)*	1.193±0.038 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.413±0.006 (n= 4)	0.460±0.009 (n= 4)	1.118±0.012 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.398±0.014 (n= 4)#	0.440±0.018 (n= 4)#	1.083±0.021 (n= 4)#
<i>Nükleer</i>			
Kontrol	0.315±0.015 (n= 4)	0.398±0.025 (n= 4)	1.160±0.054 (n= 4)
LPS	0.403±0.019 (n= 4)*	0.505±0.007 (n= 4)*	1.575±0.054 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.318±0.005 (n= 4)	0.453±0.029 (n= 4)	1.340±0.082 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.315±0.014 (n= 4)#	0.418±0.027 (n= 4)#	1.235±0.098 (n= 4)#
Kalp			
<i>Sitozolik</i>			
Kontrol	0.363±0.020 (n= 4)	0.415±0.012 (n= 4)	1.050±0.041 (n= 4)
LPS	0.428±0.006 (n= 4)*	0.460±0.004 (n= 4)*	1.275±0.044 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.378±0.029 (n= 4)	0.413±0.006 (n= 4)	1.033±0.019 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.370±0.022 (n= 4)#	0.398±0.003 (n= 4)#	1.075±0.053 (n= 4)#
<i>Nükleer</i>			
Kontrol	0.345±0.019 (n= 4)	0.413±0.011 (n= 4)	1.085±0.014 (n= 4)
LPS	0.425±0.003 (n= 4)*	0.463±0.005 (n= 4)*	1.240±0.026 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.380±0.017 (n= 4)	0.423±0.006 (n= 4)	1.118±0.056 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.383±0.013 (n= 4)*	0.415±0.010 (n= 4)#	1.063±0.046 (n= 4)#

5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakarit; NF- κ B, nükleer faktör κ B. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

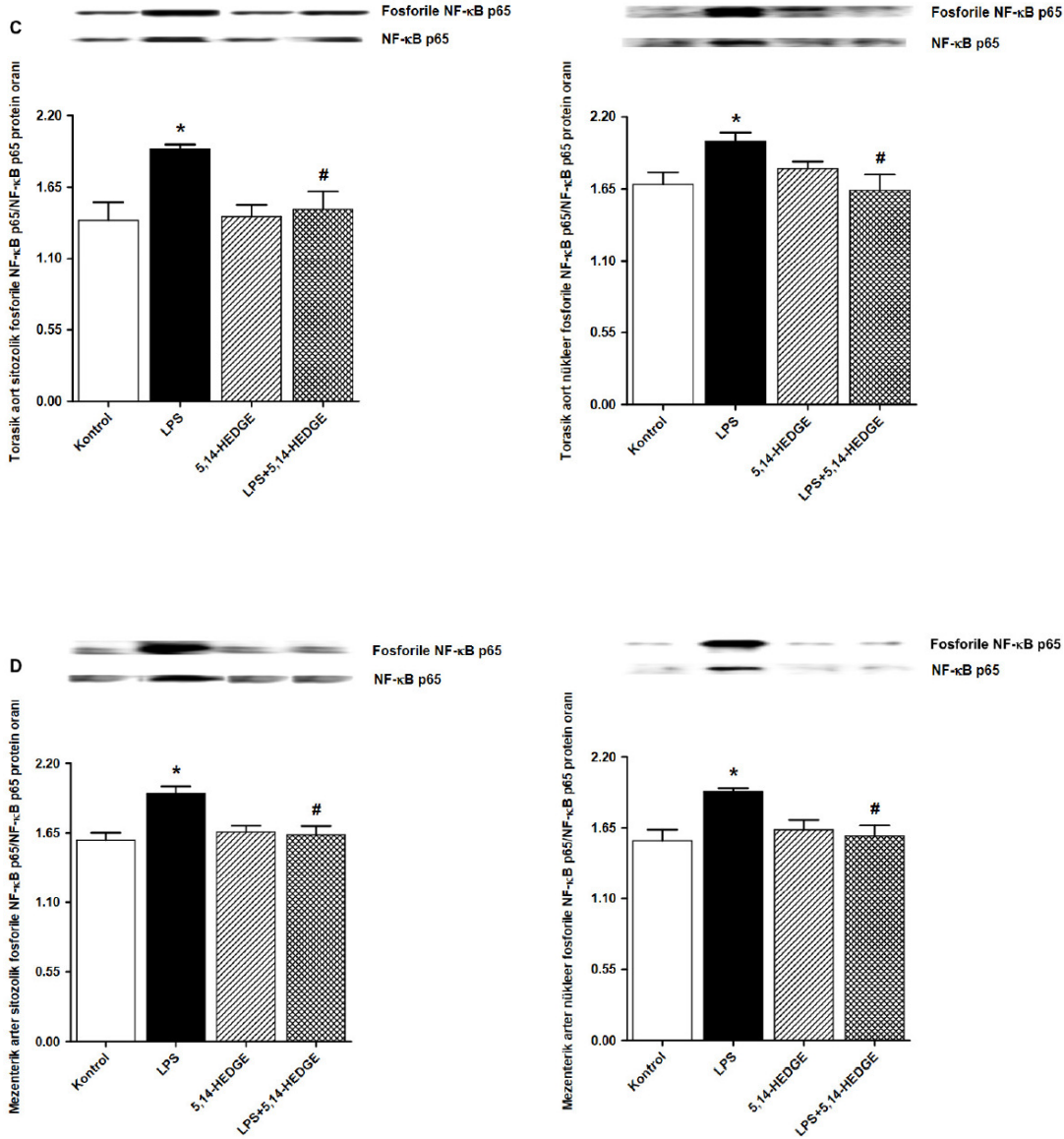
Çizelge 4.7. (devam) Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik ve nükleer NF-κB p65 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi.

	NF-κB p65 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	Fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/aktin)	Fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranı
Torasik aort			
<i>Sitozolik</i>			
Kontrol	0.098±0.011 (n= 4)	0.165±0.003 (n= 4)	1.395±0.138 (n= 4)
LPS	0.148±0.008 (n= 4)*	0.185±0.003 (n= 4)*	1.945±0.032 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.118±0.008 (n= 4)	0.165±0.003 (n= 4)	1.423±0.090 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.093±0.006 (n= 4)#	0.165±0.003 (n= 4)#	1.480±0.135 (n= 4)#
<i>Nükleer</i>			
Kontrol	0.575±0.019 (n= 4)	1.068±0.013 (n= 4)	1.685±0.092 (n= 4)
LPS	0.758±0.036 (n= 4)*	1.130±0.009 (n= 4)*	2.013±0.067 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.590±0.023 (n= 4)	1.063±0.014 (n= 4)	1.805±0.053 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.523±0.025 (n= 4)#	1.025±0.007 (n= 4)#	1.640±0.119 (n= 4)#
Süperiyor mezenterik arter			
<i>Sitozolik</i>			
Kontrol	0.938±0.060 (n= 4)	1.550±0.096 (n= 4)	1.593±0.060 (n= 4)
LPS	1.150±0.024 (n= 4)*	1.855±0.016 (n= 4)*	1.963±0.055 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.895±0.044 (n= 4)	1.595±0.021 (n= 4)	1.658±0.049 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.875±0.069 (n= 4)#	1.530±0.035 (n= 4)#	1.635±0.070 (n= 4)#
<i>Nükleer</i>			
Kontrol	0.918±0.071 (n= 4)	1.635±0.062 (n= 4)	1.550±0.086 (n= 4)
LPS	1.233±0.071 (n= 4)*	1.965±0.067 (n= 4)*	1.930±0.028 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.965±0.054 (n= 4)	1.625±0.097 (n= 4)	1.635±0.077 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.980±0.044 (n= 4)#	1.560±0.123 (n= 4)#	1.588±0.082 (n= 4)#

5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit; NF-κB, nükleer faktör κB. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.6. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik ve nükleer NF-κB p65 protein fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi. 5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit; NF-κB, nükleer faktör κB. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

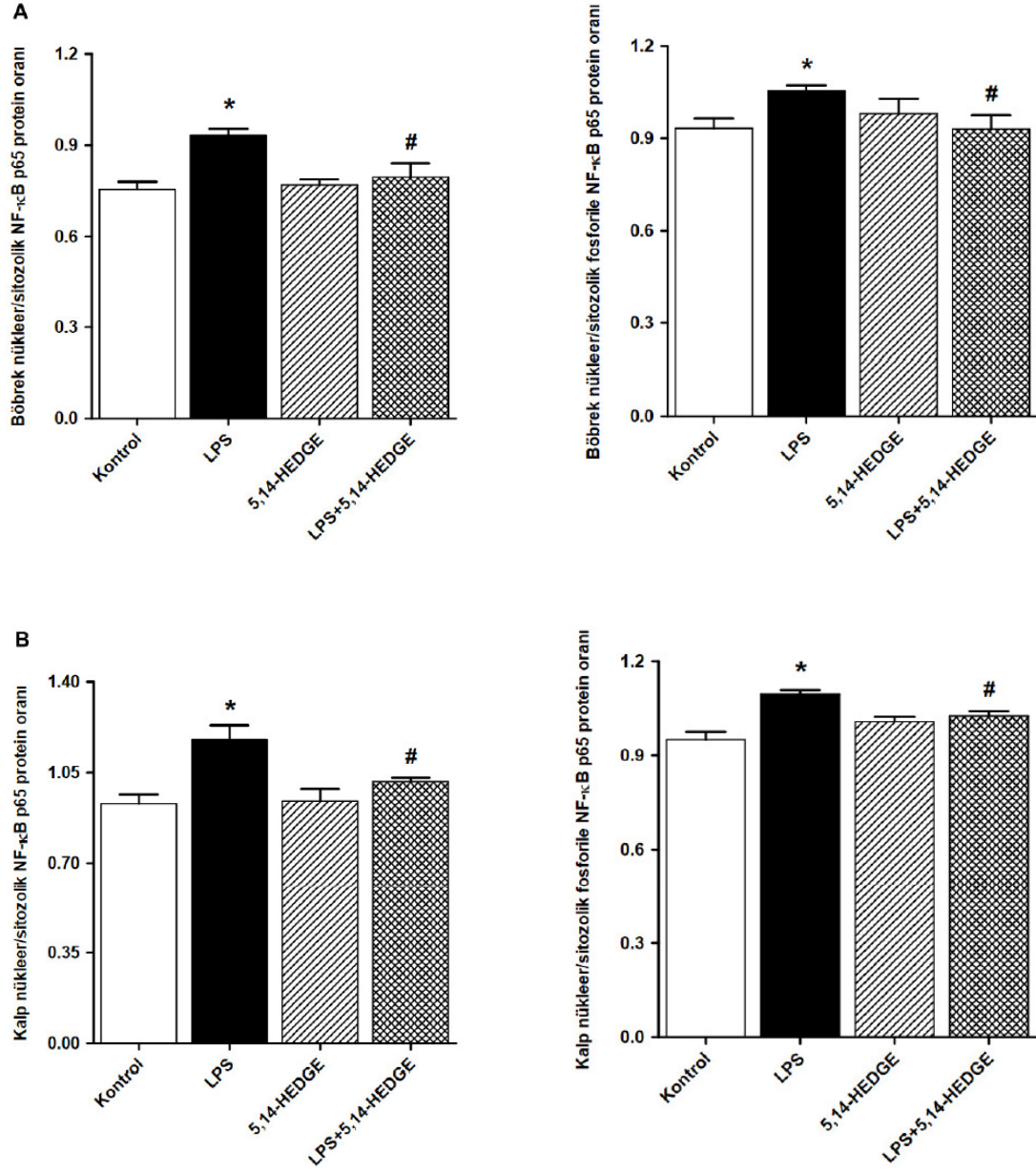


Şekil 4.6. (devam) Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde sitozolik ve nukleer NF-κB p65 protein fosforilasyonu üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi. 5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakarit; NF-κB, nukleer faktör κB. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik ve nukleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

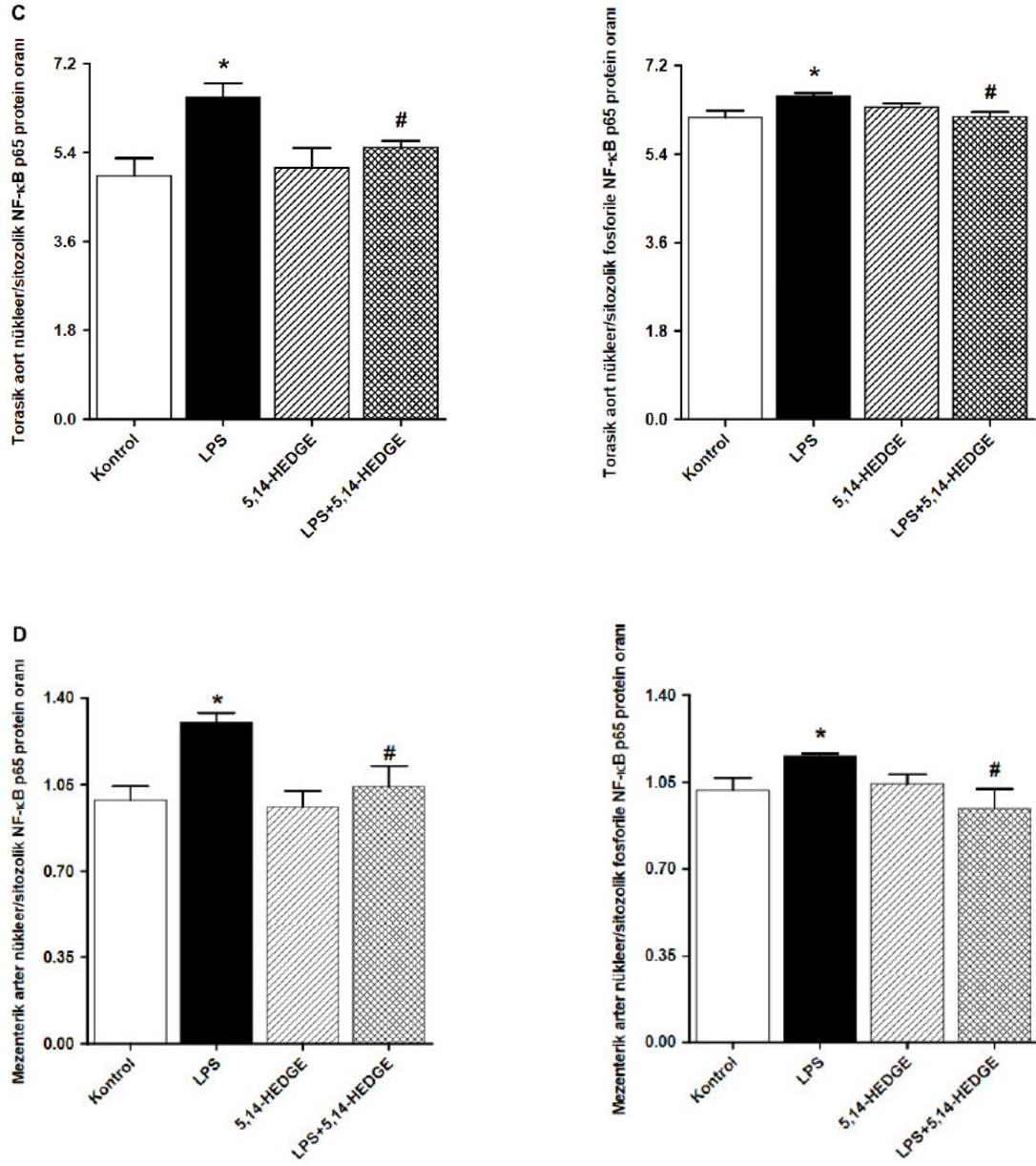
Çizelge 4.8. Kontrol ve endotoksemik sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nükleer NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein oranının, sitozolik NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein oranı üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi.

	Nükleer/sitozolik NF-κB p65 protein oranı	Nükleer/sitozolik fosforile NF-κB p65 protein oranı
Böbrek		
Kontrol	0.755±0.025 (n= 4)	0.933±0.032 (n= 4)
LPS	0.933±0.021 (n= 4)*	1.055±0.017 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.770±0.017 (n= 4)	0.980±0.048 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	0.795±0.046 (n= 4)#	0.930±0.045 (n= 4)#
Kalp		
Kontrol	0.930±0.035 (n= 4)	0.950±0.025 (n= 4)
LPS	1.178±0.055 (n= 4)*	1.095±0.013 (n= 4)*
5,14-HEDGE	0.940±0.047 (n= 4)	1.008±0.015 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	1.015±0.016 (n= 4)#	1.025±0.016 (n= 4)#
Torasik aort		
Kontrol	4.930±0.357 (n= 4)	6.150±0.138 (n= 4)
LPS	6.513±0.285 (n= 4)*	6.580±0.065 (n= 4)*
5,14-HEDGE	5.090±0.403 (n= 4)	6.355±0.080 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	5.503±0.131 (n= 4)#	6.165±0.092 (n= 4)#
Süperiyor mezenterik arter		
Kontrol	0.988±0.057 (n= 4)	1.018±0.050 (n= 4)
LPS	1.303±0.038 (n= 4)*	1.155±0.010 (n= 4)*
5,14-HEDGE	1.960±0.064 (n= 4)	1.043±0.038 (n= 4)
LPS+5,14-HEDGE	1.043±0.084 (n= 4)#	0.945±0.078 (n= 4)#

5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit; NF-κB, nükleer faktör κB. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.7. Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde nükleer NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein oranının, sitozolik NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein oranı üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi. 5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit; NF-κB, nükleer faktör κB. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

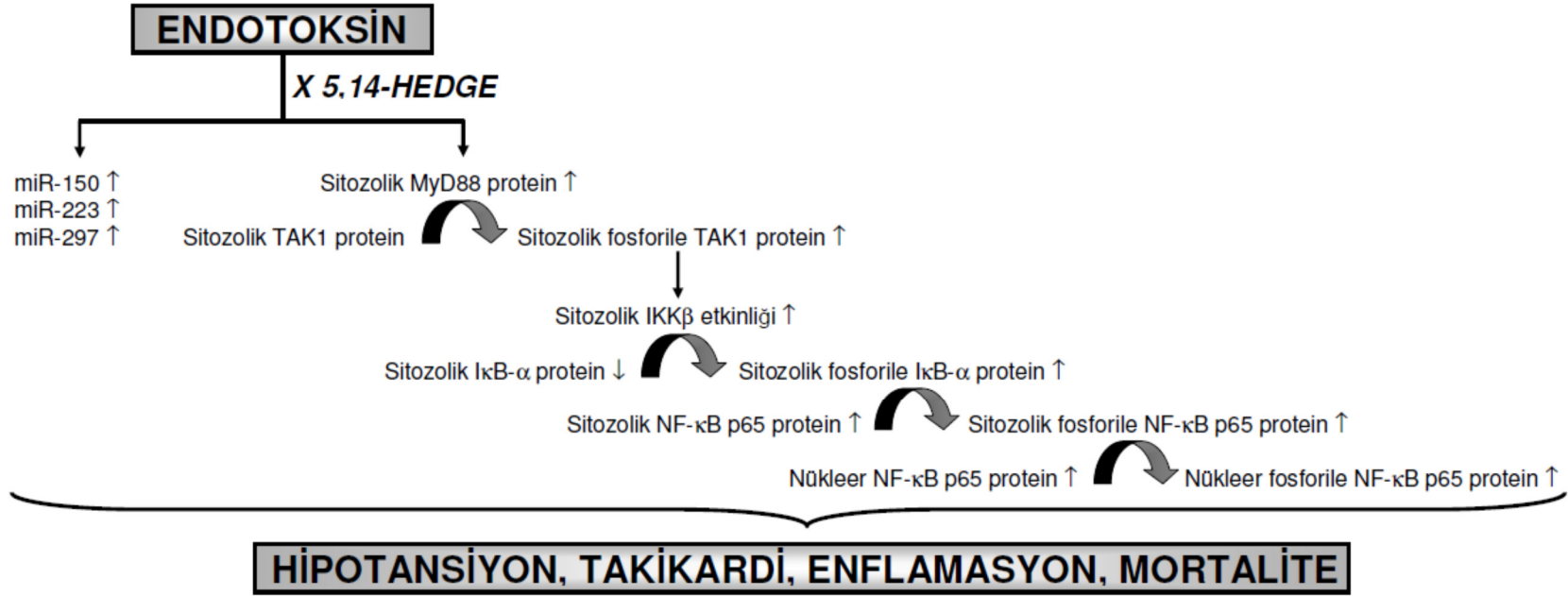


Şekil 4.7. (devam) Kontrol ve endotoksemik sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) toraksik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde nükleer NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonunun, sitozolik NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu oranı üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisi. 5,14-HEDGE, *N*-(20-hidroksieikosa-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; LPS, lipopolisakkarit; NF-κB, nükleer faktör κB. 5,14-HEDGE (30 mg/kg, s.k.) serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) (endotoksemik grup) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, toraksik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmelerinin ardından sitozolik ve nükleer fraksiyonlar hazırlanmıştır. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's *t* veya Mann-Whitney *U* testi; *P* < 0.05).

5. TARTIŞMA

Endojen olarak oluşan 20-HETE'nin etkilerini taklit ettiği bilinen dayanıklı 20-HETE analogu 5,14-HEDGE uygulanan kontrol ve endotoksemik sıçanların serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile renal, kardiyak ve vasküler dokularında sitozolik MyD88, TAK1, IKK β ve I κ B- α ile sitozolik/nükleer NF- κ B p65 protein ekspresyonları ve etkinliklerinin ne yönde değiştiğinin araştırıldığı bu çalışmanın bulguları, 5,14-HEDGE'nin endotoksemi sırasında görülen hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve mortaliteye karşı koruyucu etkisine miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolunun ekspresyon ve etkinliğindeki azalmanın katkıda bulunduğunu göstermektedir (Şekil 5.1).

Bu çalışmada, sıçanlara LPS uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyör mezenterik arterde sitozolik MyD88, TAK1, fosforile TAK1, I κ B- α ve fosforile I κ B- α ile sitozolik/nükleer NF- κ B p65 ve fosforile NF- κ B p65 ekspresyonlarındaki değişiklikler ölçülmüştür. OAB'deki düşme ve KH'deki artma, LPS uygulanmasının ardından 1 saat içerisinde başlamış ve 4 saat sürmüştür. 5,14-HEDGE, uygulanmasının ardından 1 saat sonra LPS'nin neden olduğu OAB'deki düşmeyi ve KH'deki artmayı önlemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin etkinleşmesi, baroreseptör refleks mekanizmaların duyarlılığı, FLA₂'yi etkinleştirdiği, doku lipitlerinden AA salıverilmesini uyardığı ve böylece prostaglandin sentezini artırdığı bilinen endotelin-1 ve katekolaminler gibi mediyatörler ile reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumundaki artma gibi kompensatuvar mekanizmaların, endotoksemi sırasında LPS'nin neden olduğu kan basıncının düşmesine katkıda bulunabilecek vazoregülatör moleküllerin oluşumundaki değişikliklerden sorumlu olabileceği bildirilmiştir (2). Enflamasyon ve septik şok gibi pek çok fenomenin geliştiği



Şekil 5.1 Endotoksemik sıçanlarda 5,14-HEDGE'nin sistemik miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile MyD88/TAK1/IKKβ/IκB-α/NF-κB yolu ekspresyon ve etkinliği üzerindeki etkisi ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizma. *Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ile daha önce yaptığımız çalışmaların bulgularına göre, sepsis ve septik şok patojenezinin en güçlü mikrobiyal mediyatörü olarak bilinen LPS'nin lipit A bölümü olan endotoksin, serum miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile renal ve kardiyovasküler dokuların sitozolik fraksiyonlarında MyD88 ve fosforile TAK1 ekspresyonu ile fosforile IκB-α/IκB-α oranı, sitozolik ve nükleer fraksiyonlarında fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 oranı ile nükleer/sitozolik NF-κB p65 oranı ve nükleer/sitozolik fosforile NF-κB p65 oranında artmaya neden olmaktadır. Endotoksinin neden olduğu bütün bu olaylar hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve mortalite ile sonuçlanabilmektedir. LPS'den 1 saat sonra sistemik yoldan uygulanan dayanıklı bir 20-HETE analogu olan ve endojen olarak oluşan 20-HETE'nin etkilerini taklit ettiği bilinen 5,14-HEDGE, endotoksemik sıçanlarda gözlenen bu değişikliklerin tümünü önlemekte ve yaşam süresini uzatmaktadır. Bu bulgulara göre, 5,14-HEDGE'nin endotoksemi sırasında görülen hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve mortaliteye karşı koruyucu etkisine miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile MyD88/TAK1/IKKβ/IκB-α/NF-κB yolunun ekspresyon ve etkinliğindeki azalma katkıda bulunmaktadır. 20-HETE, 20-hidroksieikozatetraenoik asit; 5,14-HEDGE, N-(20-hidroksieikoz-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin; IκB, κB inhibitörü; IKK, IκB kinaz; miR, mikroRNA; MyD, miyeloit farklılaşma faktörü; NF-κB, nükleer faktör κB; TAK, transforme edici büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz. (↑), arttı; (↓), azaldı.*

durumlarda NF- κ B'nin önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (117, 121). Özellikle, LPS ile uyarılan CD14/MD-2/TLR4/MyD88/TAK1 yolunda, TIRAP aracılığıyla MyD88'e iletilen uyarı IRAK1/4, TRAF6, TAK1, IKK α , IKK β , IKK γ ve MAPK'ler gibi sinyalleyici moleküller (MEK1, MKK3/6 ve MKK4; ERK1/2, p38 MAPK ve JNK1/2) aracılığıyla çeşitli enflamasyona neden olan mediyatörlerin oluşumundan sorumlu genlerin ekspresyonunu uyarmak üzere NF- κ B ve AP-1 transkripsiyon faktörleri etkinleştirilmektedir. Ekspresyonu uyarılan bu genlerin arasında sepsis ve septik şok patojenezinde önemli rol oynayan iNOS ve COX-2 gibi enzimler, akut faz proteinleri ile IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi enflamatuvar sitokinler yer almaktadır (2, 99, 105, 117-119, 121-123, 125, 136, 194). Daha önce endotoksemik sıçanlarda *in vivo* olarak yaptığımız çalışmaların sonuçlarına göre, subletal dozda (10 mg/kg; i.p.) LPS (*E. coli* LPS O111:B4) enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel septik şok modelinde gelişen vasküler hiporeaktivite ve hipotansiyona böbrek, kalp, akciğer, dalak, beyin, torasik aort, süperiyor mezenterik arter ile femoral arterde çEH, MEK1, ERK1/2, IKK β , I κ B- α , NF- κ B p65, iNOS, çGS, PKG ve/veya COX-2 ekspresyon/etkinliği, katalaz etkinliği ile TNF- α ve IL-8 oluşumunda artmaya, aynı zamanda CYP2C23, AA epoksijenazlar, CYP4A1/A3 ve eNOS ekspresyon/etkinliğinde azalma eşlik etmektedir. Ayrıca, apopitozun göstergelerinden biri olan kaspaz-3 etkinliği ile oksidatif stresin göstergelerinden toplam antioksidan etkinlik, SOD etkinliği, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz etkinliği ile indirgenmiş glutatyon düzeyleri azalmaktadır. Seçici iNOS inhibitörü fenilen-1,3-bis(etan-2-izotiyüüre) dihidrobromür (*phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothioureia] dihydrobromide*; 1,3-PBIT) (10 mg/kg, i.p.) veya MEK1 tarafından ERK1/2 fosforilasyonunun seçici inhibitörü 1,4-diamino-2,3-disiyano-1,4-bis[2-aminofeniltiyü]bütadien (*1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-amino-phenylthio]butadien*; U0126) (5 mg/kg, i.p.) ile MEK1/ERK1/2/iNOS yolu (61-68, 70-73) ve/veya seçici olmayan COX inhibitörü indometasin, daha çok COX-1'e seçici COX inhibitörü piroksikam ya da seçici COX-2 inhibitörü N-(2-sikloheksiloksi-4-nitrofenil)-metansülfonamid (*N-[2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl]-methansulphonamide*; NS-398) COX-1/2 inhibisyonu (58, 69, 72, 74, 78, 79, 82, 85) ya da endojen olarak oluşan 20-HETE'nin etkilerini taklit ettiği bilinen dayanıklı 20-HETE analogu 5,14-HEDGE (59, 60, 75-77, 80, 81, 83, 84) uygulanması sonucunda sıçanların renal ve/veya kardiyovasküler

dokularında enflamatuvar sitokinlerden IL-8 ve TNF- α oluşumu ile birlikte artmış olan çEH, MEK1, ERK1/2, IKK β , I κ B- α , NF- κ B p65, iNOS, hsp90, çGS, PKG, COX-2, gp91^{phox}, p47^{phox} ve/veya 3-nitrotirozin ekspresyon/etkinliği ile azalmış olan CYP2C23, AA epoksijenazlar ve CYP4A1 ekspresyon/etkinliği ile apoptoz, oksidan/antioksidan durum, lipid peroksidasyonu ve enflamasyon ile ilgili değişiklikler normal düzeylere getirilebilmekte, ayrıca güçlü bir vazokonstriktör olan 20-HETE oluşumunun artması ile vasküler hiporeaktivite, hipotansiyon, takikardi ve enflamasyon düzeltilebilmekte, farelerde mortalite önlenebilmektedir. Ayrıca, 20-HETE'nin vazokonstriktör etkilerinin yarışmalı antagonisti olan 20-HEDE (30 mg/kg, s.k.; LPS'den 1 saat sonra) ise, 5,14-HEDGE'nin endotoksemik sıçanlarda kan basıncı, KH, fosforile VASP, COX-2, CYP4A1, gp91^{phox}, p47^{phox} ve 3-nitrotirozin protein ekspresyonu, iNOS-hsp90 kompleks oluşumu ve NOS etkinliği ile siklik GMP, 6-keto-PGF_{1 α} , PGE₂, PGF_{2 α} , 20-HETE ve nitrotirozin düzeyleri üzerindeki etkisini geri çevirebilmektedir. Daha önce yaptığımız çalışmaların bulgularından yola çıkılarak yapılan bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, LPS uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterin sitozolik fraksiyonlarında MyD88, fosforile TAK1 (Ser⁴¹²) ve fosforile I κ B- α (Ser³²) protein ekspresyonu artmakta, TAK1 protein ekspresyonu değişmemekte, I κ B- α degradasyonunun bir göstergesi olarak ölçülen I κ B- α protein ekspresyonu azalmakta, TAK1 ve IKK β etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen sırasıyla fosforile TAK1/TAK1 ile fosforile I κ B- α /I κ B- α oranlarının yanında, renal ve kardiyovasküler dokuların hem sitozolik hem de nükleer fraksiyonlarında NF- κ B p65 ve fosforile NF- κ B p65 (Ser⁵³⁶) protein ekspresyonu artmaktadır. Bunlara ek olarak, sitozolik ve nükleer fraksiyonlarda NF- κ B p65'in etkinliğinin bir göstergesi olarak hesaplanan fosforile NF- κ B p65/NF- κ B p65 oranı ile NF- κ B p65'in nükleer translokasyonunun bir göstergesi olarak hesaplanan nükleer NF- κ B p65/sitozolik NF- κ B p65 oranı artmaktadır. Ayrıca, fosforile NF- κ B p65'nin nükleer translokasyonu ile fosforile NF- κ B p65'in hangi fraksiyonda daha çok bulunduğu bir göstergesi olarak hesaplanan nükleer/sitozolik fosforile NF- κ B p65 oranı artmaktadır. 5,14-HEDGE, LPS'nin neden olduğu bütün bu değişiklikleri önlemektedir. Sitolde olduğu kadar, NF- κ B'ye bağımlı ve bağımsız gen ekspresyonunu düzenlemek üzere nükleusta da bulunduğu gösterilen IKK β

(160, 161), I κ B- α (151, 152) ve kendisi (162, 163) dışında, gerek nükleusa geçmeden önce sitozolde gerekse nükleusta Ser⁵³⁶ üzerinden p65'in fosforilasyonuna neden olmaktadır (164-168); tam bir transkripsiyonel etkinlik için önemli olan p65'in bu bölgeden fosforilasyonu, NF- κ B etkinliğindeki artışı yansıtmaktadır (164, 168). Öte yandan, p50 ve p65 alt birimlerinin LPS'ye verilen sistemik yanıt sırasında inhibitör rol oynadığı ve NF- κ B'nin bu işlevlerinin SIRS ile birlikte olan mortalitenin önlenmesinde gerekli olabileceği bildirilmiştir (297). Ayrıca, Chew ve ark. (175) tarafından bir Ser/Thr fosfataz olan WIP1 tarafından Ser⁵³⁶ rezidüsü üzerinden defosforile edilen NF- κ B'nin etkinliğinin negatif yönde düzenlendiği gösterilmiştir. Ayrıca, NF- κ B ve I κ B- α moleküllerinin sitozol ve nükleus arasında gidip geldiği, ancak I κ B- α varlığında, I κ B- α /NF- κ B kompleksinin esas olarak sitozolde yerleştiği bildirilmiştir (179-181). I κ B- α /NF- κ B kompleks oluşumu, p65, ancak p50 değil, nükleer yerleşim bölgelerini maskelemekte ve böylece NF- κ B dimerlerinin nükleusa geçişini kısmen önlemektedir (182). Öte yandan, nükleusa giren bu I κ B- α /NF- κ B kompleksleri I κ B- α üzerindeki nükleer dışarı çıkarma bölgeleri aracılığıyla sitoplazmaya etkin bir biçimde geri taşınabilmektedirler (133). Sonuç olarak, I κ B- α /NF- κ B komplekslerinin nükleusa girişi ve çıkışının sürekli olarak gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Bunlara ek olarak, rodentlerde *ex vivo* veya *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda, LPS ile uyarılmanın ardından gelişen olayların NF- κ B p65 protein düzeylerinin nükleer fraksiyonda artması ve sitozolik fraksiyonda azalmasıyla yani NF- κ B p65'nin nükleer translokasyonu ile sonuçlandığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (298-302). Ayrıca, Ishizuka ve ark. (262) tarafından insan endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 20-HETE'nin MEK1/ERK1/2/NF- κ B yolunun etkinliğinin artması ve NF- κ B p65'in nükleer translokasyonu sonucunda enflamasyon gelişmesinde rol oynayan mediyatörlerin oluşumunu artırarak güçlü bir biçimde enflamasyona neden olabileceği bildirilmiştir. Sığır endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, 20-HETE'nin NO oluşumunu inhibe ettiği, ancak IKK β /I κ B- α yolu aracılığıyla NF- κ B etkinliğini artırdığı, 20-HETE'nin bu etkilerinin ise tirozin kinaz ve MEK1/ERK1/2 inhibitörleri ile önlenemediği gösterilmiştir (261). Dolayısıyla, NF- κ B 65 ile fosforile NF- κ B p65 protein düzeylerinin nükleer fraksiyonlarda daha yüksek miktarlarda olduğu yönündeki bulgularımız, hem NF- κ B p65 hem de fosforile

NF- κ B p65'in nükleusa geçebileceğini, ayrıca NF- κ B p65'in sitozolde olduğu kadar nükleusta da IKK β /I κ B- α yolu aracılığıyla fosforillenerek etkinleşebileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde bu bulgular, 5,14-HEDGE'nin endotoksemi sırasında görülen hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve mortaliteye karşı koruyucu etkisine MyD88/TAK1/MEK1/ERK1/2/AP-1 yolu olduğu kadar, MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolu ekspresyon ve etkinliğindeki azalmanın katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, ayrıca, 5,14-HEDGE uygulanan kontrol ve endotoksemik sıçanların serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin ne yönde değiştiği araştırılmıştır. Son yıllarda, "mRNA'lar ile doğrudan etkileşimleri sonucunda onların degradasyonuna neden olarak veya protein translasyonunu inhibe ederek protein kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen, ancak mRNA'lardan farklı olarak bir bilgi kodlamayan ve protein sentezine neden olmayan küçük RNA'lar" olarak tanımlanan miRNA'lardan, özellikle dolaşımda bulunanlarının ekspresyon düzeylerinin çeşitli hastalıklarda tanı amacı ile kullanılabilmesine ilişkin çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (4, 21, 25). Özellikle sepsis ve septik şok gibi enflamasyon ile belirgin durumların patojenezinde önemli bir rolü olan NF- κ B'nin, miR-9, miR-21, miR-125a, miR-132, miR-146a, miR-147b, miR-155 ve miR-301a gibi miRNA'ların ekspresyonlarının artmasına veya let-7i gibi miRNA'ların ekspresyonlarının azalmasına neden olarak, çoğu miRNA'nın ekspresyonunu düzenlediğine ilişkin çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Öte yandan, miR-9, miR-21, miR-146a ve miR-155 gibi miRNA'ların NF- κ B sinyallejici yolunu inhibe ettiği veya miR-301a gibi miRNA'ların NF- κ B etkinliğini artırdığına ilişkin bulgular da vardır (6, 8, 15, 17, 18, 22). Sepsisli hastaların serum veya plazmalarında özellikle miR-150, miR-223, miR-297, miR-146a ve miR-574-5p düzeylerinin tanı amacıyla belirteç olarak kullanılacaklarına ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yoğun bakımda yatan sepsisli hastalarda serum miR-297 düzeylerinin ölen hastalarda, miR-574-5p düzeylerinin ise yaşayan hastalarda daha yüksek olduğu bulunmuştur (26). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, miR-297'nin yaşam süresi, miR-574-5P'nin ise sepsis nedeniyle ölümden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Öte yandan, plazma miR-150

düzelelerinin sepsisli hastalarda azaldığı ve bu azalmanın hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (27). Bir başka çalışmada, sepsisli hastalarda serum miR-146a ve miR-223 düzeylerinin SIRS ve kontrol gruplarına göre daha az olduğu ve özellikle miR-223'ün SIRS ve sepsisi birbirinden ayırmak amacıyla kullanılabilceği bildirilmiştir (28). Schmidt ve ark. (29) ise LPS uygulanan sağlıklı insanların lökositlerinde miR-146b, miR-150, miR-342 ve let-7g düzeylerinin azalırken, miR-143 düzeyinin arttığını göstermişlerdir. Öte yandan, rodentlerde oluşturulan *in vivo* deneysel septik şok modellerinde miRNA'ların rolüne ilişkin yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. LPS uygulanan farelerin çeşitli dokularında miR-21, miR-25, miR-27b, miR-100, miR-140, miR-142-3p, miR-181c, miR-187, miR-194, miR-214, miR-223 ve miR-224 (30), miR-146a (31), miR-146b, miR-155 ve miR-1224 (32), miR-125b-5p, miR-150 ve miR-181a (33) düzeylerinin arttığı ve miR-181d (33) ile miR-223 (34) düzeylerinin azaldığının gösterilmesine karşın, sıçanlarda miRNA düzeylerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca, literatürde sepsisli hastaların serum veya plazmalarında düzeylerinin ölçüldüğü miR-150 ve miR-223 ile sıçanların serum (35), hepatik stellat hücreler (36), kardiyomyosit (37) ve kolon mukozasında (38) yapılan çalışmalar olmasına karşın, miR-297 düzeylerinin ne yönde değiştiğine ilişkin herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre, sıçanlara LPS uygulanmasından 4 saat sonra serum miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri artmakta ve 5,14-HEDGE bu artışı önleyebilmektedir. Her ne kadar endotoksemik sıçanlarda miR-150 ve miR-223 ekspresyon düzeylerinin arttığına ilişkin bulgularımız daha önce sepsisli hastaların plazma/serum miR-150 (27) ve miR-223 (28) düzeylerinin azaldığını gösteren çalışmaların sonuçları ile çelişkili olsa da, miR-297 ekspresyon düzeyleri ile ilgili bulgumuz yoğun bakımda yatan sepsisli hastaların serum miR-297 düzeylerinin ölen hastalarda daha yüksek olduğu bulgusu ile uyumlu görünmektedir (26). miR-150 ve miR-223 ekspresyon düzeylerine ilişkin çelişkili bulguların nedenlerinden biri olarak, enfeksiyona maruziyet sonucunda başlayan ve çoklu organ yetmezliği sonucu ölüme dek gidebilen olayların patojenezi göz önüne alındığında (Çizelge 2.1), çalışmamızın sıçanlara LPS enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel septik şok modelinde yapılmış olması sayılabilir. Öte yandan, oluşturduğumuz deneysel septik şok modelinde elde edilen bulgular, MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolu olduğu kadar, bu

yol aracılığıyla ekspresyonları artan miR-150, miR-223 ve miR-297'nin de hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve mortaliteye neden olabilecek mediyatörlerin oluşumunda rol oynayan iNOS, COX-2 ve CYP4A1 gibi enzimlere ilişkin genlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir. Bulgularımız, ayrıca, ekspresyonları artan miR-150, miR-223 ve miR-297'nin de MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolunun ekspresyon ve/veya etkinliğini artırabileceğini düşündürmüştür. Sonuç olarak, daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde bulgularımız, 5,14-HEDGE'nin endotoksemi sırasında görülen hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve mortaliteye karşı koruyucu etkisine MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolunun ekspresyon ve etkinliği olduğu kadar, miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerinde neden olduğu azalmanın da katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Endojen olarak oluşan 20-HETE'nin etkilerini taklit ettiği bilinen dayanıklı bir 20-HETE analogu 5,14-HEDGE uygulanan kontrol ve endotoksemik sıçanların serumlarında miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile renal, kardiyak ve vasküler dokularında sitozolik MyD88, TAK1, IKK β ve I κ B- α ile sitozolik/nükleer NF- κ B p65 protein ekspresyonları ve etkinliklerinin ne yönde değiştiğinin araştırıldığı bu çalışmada, 5,14-HEDGE'nin endotoksemi sırasında görülen hipotansiyon, takikardi, enflamasyon ve mortaliteye karşı koruyucu etkisine miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeyleri ile MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolunun ekspresyon ve etkinliğindeki azalmanın katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bulgularımız, endotoksemi sırasında düzeylerinin azaldığı gösterilen 20-HETE'nin sistemik yoldan uygulanabilen dayanıklı analoglarından yola çıkılarak sistemik yoldan kolaylıkla uygulanabilecek biçimde geliştirilecek ilaçlar, başta yoğun bakım birimleri olmak üzere öteki kliniklerde vasküler hiporeaktivite, hipotansiyon, takikardi ve inflamasyonun eşlik ettiği ve yaşam süresinde kısalma ile sonuçlanabilen çeşitli kardiyovasküler ve renal bozukluk vb. nedenlerden dolayı ortaya çıkan hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir.

Bunlara ek olarak bulgularımız, endotoksemi sırasında bir yandan MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolu olduğu kadar bu yol aracılığıyla ekspresyonları artan miR-150, miR-223 ve miR-297'nin de iNOS, COX-2 ve CYP4A1 gibi enzimlere ilişkin genlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olabileceğini, öbür yandan ekspresyonları artan miR-150, miR-223 ve miR-297'nin de MyD88/TAK1/IKK β /I κ B- α /NF- κ B yolunun ekspresyon ve/veya etkinliğini artırabileceğini düşündürmüştür. Öte yandan, miRNA'ların hedef genlerinin bulunduğu bir veri tabanında (<http://www.targetscan.com>; *version 6.2*) sıçanlar için yapılan taramada, miR-150 (rno-miR-150), miR-223 (rno-miR-223) ve miR-297 (rno-miR-297)'nin iNOS, COX-2 ve CYP4A1 gen ekspresyonunda rol oynayan çeşitli transkripsiyon faktörleri ile

kinazların ekspresyonu ile ilişkili olduklarının görülmesine karşın, bu enzimlerin doğrudan miR-150, miR-223 ve miR-297'nin hedef genleri arasında olduğuna ilişkin bir bilgi bulunmamaktadır. Bu duruma açıklık getirebilmek için, NF-κB inhibitörü veya miR-150, miR-223 ile miR-297'ye ilişkin anti-miR oligonükleotitleri uygulanarak ya da bu miRNA'ların susturulduğu endotoksemik sıçanların renal ve kardiyovasküler dokularında NF-κB, iNOS, COX-2 ve CYP4A1 ekspresyon ve etkinliği ile miR-150, miR-223 ve miR-297 ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi gerekmektedir.

Endotoksemik sıçanların renal ve kardiyovasküler dokularında NF-κB p65 ile fosforile NF-κB p65 protein düzeylerinin nükleer fraksiyonlarda daha yüksek miktarlarda olduğu yönündeki bulgularımız, hem NF-κB p65 hem de fosforile NF-κB p65'in nükleusa geçebileceğini, ayrıca NF-κB p65'in sitozolde olduğu kadar nükleusta da IKKβ/IκB-α yolu aracılığıyla fosforillenerek etkinleşebileceğini düşündürmüştür. Dolayısıyla, endotoksemik sıçanların renal ve kardiyovasküler dokularında NF-κB p65'in nükleusta da IKKβ/IκB-α yolu aracılığıyla fosforillenerek etkinleşebileceğini göstermek amacıyla, nükleer fraksiyonda da IKKβ/IκB-α yolu ekspresyon ve etkinliğinin ölçülmesi, ayrıca, NF-κB p65'in nükleusa girişi ve çıkışında rol oynayan importin-α3 gibi importinler (186, 187) ile Crm1 (191) gibi eksportinlerin ekspresyonlarının ne yönde değiştiğinin ve bu değişiklikler üzerinde 5,14-HEDGE'nin etkisinin araştırılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **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, Rubenfeld 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.
2. **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.
3. **Tunctan B.** 20-HETE mimetics or inhibitors in the treatment of cancer patients with sepsis and septic shock. *Int J Cancer Stud Res*, **2013**; 2(1):101-8.
4. **Abdellatif M.** Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circ Res*, **2012**; 110(4):638-50.
5. **Arora S, Rana R, Chhabra A, Jaiswal A, Rani V.** miRNA-transcription factor interactions: a combinatorial regulation of gene expression. *Mol Genet Genomics*, **2013**; 288(3-4):77-87.
6. **Boldin MP, Baltimore D.** MicroRNAs, new effectors and regulators of NF- κ B. *Immunol Rev*, **2012**; 246(1):205-20.
7. **Cowland JB, Hother C, Grønbaek K.** MicroRNAs and cancer. *APMIS*, **2007**; 115(10):1090-106.
8. **Eulalio A, Schulte L, Vogel J.** The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol*, **2012**; 9(6):742-50.
9. **Erson AE, Petty EM.** MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet*, **2008**; 74(4):296-306.
10. **Esteller M.** Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, **2008**; 358(11):1148-59.
11. **Guil S, Esteller M.** DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol*, **2009**; 41(1):87-95.
12. **Lee YS, Dutta A.** MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, **2009**; 4:199-227.

13. **Liu B, Li J, Cairns MJ.** Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform*, **2012**; Nov 22.
14. **Meunier J, Lemoine F, Soumillon M, Liechti A, Weier M, Guschanski K, Hu H, Khaitovich P, Kaessmann H.** Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Res*, **2013**; 23(1):34-45.
15. **O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D.** microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*, **2012**; 30:295-312.
16. **Montano M.** MicroRNAs: miRRORS of health and disease. *Transl Res*, **2011**; 157(4):157-62.
17. **Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT.** Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol*, **2013**; 19(20):2985-96.
18. **Rebane A, Akdis CA.** MicroRNAs: essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, **2013**; 132(1):15-26.
19. **Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N.** Circulating microRNAs: association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol*, **2011**; 80(2):193-208.
20. **Ul Hussain M.** Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res*, **2012**; 349(2):405-13.
21. **Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR.** Circulating microRNAs as biomarkers in health and disease. *J Clin Diagn Res*, **2012**; 6(10):1791-5.
22. **Virtue A, Wang H, Yang XF.** MicroRNAs and toll-like receptor/interleukin-1 receptor signaling. *J Hematol Oncol*, **2012**; 5:66.
23. **Yang N, Coukos G, Zhang L.** MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. *Int J Cancer*, **2008**; 122(5):963-68.
24. **Zhang B, Farwell MA.** microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *J Cell Mol Med*, **2008**; 12(1):3-21.
25. **Zen K, Zhang CY.** Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev*, **2012**; 32(2):326-48.
26. **Wang H, Meng K, Chen Wj, Feng D, Jia Y, Xie L.** Serum miR-574-5p: a prognostic predictor of sepsis patients. *Shock*, **2012**; 37(3):263-7.

27. **Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, Nicoloso MS, Barbarotto E, Popa M, Stanciulea O, Fernandez MH, Tulbure D, Bueso-Ramos CE, Negrini M, Calin GA.** MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One*, **2009**; 4(10):e7405.
28. **Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, Zhu KM.** Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*, **2010**; 394(1):184-8.
29. **Schmidt WM, Spiel AO, Jilma B, Wolzt M, Müller M.** In vivo profile of the human leukocyte microRNA response to endotoxemia. *Biochem Biophys Res Commun*, **2009**; 380(3):437-41.
30. **Moschos SA, Williams AE, Perry MM, Birrell MA, Belvisi MG, Lindsay MA.** Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*, **2007**; 8:240.
31. **Schmelzer C, Kitano M, Rimbach G, Niklowitz P, Menke T, Hosoe K, Döring F.** Effects of ubiquinol-10 on microRNA-146a expression in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm*, **2009**; 2009:415437.
32. **Niu Y, Mo D, Qin L, Wang C, Li A, Zhao X, Wang X, Xiao S, Wang Q, Xie Y, He Z, Cong P, Chen Y.** Lipopolysaccharide-induced miR-1224 negatively regulates tumour necrosis factor- α gene expression by modulating Sp1. *Immunology*, **2011**; 133(1):8-20.
33. **Belkaya S, Silge RL, Hoover AR, Medeiros JJ, Eitson JL, Becker AM, de la Morena MT, Bassel-Duby RS, van Oers NS.** Dynamic modulation of thymic microRNAs in response to stress. *PLoS One*, **2011**; 6(11):e27580.
34. **Chen Q, Wang H, Liu Y, Song Y, Lai L, Han Q, Cao X, Wang Q.** Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1 β production in macrophages by targeting STAT3. *PLoS One*, **2012**; 7(8):e42971.
35. **Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K.** MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*, **2011**; 6(8):e22839.
36. **Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Li Y, Wang SS, Torok NJ, Wu J, Zern MA.** Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2010**; 298(1):G101-6.
37. **Lu H, Buchan RJ, Cook SA.** MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovasc Res*, **2010**; 86(3):410-20.
38. **Davidson LA, Wang N, Shah MS, Lupton JR, Ivanov I, Chapkin RS.** n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis*, **2009**; 30(12):2077-84.

39. **Alexanian A, Sorokin A.** Targeting 20-HETE producing enzymes in cancer - rationale, pharmacology, and clinical potential. *Onco Targets Ther*, **2013**; 6:243-55.
40. **Alsaad AM, Zordoky BN, Tse MM, El-Kadi AO.** Role of cytochrome P450-mediated arachidonic acid metabolites in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. *Drug Metab Rev*, **2013**; 45(2):173-195.
41. **Chen L, Ackerman R, Guo AM.** 20-HETE in neovascularization. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2012**; 98(3-4):63-8.
42. **Edson KZ, Rettie AE.** CYP4 enzymes as potential drug targets: Focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω -hydroxylase activities. *Curr Top Med Chem*, **2013**; 13(12):1429-40.
43. **Feletou M.** Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol*, **2009**; 156(4):545-62.
44. **Harder DR, Narayanan J, Gebremedhin D.** Pressure-induced myogenic tone and role of 20-HETE in mediating autoregulation of cerebral blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2011**; 300(5):H1557-65.
45. **Imig JD, Simpkins AN, Renic M, Harder DR.** Cytochrome P450 eicosanoids and cerebral vascular function. *Expert Rev Mol Med*, **2011**; 13:e7.
46. **Kroetz DL, Xu F.** Regulation and inhibition of arachidonic acid omega-hydroxylases and 20-HETE formation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **2005**; 45:413-38.
47. **Miyata N, Roman RJ.** Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res*, **2005**; 41(4):175-93.
48. **Regner KR, Roman RJ.** Role of medullary blood flow in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **2012**; 21(1):33-8.
49. **Roman RJ.** P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*, **2002**; 82(1):131-85.
50. **Roman RJ, Lombard JH.** Does 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid contribute to sex differences in cardiovascular risk by increasing oxidative stress. *Hypertension*, **2007**; 50:37-8.
51. **Seubert JM, Zeldin DC, Nithipatikom K, Gross GJ.** Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2007**; 82(1-4):50-9.
52. **Williams JM, Murphy S, Burke M, Roman RJ.** 20-hydroxyeicosatetraenoic acid: a new target for the treatment of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, **2010**; 56(4):336-44.

53. **Wu CC, Gupta T, Garcia V, Ding Y, Schwartzman ML.** 20-HETE and blood pressure regulation: Clinical implications. *Cardiol Rev*, **2013**; Apr 11.
54. **Wu CC, Schwartzman ML.** The role of 20-HETE in androgen-mediated hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2011**; 96(1-4):45-53.
55. **Zordoky BN, El-Kadi AO.** Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*, **2010**; 125(3):446-63.
56. **Anwar-Mohamed A, Zordoky BN, Aboutabl ME, El-Kadi AO.** Alteration of cardiac cytochrome P450-mediated arachidonic acid metabolism in response to lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation. *Pharmacol Res*, **2010**; 61:410-18.
57. **Theken KN, Schuck RN, Edin ML, Tran B, Ellis K, Bass A, Lih FB, Tomer KB, Poloyac SM, Wu MC, Hinderliter A, Zeldin DC, Stouffer GA, Lee CR.** Evaluation of cytochrome P450-derived eicosanoids in humans with stable atherosclerotic cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, **2012**; 222:530-6.
58. **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 Clin Pharmacol Toxicol*, **2011**; 109:186-94.
59. **Cuez T, Korkmaz B, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Falck J, Malik KU, Tunctan, B.** A Synthetic analog of 20-HETE, 5,14-HEDGE, reverses endotoxin-induced hypotension via increased 20-HETE levels associated with decreased iNOS protein expression and vasodilator prostanoid production in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **2010**; 106:378-88.
60. **Cüez T.** 20-HETE agonisti N-[20-hidroksieikosa-5(Z),14(Z)-dienoil]glisinin endotoksin ile oluşan hipotansiyonu önleyici etkisinin mekanizmasının araştırılması. Doktora tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2010**.
61. **Korkmaz B, Buharalioglu K, Sahan-Firat S, Cuez T, Demiryurek TA, Tunctan B.** Activation of MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway associated with peroxynitrite formation contributes hypotension and vascular hyporeactivity in endotoxemic rats. *Nitric Oxide: Biol Chem*, **2011**; 24:160-12.
62. **Korkmaz B, Cuez T, Buharalioglu CK, Demiryurek AT, Sahan-Firat S, Sari AN, Tunctan B.** Contribution of MEK1/ERK1/2/iNOS pathway to oxidative stress and decreased caspase-3 activity in endotoxemic rats. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, **2012**; 11:243-52.
63. **Korkmaz B, Ozveren E, Buharalioglu, CK, Tunctan B.** Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) contributes to endotoxin-induced hyporeactivity via nitric oxide and prostacyclin production in rat aorta. *Pharmacology*, **2006**; 78:123-28.

64. **Korkmaz B.** Endotoksemik sıçanlarda ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2 ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz yolu aracılıklı vasküler hiporeaktivitenin mekanizmalarının araştırılması. Doktora tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2009**.
65. **Sahan-firat S, Canacankatan N, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Buharalioglu CK, Sari AN, Tunctan B.** Differential regulation of oxidative stress by NO in vascular and nonvascular tissues of endotoxemic rats. *FASEB J*, **2008**; 22:912.24.
66. **Sahan-Firat S, Canacankatan N, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Buharalioglu CK, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Tunctan B.** Increased production of nitric oxide mediates selective organ-specific effects of endotoxin on oxidative stress. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, **2012**; 11:61-72.
67. **Sahan-Firat S, Korkmaz B, Cuez T, Ayaz L, Tamer L, Buharalioglu CK, Sari AN, Tunctan B.** Prostaglandins contribute to endotoxin-induced increase in lipid peroxidation via nitric oxide production during endotoxemia in rats. *FASEB J*, **2009**; 23:B368.
68. **Tunctan B, Altug S, Uludag O, Abacioglu, N.** Time-dependent variations in serum nitrite, 6-keto-prostaglandin F1 α and thromboxane B2 levels induced by lipopolysaccharide in mice. *Biol Rhythm Res*, **2000**; 499-514.
69. **Tunctan B, Altug S, Uludag O, Demirkay B, Abacioglu N.** Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. *Pharmacol Res*, **2003**; 48:37-48.
70. **Tunctan B, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Atik U, Buharalioglu C.** Increased production of nitric oxide contributes to renal oxidative stress in endotoxemic rat. *Am J Infect Dis*, **2005**; 1:111-5.
71. **Tunctan B, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Atik U, Buharalioglu C.** Reversal of endotoxin-induced hypotension by inhibition of inducible nitric oxide synthase activity is associated with improved oxidative status in rat heart, aorta and mesenteric artery. *Turkish J Med Sci*, **2006**; 36:71-80.
72. **Tunctan B, Yaghini FA, Estes A, Malik KU.** Inhibition by nitric oxide and cyclooxygenase of cytochrome P450 4A expression and activity contributes to endotoxin-induced hypotension in rats. *Nitric Oxide*, **2006**; 14:51-7.
73. **Tunctan B, Korkmaz B, Dogruer ZN, Tamer L, Atik U, Buharalioglu CK.** Inhibition of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activity reverses endotoxin-induced hypotension via decreased nitric oxide production in rats. *Pharmacol Res*, **2007**; 56:56-64.
74. **Tunctan B, Yaghini FA, Estes A, Malik KU.** Prostaglandins inhibit cytochrome P450 4A activity and contribute to endotoxin-induced hypotension in rats via nitric oxide production. *Arch Pharm Res*, **2008**; 31:856-65.
75. **Tunctan B, Korkmaz B, Buharalioglu C, Sahan Firat S, Anjaiah S, Falck J, Roman RJ, Malik KU.** A 20-HETE agonist, N-[20-hydroxyeicosa-5(Z),14(Z)-dienoyl]glycine, opposes the fall in blood pressure and vascular reactivity in endotoxin-treated rats. *Shock*, **2008**; 30:329-35.

76. **Tunctan B, Korkmaz B, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Anjaiah S, Falck JR, Yildirim H, Tamer L, Roman RJ, Malik KU.** 20-HETE agonist, N-[20-hydroxyeicosa-5(Z),14(Z)-dienoyl]glycine, opposes the endotoxin-induced fall in blood pressure and the decrease in vascular reactivity and lipid peroxidation and increased catalase activity via inhibition of NO production in rats. *FASEB J*, **2008**; 22:1128.1
77. **Tunctan B, Cüez T, Korkmaz B, Şahan Fırat S, Buharaloğlu CK, Yıldırım H, Sarı AN, Tamer L, Falck J, Malik KU.** Endotoksemik sıçanlarda NO oluşumundaki artmaya 20-HETE düzeylerindeki azalmanın eşlik ettiği oksidatif stres ve inflamasyon üzerinde yapay bir 20-HETE analogu olan N-[20-Hidroksieikosa-5(Z),14(Z)-Dienoil]Glisinin etkisi. XX. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Kızılağaç, Manavgat, Antalya, **2009**:141.
78. **Tunctan B, Korkmaz B, Cuez T, Sahan-Firat S, Yildirim H, Tamer L, Buharalioglu K, Falck JR, Malik KU.** Increased production of 20-HETE contributes to the effects of COX inhibitors to prevent the decrease in lipid peroxidation and increase in catalase activity during endotoxemia. *FASEB J*, **2009**; 23:37.13.
79. **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 Clin Pharmacol Toxicol*, **2010**; 107:877-82.
80. **Tunctan B, Korkmaz B, Cuez T, Sari AN, Kacan M, Gilik D, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Schunck WH, Serin MS, Falck JR, Malik KU.** Contribution of iNOS, COX-2 and CYP4A1 to the protective effect of a synthetic analog of 20-HETE, 5,14-HEDGE, against endotoxin-induced hypotension and mortality in experimental model of septic shock in rats and mice. *Inflam Res*, **2011**; 60:S55.
81. **Tunctan B, Korkmaz B, Sarı AN, Kacan M, Gilik U, Serin MS, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Cuez T, Schunck WH, Falck JR, Malik KU.** A synthetic analog of 20-HETE, 5,14-HEDGE, reverses endotoxin-induced hypotension and mortality via increased expression and activities of CYP4A1 and CYP2C23 in a rodent model of septic shock: contribution of MEK1/ERK1/2/IKK β /I κ B- α /NF- κ B pathway and soluble epoxide hydrolase. The 1st Central and Eastern European Conference on Sepsis. Budapest, **2012**:158-9.
82. **Tunctan B, Sari AN, Kacan M, Gilik D, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Korkmaz B, Falck J, Malik KU.** NS-398, a selective COX-2 inhibitor, reverses endotoxin-induced hypotension via increased CYP4A1 expression and 20-HETE levels associated with decreased COX-2 and iNOS expression and/or activity in a rat model of septic shock. The 14th International Winter Eicosanoid Conference. Baltimore, Maryland, US, **2012**; 29.
83. **Tunctan B, Korkmaz B, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Serin MS, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Cuez T, Schunck WH, Manthathi VL, Falck JR, Malik KU.** Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91phox to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. *Nitric Oxide*, **2013**; 33:18-41.

84. **Tunctan B, Korkmaz B, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Serin MS, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Cuez T, Schunck WH, Falck JR, Malik KU.** 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, reverses hypotension and improves survival in a rodent model of septic shock: Contribution of soluble epoxide hydrolase, CYP2C23, MEK1/ERK1/2/IKK β /I κ B- α /NF- κ B pathway, and proinflammatory cytokine formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2013**; 102-103:31-41.
85. **Tunctan B, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Korkmaz B, Falck J, Malik KU.** NS-398 reverses hypotension in endotoxemic rats: Contribution of eicosanoids, NO, and peroxynitrite. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2013**;104-105:93-108.
86. **Perez J, Dellinger P.** *Sepsis definitions*. In: Eichacker PQ, Pugin J. Eds. *Evolving Concepts in Sepsis and Septic Shock*. ABD: Kluwer Academic Publishers, **2001**:1-15.
87. **Thijs LG, Dhainaut J-F.** Definitions and epidemiology. In: Dhainaut JF, Thijs LG, Park G. Eds. *Septic Shock*, Philadelphia: WB Saunders, **2000**:3-18.
88. **Vincent JL.** Clinical sepsis and septic shock-definition, diagnosis and management principles. *Langenbecks Arch Surg*, **2008**; 393(6):817-24.
89. **Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen, D. Scand.** Cytokine cascade in sepsis. *J. Infect. Dis*, **2003**; 35(9):535-44.
90. **Martin JB, Wheeler AP.** Approach to the patient with sepsis. *Clin Chest Med*, **2009**; 30:1-16.
91. **Morrell MR, Micek ST, Kollef MH.** The management of severe sepsis and septic shock. *Infect Dis Clin North Am*, **2009**; 23:485-501.
92. **Silva E, Passos Rda H, Ferri MB, de Figueiredo LF.** Sepsis: from bench to bedside. *Clinics (Sao Paulo)*, **2008**; 63(1):109-20.
93. **Sutton SS.** Sepsis and septic shock. In: Chisholm-Burns MA, Wells BG, Schwinghammer TL, Malone PM, Kolesar JM, Rotschafer JC, Dipiro JT. Eds. *Pharmacotherapy: Principles & Practice*. ABD: The McGraw-Hill Companies, Inc., **2008**: 1185-97.
94. **Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R, Lepage E, Le Gall R.** Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*, **2002**; 28(2):108-21.
95. **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(7):1303-10.

96. **Bernard GR, Margolis BD, Shanies HM, Ely EW, Wheeler AP, Levy H, Wong K, Wright TJ.** Extended evaluation of recombinant human activated protein C United States Trial (ENHANCE US): a single-arm, phase 3B, multicenter study of drotrecogin alfa (activated) in severe sepsis. *Chest*, **2004**; 125(6):2206-16.
97. **Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL.** Occurrence and outcomes of sepsis: influence of race. *Crit Care Med*, **2007**; 35(3):763-8.
98. **Lin MT, Albertson TE.** Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med*, **2004**; 3(2):569-79.
99. **Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M,** TLR-signaling networks: An integration of adaptor molecules, kinases and cross-talk. *J Dent Res*, **2011**; 90:417-27.
100. **Gao H, Evans TW, Finney S.** Bench-to-bedside review: sepsis, severe sepsis and septic shock - does the nature of the infecting organism matter? *J Crit Care*, **2008**; 12(3):213.
101. **Gustot, T.** Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care*, **2011**; 17(2):153-9.
102. **Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, Fine J, Krichevsky A, Delude RL, Angus DC.** GenIMS Investigators. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the genetic and inflammatory markers of sepsis (GenIMS) study. *Arch Intern Med*, **2007**; 167(15):1655-63.
103. **Latto C.** An overview of sepsis. *Dimens Crit Care Nurs*, **2008**; 27(5):195-200.
104. **Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, Perez P, Meziani F.** Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med*, **2010**; 36(12): 2019-29.
105. **Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS.** LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, **2008**; 42(2):145-51.
106. **Martins PS, Brunialti MK, da Luz Fernandes M, Martos LS, Gomes NE, Rigato O, Salomao R.** Bacterial recognition and induced cell activation in sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **2006**; 6(2):183-91.
107. **Nduka OO, Parrillo JE.** The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Nurs Clin North Am*, **2011**; 23(1):41-66.
108. **Opal SM.** Endotoxins and other sepsis triggers. *Contrib Nephrol*, **2010**; 167:14-24.
109. **Rudiger A, Stotz M, Singer M.** Cellular processes in sepsis. *Swiss Med Wkly*, **2008**; 138(43-44):629-34.

- 110. Appelmelk BJ, Lynn WA.** The cause of sepsis: bacterial cell components that trigger the cytokine cascade. In: Dhainaut JF, Thijs LG, Park G. Eds. *Septic shock*, 1st Ed. Çin: W.B Saunders Co, **2000**:21-6.
- 111. Draing C, Sigel S, Deininger S, Traub S, Munke R, Mayer C, Hareng L, Hartung T, von Aulock S, Hermann C.** Cytokine induction by Gram-positive bacteria. *Immunobiology*, **2008**; 213:285-96.
- 112. Inagawa H, Kohchi C, Soma G.** Oral administration of lipopolysaccharides for the prevention of various diseases: benefit and usefulness. *Anticancer Res*, **2011**; 31(7):2431-6.
- 113. Majcherczyk PA, Langen H, Heumann D, Fountoulakis M, Glauser MP, Moreillon P.** Digestion of streptococcus pneumoniae cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity. *Biol Chem*, **1999**; 274(18):12537-43.
- 114. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H.** Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, **1994**; 8:217-25.
- 115. Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K.** Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem*, **2000**; 267(10):3032-9.
- 116. Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC.** Regulation and function of TPL-2, an IκB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res*, **2011**; 21(1):131-45.
- 117. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB.** Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*, **2010**; 1799(10-12):775-87.
- 118. Landstrom M.** The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, **2010**; 42(5):585-9.
- 119. Li X, Jiang S, Tapping RI.** Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*, **2010**; 49:1-9.
- 120. Liu S, Chen ZJ.** Expanding role of ubiquitination in NF-κB signaling. *Cell Res*, **2011**; 21(1):6-21.
- 121. Liu SF, Malik AB.** NFκ-B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol*, **2006**; 290:622-45.
- 122. Oeckinghaus A, Ghosh S.** The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2009**; 1(4):a000034.
- 123. Park SH, Kim ND, Jung JK, Lee CK, Han SB, Kim Y.** Myeloid differentiation 2 as a therapeutic target of inflammatory disorders. *Pharmacol Ther*, **2012**; 133:291-8.

124. **Wertz IE, Dixit VM.** Signaling to NF- κ B: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2010**; 2(3):a003350.
125. **Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Laterre PF.** Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators Inflamm*, **2010**; 2010:568396.
126. **Baldwin AS Jr.** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, **1996**; 14:649-83.
127. **Karin M, Ben-Neriah Y.** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, **2000**;18:621-63.
128. **Siebenlist U, Franzoso G, Brown K.** Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, **1994**; 10:405-55.
129. **Bonizzi G, Bebién M, Otero DC, Johnson-Vroom KE, Cao Y, Vu D, Jegga AG, Aronow BJ, Ghosh G, Rickert RC, Karin M.** Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J*, **2004**; 23(21):4202-10.
130. **Moorthy AK, Ghosh G.** p105.Ikappa B gamma and prototypical Ikappa Bs use a similar mechanism to bind but a different mechanism to regulate the subcellular localization of NF-kappa B. *J Biol Chem*, **2003**; 278(1):556-66.
131. **Yamazaki S, Muta T, Takeshige K.** A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem*, **2001**; 276(29):27657-62.
132. **Carrasco D, Ryseck RP, Bravo R.** Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development*, **1993**; 118(4):1221-31.
133. **Ghosh S, Karin M.** Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **2002**; 109(Suppl):S81-96.
134. **Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S.** The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell*, **2002**; 9(3):625-36.
135. **Marienfeld R, May MJ, Berberich I, Serfling E, Ghosh S, Neumann M.** RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem*, **2003**; 278(22):19852-60.
136. **Haddad JJ, Abdel-Karim NE.** NF- κ B cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: therapeutic pattern or pseudoregulation? *Cell Immunol*, **2011**; 271(1):5-14.
137. **Hayden MS, Ghosh S.** Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, **2008**;132(3):344-62.

138. **Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A.** NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*, **2010**; 21(8):1254-62.
139. **Schmid JA, Birbach A.** IkappaB kinase beta (Ikkbeta/IKK2/IKBKB)-A key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2008**; 19:157-65.
140. **Sun SC.** Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res*, **2011**; 21(1):71-85.
141. **Wan F, Lenardo MJ.** The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res*, **2010**; 20:24-33.
142. **Razani B, Reichardt AD, Cheng G.** Non-canonical NF-kappaB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev*, **2011**; 44:44-54.
143. **Baeuerle PA, Baichwal VR.** NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol*, **1997**; 65:111-37.
144. **Eto A, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K.** Essential roles for NF-kappa B and a Toll/IL-1 receptor domain-specific signal(s) in the induction of I kappa B-zeta. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**; 301(2):495-501.
145. **Inoue J, Kerr LD, Kakizuka A, Verma IM.** I kappa B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B: a new member of the I kappa B family. *Cell*, **1992**; 68(6):1109-20.
146. **Ito T, Morimatsu M, Oonuma T, Shiina T, Kitamura H, Syuto B.** Transcriptional regulation of the MAIL gene in LPS-stimulated RAW264 mouse macrophages. *Gene*, **2004**; 342(1):137-43.
147. **Thanos D, Maniatis T.** NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell*, **1995**; 80(4):529-32.
148. **Fan C, Li Q, Zhang Y, Liu X, Luo M, Abbott D, Zhou W, Engelhardt JF.** IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation. *J Clin Invest*, **2004**; 113(5):746-55.
149. **Kitamura H, Kanehira K, Okita K, Morimatsu M, Saito M.** MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett*, **2000**; 485(1):53-6.
150. **Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D.** The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*, **2002**; 298(5596):1241-45.
151. **Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A.** IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*, **1997**; 278(5339):860-6.

- 152. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M.** The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, **1997**; 91(2):243-52.
- 153. Hacker H, Karin M.** Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*, **2006**; 2006(357):re13.
- 154. Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M.** IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, **1998**; 395(6699):297-300.
- 155. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israël A.** Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*, **1998**; 93(7):1231-40.
- 156. Hayden MS, Ghosh S.** Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **2004**; 18(18):2195-2224.
- 157. Perkins ND.** Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2007**; 8(1):49-62.
- 158. Perkins ND, Gilmore TD.** Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*, **2006**; 13(5):759-72.
- 159. Solt LA, Madge LA, Orange JS, May MJ.** Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *J Biol Chem*, **2007**; 282(12):8724-33.
- 160. Gloire G, Dejardin E, Piette J.** Extending the nuclear roles of IkappaB kinase subunits. *Biochem Pharmacol*, **2006**; 72(9):1081-89.
- 161. Yong Y, Choi SW, Choi HJ, Nam HW, Kim JA, Jeong DU, Kim DY, Kim YS, Kim DW.** Exogenous signal-independent nuclear IkappaB kinase activation triggered by Nkx3.2 enables constitutive nuclear degradation of IkappaB-alpha in chondrocytes. *Mol Cell Biol*, **2011**; 31(14):2802-16.
- 162. Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, Ogura Y, Nunez G.** An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem*, **2000**; 275(36):27823-31.
- 163. Tegethoff S, Behlke J, Scheidereit C.** Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, **2003**; 23(6):2029-41.
- 164. Chen LF, Greene WC.** Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2004**; 5(5):392-401.

- 165. Jiang X, Takahashi N, Matsui N, Tetsuka T, Okamoto T.** The NF-kappa B activation in lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J Biol Chem*, **2003**; 278(2):919-26.
- 166. Mattioli I, Sebald A, Bucher C, Charles RP, Nakano H, Doi T, Kracht M, Schmitz ML.** Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. *J Immunol*, **2004**; 172(10):6336-44.
- 167. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W.** IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem*, **1999**; 274(43):30353-56.
- 168. Yang F, Tang E, Guan K, Wang CY.** IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J Immunol*, **2003**; 170(11):5630-5.
- 169. Beinke S, Robinson MJ, Hugunin M, Ley SC.** Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Mol Cell Biol*, **2004**; 24(21):9658-67.
- 170. Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS Jr.** Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem*, **2000**; 275(42):32592-97.
- 171. Yang J, Fan GH, Wadzinski BE, Sakurai H, Richmond A.** Protein phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA. *J Biol Chem*, **2001**; 276(51):47828-33.
- 172. Chen LF, Fischle W, Verdin E, Greene WC.** Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*, **2001**; 293(5535):1653-7.
- 173. Chen LF, Mu Y, Greene WC.** Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J*, **2002**; 21(23):6539-48.
- 174. Yang XD, Huang B, Li M, Lamb A, Kelleher NL, Chen LF.** Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit. *EMBO J*, **2009**; 28(8):1055-66.
- 175. Chew J, Biswas S, Shreeram S, Humaidi M, Wong ET, Dhillon MK, Teo H, Hazra A, Fang CC, Lopez-Collazo E, Bulavin DV, Tergaonkar V.** WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling. *Nat Cell Biol*, **2009**; 11(5):659-66.
- 176. Dyson HJ, Komives EA.** Role of disorder in Ikb-NFkappaB interaction. *IUBMB Life*, **2012**; 64(6):499-505.
- 177. Israel A.** The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2010**; 2(3):a000158.

- 178. Nolan GP, Ghosh S, Liou HC, Tempst P, Baltimore D.** DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell*, **1991**; 64(5):961-969.
- 179. Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R, Schmid JA.** Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem*, **2002**; 277(13):10842-51.
- 180. Huang TT, Kudo N, Yoshida M, Miyamoto S.** A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalph controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalph complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2000**; 97(3):1014-9.
- 181. Johnson C, Van Antwerp D, Hope TJ.** An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalph. *EMBO J*, **1999**; 18(23):6682-93.
- 182. Shirakawa F, Mizel SB.** In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biol*, **1989**; 9(6):2424-30.
- 183. Köhler M, Ansieau S, Prehn S, Leutz A, Haller H, Hartmann E.** Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett*, **1997**; 417(1):104-8.
- 184. Köhler M, Speck C, Christiansen M, Bischoff FR, Prehn S, Haller H, Görlich D, Hartmann E.** Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol*, **1999**; 19(11):7782-91.
- 185. Weiss K.** Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **2003**; 112(4):441-51.
- 186. Fagerlund R, Kinnunen L, Köhler M, Julkunen I, Melen K.** NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4. *J Biol Chem*. **2005**; 280(16):15942-51.
- 187. Fagerlund R, Melén K, Cao X, Julkunen I.** NF-kappaB p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin alpha molecules. *Cell Signal*, **2008**; 20(8):1442-51.
- 188. Theiss AL, Jenkins AK, Okoro NI, Klapproth JM, Merlin D, Sitaraman SV.** Prohibitin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor-kappa B nuclear translocation via the novel mechanism of decreasing importin alpha3 expression. *Mol Biol Cell*, **2009**; 20(20):4412-23.
- 189. Chen Y, Vallee S, Wu J, Vu D, Sondek J, Ghosh G.** Inhibition of NF-kappaB activity by IkappaBbeta in association with kappaB-Ras. *Mol Cell Biol*, **2004**; 24(7):3048-56.
- 190. Harhaj EW, Sun SC.** Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Mol Cell Biol*, **1999**; 19(10):7088-95.

- 191. Zerfaoui M, Errami Y, Naura AS, Suzuki Y, Kim H, Ju J, Liu T, Hans CP, Kim JG, Abd Elmageed ZY, Koochekpour S, Catling A, Boulares AH.** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a determining factor in Crml-mediated nuclear export and retention of p65 NF-kappa B upon TLR4 stimulation. *J Immunol*, **2010**; 185(3):1894-902.
- 192. Abd Elmageed ZY, Naura AS, Errami Y, Zerfaoui M.** The poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs): new roles in intracellular transport. *Cell Signal*, **2012**; 24(1):1-8.
- 193. Sudhahar V, Shaw S, Imig JD.** Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. *Curr Med Chem*, **2010**; 17:181-90.
- 194. Van der Heiden, K., Cuhlmann, S., Luong le, A., Zakkar, M., Evans, P.C.** Role of nuclear factor kappab in cardiovascular health and disease. *Clin Sci*, **2010**; 118:593-605.
- 195. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D.** A Role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J Pharmacol Exp Ther*, **2006**; 319:73-81.
- 196. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D.** Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, **2001**; 53:135-59.
- 197. Flora SJ.** Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol*, **2007**; 53(1):1-2.
- 198. Sakaguchi S, Furusawa S.** Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2006**; 47(2):167-77.
- 199. Salvemini D, Cuzzocrea, S.** Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med*, **2002**; 33:1173-85.
- 200. Tunctan B.** Biology of nitric oxide, nitric oxide synthase inhibitors: From animal studies to clinical implications. In: Tunctan B, Cuzzocrea S, Yokoyama M Eds *Transworld Research Network*, India: Kerala, **2012**:9.
- 201. Carney DE, Matsushima K, Frankel HL.** Treatment of sepsis in the surgical intensive care unit. *Isr Med Assoc J*, **2011**; 13(11):694-9.
- 202. Cohen J.** Non-antibiotic strategies for sepsis. *Clin Microbiol Infect*, **2009**; 15:302-7.
- 203. Cross AS, Opal SM.** A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann Intern Med*, **2003**; 138(6):502-5.
- 204. De Backer D.** Treatment of shock. *Acta Clin Belg*, **2011**; 66(6):438-42.

- 205. Havel C, Arrich J, Losert H, Gamper G, Müllner M, Herkner H.** Vasopressors for hypotensive shock. *Cochrane Database Syst Rev*, **2011**; (5):CD003709.
- 206. Kanji Z, Dumaresque C.** Time to effective antibiotic administration in adult patients with septic shock: a descriptive analysis. *Intensive Crit Care Nurs*, **2012**; 28(5):288-93.
- 207. May CN, Calzavacca P, Ishikawa K, Langenberg C, Wan L, Ramchandra R, Bellomo R.** Novel targets for sepsis-induced kidney injury: the glomerular arterioles and the sympathetic nervous system. *Exp Physiol*, **2012**; 97(11):1168-77.
- 208. Patel GP, Balk RA.** Systemic steroids in severe sepsis and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, **2012**; 185(2):133-9.
- 209. Puskarich MA.** Emergency management of severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care*, **2012**; 18(4):295-300.
- 210. Rivers EP, Katranji M, Jaehne KA, Brown S, Abou Dagher G, Cannon C, Coba V.** Early interventions in severe sepsis and septic shock: a review of the evidence one decade later. *Minerva Anesthesiol*, **2012**; 78(6):712-24.
- 211. Yarema TC, Yost S.** Low-dose corticosteroids to treat septic shock: a critical literature review. *Crit Care Nurse*, **2011**; 31(6):16-26.
- 212. Sacerdoti D, Gatta A, McGiff JC.** Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2003**; 72(1-2):51-71.
- 213. Fleming I.** Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res*, **2001**; 89:753-62.
- 214. Medhora M, Dhanasekaran A, Gruenloh SK, Dunn LK, Gabrilovich M, Falck JR, Harder DR, Jacobs ER, Pratt PF.** Emerging mechanisms for growth and protection of the vasculature by cytochrome P450-derived products of arachidonic acid and other eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2007**; 82:19-29.
- 215. Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Huang DD, Falck JR, McGiff JC.** Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides. *Am J Physiol*, **1996**; 271(4Pt2):R863-9.
- 216. Croft KD, McGiff JC, Sanchez-Mendoza A, Carroll MA.** Angiotensin II releases 20-HETE from rat renal microvessels. *Am J Physiol*, **2000**; 279(3):F544-51.
- 217. Oyekan A, Balazy M, McGiff JC.** Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol*, **1997**; 273(1Pt2):R293-300.
- 218. Oyekan AO, McGiff JC.** Cytochrome P-450-derived eicosanoids participate in the renal functional effects of ET-1 in the anesthetized rat. *Am J Physiol*, **1998**; 274(1Pt2):R52-61.

219. Muthalif MM, Uddin MR, Fatima S, Parmentier JH, Khandekar Z, Malik KU. Small GTP binding protein Ras contributes to norepinephrine-induced mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2001**; 65(1):33-43.
220. Uddin MR, Muthalif MM, Karzoun NA, Benter IF, Malik KU. Cytochrome P-450 metabolites mediate norepinephrine-induced mitogenic signaling. *Hypertension*, **1998**; 31(1 Pt 2):242-7.
221. Cambj-Sapunar L, Yu M, Harder DR, Roman RJ. Contribution of 5-hydroxytryptamine_{1B} receptors and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid to fall in cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, **2003**; 34(5):1269-75.
222. Escalante B, Omata K, Sessa W, Lee SG, Falck JR, Schwartzman ML. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endothelium-dependent vasoconstrictor in rabbit arteries. *Eur J Pharmacol*, **1993**; 235:1-7.
223. Escalante B, Sessa WC, Falck JR, Yadagiri P, Schwartzman ML. Vasoactivity of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid is dependent on metabolism by cyclooxygenase. *J Pharmacol Exp Ther*, **1989**; 248:229-32.
224. Randriamboavonjy V, Busse R, Fleming I. 20-HETE-induced contraction of small coronary arteries depends on the activation of Rho-kinase. *Hypertension*, **2003**; 41:801-6.
225. Schwartzman ML, Falck JR, Yadagiri P, Escalante B. Metabolism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid by cyclooxygenase: formation and identification of novel endothelium-dependent vasoconstrictor metabolites. *J Biol Chem*, **1989**; 264:11658-62.
226. Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR, Roman RJ. 20-HETE is an endogenous inhibitor of the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal arterioles. *Am J Physiol*, **1996**; 270:R228-37.
227. Lange A, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder D. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase C. *J Biol Chem*, **1997**; 272:27345-52.
228. Nowicki S, Chen SL, Aizman O, Cheng XJ, Li D, Nowicki C, Nairn A, Greengard P, Aperia A. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20 HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of renal Na⁺,K⁺-ATPase. *J Clin Invest*, **1997**; 99:1224-30.
229. Obara K, Koide M, Nakayama K. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid potentiates stretch-induced contraction of canine basilar artery via PKC alpha-mediated inhibition of K_{Ca} channel. *Br J Pharmacol*, **2002**; 137:1362-70.
230. Sun CW, Falck JR, Harder DR, Roman RJ. Role of tyrosine kinase and PKC in the vasoconstrictor response to 20-HETE in renal arterioles. *Hypertension*, **1999**; 33:414-8.

231. Akbulut T, Regner KR, Roman RJ, Avner ED, Falck JR, Park F. 20-HETE activates the Raf/MEK/ERK pathway in renal epithelial cells through an EGFR- and C-Src-dependent mechanism. *Am J Physiol*, **2009**; 297:F662-70.
232. Ponnoth DS, Nayeem MA, Kunduri SS, Tilley SL, Zeldin DC, Ledent C, Mustafa SJ. Role of ω -hydroxylase in adenosine-mediated aortic response through MAP kinase using A2A-receptor knockout mice. *Am J Physiol*, **2012**; 302:R400-8.
233. Gebremedhin D, Lange AR, Narayanan J, Aebly MR, Jacobs ER, Harder DR. Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-Type Ca²⁺ current. *J Physiol*, **1998**; 507:771-81.
234. Basora N, Boulay G, Bilodeau L, Rousseau E, Payet MD. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem*. **2003**; 278(34):31709-16.
235. Brayden JE, Earley S, Nelson MT, Reading S. Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **2008**; 35(9):1116-20.
236. Alonso-Galicia M, Drummond HA, Reddy KK, Falck JR, Roman RJ. Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. *Hypertension*, **1997**; 29(1Pt 2):320-5.
237. Alonso-Galicia M, Hudetz AG, Shen H, Harder DR, Roman RJ. Contribution of 20-HETE to vasodilator actions of nitric oxide in the cerebral microcirculation. *Stroke*, **1999**; 30:2727-34.
238. Lopez B, Moreno C, Salom MG, Roman RJ, Fenoy FJ. Role of guanylyl cyclase and cytochrome P-450 on renal response to nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2001**; 281(3):F420-F7.
239. Oyekan AO, McGiff JC. Functional response of the rat kidney to inhibition of nitric oxide synthesis: role of cytochrome p450-derived arachidonate metabolites. *Br J Pharmacol*. **1998**;125(5):1065-73.
240. Sun CW, Alonso-Galicia M, Taheri MR, Falck JR, Harder DR, Roman RJ. Nitric oxide-20-hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K⁺ channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circ Res*, **1998**; 83(11):1069-79.
241. Botros FT, Laniado-Schwartzman M, Abraham NG. Regulation of cyclooxygenase- and cytochrome p450-derived eicosanoids by heme oxygenase in the rat kidney. *Hypertension*, **2002**; 39(2Pt 2):639-44.
242. Coceani F, Kelsey L, Seidlitz E, Korzekwa K. Inhibition of the contraction of the ductus arteriosus to oxygen by 1-aminobenzotriazole, a mechanism-based inactivator of cytochrome P450. *Br J Pharmacol*, **1996**; 117(7):1586-92.

- 243. Hoagland KM, Maier KG, Roman RJ.** Contributions of 20-HETE to the antihypertensive effects of Tempol in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, **2003**; 41(3 Pt 2):697-702.
- 244. Alonso-Galicia M, Sun CW, Falck JR, Harder DR, Roman RJ.** Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries. *Am J Physiol*, **1998**; 275:F370-8.
- 245. Carroll MA, Capparelli MF, Doumand AB, Cheng MK, Jiang H, McGiff JC.** Renal vasoactive eicosanoids: Interactions between cytochrome P450 and cyclooxygenase metabolites during salt depletion. *Am J Hypertens*, **2001**; 14:159A.
- 246. Carroll MA, Garcia MP, Falck JR, McGiff JC.** Cyclooxygenase dependency of the renovascular actions of cytochrome P450-derived arachidonate metabolites. *J Pharmacol Exp Ther*, **1992**; 260, 104-9.
- 247. Fang X, Faraci FM, Kaduce TL, Harmon S, Modrick ML, Hu S, Moore SA, Falck JR, Weintraub NL, Spector AA.** 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is a potent dilator of mouse basilar artery: Role of cyclooxygenase. *Am J Physiol*, **2006**; 291:H2301-7.
- 248. Pratt PF, Falck JR, Reddy KM, Kurian JB, Campbell WB.** 20-HETE relaxes bovine coronary arteries through the release of prostacyclin. *Hypertension*, **1998**; 31:237-41.
- 249. Yu M, McAndrew RP, Al-Saghir R, Maier KG, Medhora M, Roman RJ, Jacobs ER.** Nitric oxide contributes to 20-HETE-induced relaxation of pulmonary arteries. *J Appl Physiol*, **2002**; 93(4):1391-9.
- 250. Harris MB, Blackstone MA, Ju H, Venema VJ, Venema RC.** Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release. *Am J Physiol*, **2003**; 285:H333-40.
- 251. Ilangovan G, Osinbowale S, Bratasz A, Bonar M, Cardounel AJ, Zweier JL, Kuppusamy P.** Heat shock regulates the respiration of cardiac H9c2 cells through upregulation of nitric oxide synthase. *Am J Physiol*, **2004**; 287:C1472-81.
- 252. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY.** Protein interactions with nitric oxide synthases: Controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol*, **2003**; 285:F178-90.
- 253. Novoselova EG, Glushkova OV, Cherenkov DA, Parfenyuk SB, Novoselova TV, Lunin SM, Khrenov MO, Guzhova IV, Margulis BA, Fesenko EE.** Production of heat shock proteins, cytokines, and nitric oxide in toxic stress. *Biochemistry*, **2006**; 71:376-83.
- 254. Venema RC, Venema VJ, Ju H, Harris MB, Snead C, Jilling T, Dimitropoulou C, Maragoudakis ME, Catravas JD.** Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am J Physiol*, **2003**; 285:H669-78.

- 255. Vo PA, Lad B, Tomlinson JA, Francis S, Ahluwalia A.** Autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. *J Biol Chem*, **2004**; 280:7236-43.
- 256. Yoshida M, Xia Y.** Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, **2003**; 278:36953-8.
- 257. Chen Y, Medhora M, Falck JR, Pritchard KA Jr, Jacobs ER.** Mechanisms of activation of eNOS by 20-HETE and VEGF in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol*, **2006**; 291:L378-85.
- 258. Wang JS, Singh H, Zhang F, Ishizuka T, Deng H, Kemp R, Wolin MS, Hintze TH, Abraham NG, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M.** Endothelial dysfunction and hypertension in rats transduced with CYP4A2 adenovirus. *Circ Res*, **2006**; 98:962-9.
- 259. Singh H, Cheng J, Deng H, Kemp R, Ishizuka T, Nasjletti A, Schwartzman ML.** Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension. *Hypertension*, **2007**; 50:123-9.
- 260. Guo AM, Arbab AS, Falck JR, Chen P, Edwards PA, Roman RJ, Scicli AG.** Activation of VEGF through ROS mediates 20-HETE-induced endothelial cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther*, **2007**; 321:18-27.
- 261. Cheng J, Wu CC, Gotlinger KH, Zhang F, Falck JR, Narsimhaswamy D, Schwartzman ML.** 20-Hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid mediates endothelial dysfunction via IKappaB kinase-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling. *J Pharmacol Exp Ther*, **2010**; 332:57-65.
- 262. Ishizuka T, Cheng J, Singh H, Vitto MD, Manthathi VL, Falck JR, Laniado-Schwartzman M.** 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **2008**; 324(1):103-10.
- 263. Mitchell SR, Sewer MB, Kardar SS, Morgan ET.** Characterization of CYP4A induction in rat liver by inflammatory stimuli: dependence on sex, strain, and inflammation-evoked hypophagia. *Drug Metab Dispos*, **2001**; 29(1):17-22.
- 264. Renton KW, Nicholson TE.** Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **2000**; 294(2):524-30.
- 265. Sewer MB, Koop DR, Morgan ET.** Endotoxemia in rats is associated with induction of the P4504A subfamily and suppression of several other forms of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos*, **1996**; 24(4):401-7.
- 266. Sewer MB, Morgan ET.** Down-regulation of the expression of three major rat liver cytochrome P450S by endotoxin in vivo occurs independently of nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther*, **1998**; 287(1):352-8.

- 267. Takemura S, Minamiyama Y, Imaoka S, Funae Y, Hirohashi K, Inoue M, Kinoshita H.** Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J Hepatol*, **1999**; 30(6):1035-44.
- 268. Sewer MB, Koop DR, Morgan ET.** Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P-450 expression. *J Pharmacol Exp Ther*, **1997**; 280(3):1445-54.
- 269. Khatsenko O, Kikkawa Y.** Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther*, **1997**; 280(3):1463-70.
- 270. Khatsenko OG, Boobis AR, Gross SS.** Evidence for nitric oxide participation in down-regulation of CYP2B1/2 gene expression at the pretranslational level. *Toxicol Lett*, **1997**; 90(2-3):207-16.
- 271. Morgan ET, Li-Masters T, Cheng PY.** Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology*, **2002**;181-182:207-10.
- 272. Wang MH, Wang J, Chang HH, Zand BA, Jiang M, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M.** Regulation of renal CYP4A expression and 20-HETE synthesis by nitric oxide in pregnant rats. *Am J Physiol*, **2003**; 285(2):F295-302.
- 273. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **1993**; 75(5):843-54.
- 274. Olsen PH, Ambros V.** The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*, **1999**; 216(2):671-80.
- 275. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.** The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **2000**; 403(6772):901-6.
- 276. Lee HJ.** Exceptional stories of microRNAs. *Exp Biol Med*, **2013**; 238(4):339-43.
- 277. Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM.** Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*, **2002**; 16(19):2491-6.
- 278. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC.** Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, **2001**; 106(1):23-34.
- 279. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ.** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **2000**; 404(6775):293-6.
- 280. Mello CC, Conte D Jr.** Revealing the world of RNA interference. *Nature*, **2004**; 431(7006):338-42.

- 281. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP.** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **2000**; 101(1):25-33.
- 282. Zeng Y, Yi R, Cullen BR.** MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**; 100(17):9779-84.
- 283. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R.** MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2008**; 105(5):1608-13.
- 284. Hafner M, Ascano M Jr, Tuschl T.** New insights in the mechanism of microRNA-mediated target repression. *Nat Struct Mol Biol*, **2011**; 18(11):1181-2.
- 285. Zekri L, Kuzuoglu-Ozturk D, Izaurralde E.** GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J*, **2013**; 32(7):1052-65.
- 286. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R.** MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, **2005**; 7(7):719-23.
- 287. Molnar A, Melnyk C, Baulcombe DC.** Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biol*, **2011**; 12(1):215.
- 288. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **2001**; 411(6836):494-8.
- 289. Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND, Wolfe SA, Giraldez AJ.** A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*, **2010**; 328(5986):1694-8.
- 290. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ.** A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, **2010**; 465(7298):584-9.
- 291. Krol J, Loedige I, Filipowicz W.** The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, **2010**; 11(9):597-610.
- 292. Stefani G, Slack FJ.** Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2008**; 9(3):219-30.
- 293. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S.** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, **2009**; 11(3):228-34.
- 294. 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.

- 295. Wilson CM.** Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods in Enzymol*, **1983**; 91:236-47.
- 296. 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.
- 297. Gadjeva M, Tomczak MF, Zhang M, Wang YY, Dull K, Rogers AB et al.** A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol*, **2004**; 173:5786-93.
- 298. Iida A, Yoshidome H, Shida T, Takano S, Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Miyazaki M.** Hepatocyte nuclear factor-kappa beta (NF-kappaB) activation is protective but is decreased in the cholestatic liver with endotoxemia. *Surgery*, **2010**; 148(3):477-89.
- 299. Jiang Q, Liu P, Wu X, Liu W, Shen X, Lan T, Xu S, Peng J, Xie X, Huang H.** Berberine attenuates lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat mesangial cells: involvement of NF- κ B signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol*, **2011**; 331(1):34-40.
- 300. Kwon WY, Suh GJ, Kim KS, Kwak YH.** Niacin attenuates lung inflammation and improves survival during sepsis by downregulating the nuclear factor- κ B pathway. *Crit Care Med*, **2011**; 39(2):328-34.
- 301. Meyer-Schwesinger C, Dehde S, von Ruffer C, Gatzemeier S, Klug P, Wenzel UO, Stahl RA, Thaiss F, Meyer TN.** Rho kinase inhibition attenuates LPS-induced renal failure in mice in part by attenuation of NF-kappaB p65 signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2009**; 296(5):F1088-99.
- 302. Zhang X, Song Y, Ci X, An N, Ju Y, Li H, Wang X, Han C, Cui J, Deng X.** Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice. *Inflamm Res*, **2008**; 57(11):524-9.

ÖZ GEÇMİŞ

Ayşe Nihal SARI 22/01/1984 yılında Afyon'da doğmuştur. İlköğrenimini Konya Yıldırım İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini Kahramanmaraş Çukurova Elektrik Anadolu Lisesi ve Aksaray Hazım Kulak Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. 2006 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun olmuştur. Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalında 2007-2008 Eğitim-Öğretim Yılı Güz Dönemi'nde Yüksek Lisans Programı'na başlamış ve 2009-2010 Eğitim-Öğretim Yılı Güz Dönemi'nde "Seçici Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin iskemi/reperfüzyona bağlı hedef organ iskelet kası ve uzak organ böbrek hasarı üzerine etkisi" adlı Yüksek Lisans Tezi'ni tamamlamıştır. 02/01/2009 tarihinden itibaren Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir. İngilizce bilmektedir.