

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

**SIÇANLARDA ZİMOSAN İLE OLUŞAN HİPOTANSİYONA
DALAK TİROZİN KİNAZININ KATKISININ ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Demet ÜNSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE F (DG) 2011-5 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 245

MERSİN – 2013

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

“Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı Eczacılık Farmakoloji Yüksek Lisans Programı” çerçevesinde yürütülmüş olan “**Şıçanlarda zimosan ile oluşan hipotansiyona dalak tirozin kinazının katkısının araştırılması**” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/09/2013


Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı


Jüri Başkanı


Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun ~~23.09.2013~~ 23.09.2017 tarih ve ~~2013/01~~ 2017/01 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Sakir Necat YILMAZ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden bugüne benden sabrını, desteğini ve ilgisini esirgemeyen tez danışman hocam, Doç. Dr. Sn. Seyhan ŞAHAN FIRAT'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında benden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Sn. Bahar TUNÇTAN'a, Yrd. Doç. Dr. Sn. R. Belma KORKMAZ'a, Arş. Gör. Sn. A. Nihal SARI'ya, Prof. Dr. Sn. Mehmet Sami SERİN'e, Dr. Hatice YILDIRIM YAROGLU ve Prof Dr. Sn. Lülüfer TAMER'E teşekkür ederim. Bilimsel dünyanın kapılarını aralayabilmem için geçen süreçte büyük emekleri olan Doç. Dr. Sn. C. Kemal BUHARALIOĞLU'na teşekkür ederim.

Tezime devam ederken aramıza katılan ve her daim desteğini aldığım meslektaşım Ecz. Meryem TEMİZ'e ve stajyer Ecz. Oktay ASLAN'a teşekkür ederim.

“Olmasaydın, burada olmazdım” dediğim, 3 yılımızı birlikte tükettiğimiz dostum, yol arkadaşım Arş. Gör. Ecz. Meltem KAÇAN'a sonsuz teşekkürler.

ÜNSAL ailesi ile beni yetiştiren ve eğitimimin temellerini sağlayan annem ve babama ve doğduğum günden bugüne hep yanımda olan ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen abim Mehmet GİLİK'e sonsuz teşekkürler.

Varlığıyla yaşamımı renklendiren eşim Özgür ÜNSAL'a, gösterdiği sabır ve destekleri için sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sepsis, Septik ve Septik olmayan Şok.....	4
2.1.1. Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Etiyolojisi.....	7
2.1.3. Patofizyolojisi	14
2.1.4. Tedavisi	22
2.2. Dalak Tirozin Kinazı.....	30
2.2.1. Özellikleri.....	30
2.2.2. Ekspresyon ve Etkinliklerinin Düzenlenmesi	35
2.2.3. Fizyolojik Olaylardaki Rolü.....	37
2.2.4. Patolojik Olaylardaki Rolü.....	39
2.2.5. İnhibitörleri.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Gereç.....	44
3.1.1. Deney Hayvanı.....	44
3.1.2. Sarf Malzemesi	44
3.1.3. Teçhizat	48
3.2. Yöntem.....	49
3.2.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	49

3.2.2. Serum Örneklerinin Hazırlanması, Dokuların Homojenize Edilmesi ve Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması	50
3.2.3. Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi	51
3.2.4. Serum ve/veya Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Nitrit, Nitrotirozin, 6-Keto-PGF _{1α} , ve TNF-α düzeyleri ile MPO Etkinliğinin Ölçülmesi	51
3.2.5. Doku Homojenatlarında Dtk, Fosforile Dtk, IκB-α, Fosforile IκB α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, iNOS, COX-2 ve β-Aktin Protein Ekspresyonlarının Ölçülmesi	52
3.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
4.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	55
4.1.1. Zimosanın OAB ve KH Üzerindeki Etkisi	55
4.1.2. Zimosan ile Azalan OAB ve Artan KH Üzerinde BAY 61-3606'nın Etkisi	55
4.2. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Dtk Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi	59
4.3. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın IκB-α Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi	62
4.4. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın NF-κB p65 Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi	65
4.5. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın iNOS Protein Ekspresyon ile Nitrit ve Nitrotirozin Düzeyi Üzerindeki Etkisi	68
4.5.1. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın iNOS Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi	68
4.5.2 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Serum ve Doku Nitrit Düzeyi Üzerindeki Etkisi	70
4.5.3 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Doku Nitrotirozin Düzeyi Üzerindeki Etkisi	72
4.6. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın COX-2 Protein Ekspresyonu ve 6-Keto-PGF _{1α} Düzeyi Üzerindeki Etkisi	74

4.6.1 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın COX-2 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi.....	74
4.6.2 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Doku 6-Keto-PGF1 α Düzeyleri Üzerindeki Etkisi.....	76
4.7. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Doku TNF- α Düzeyleri Üzerindeki Etkisi.....	78
4.8. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Doku MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi.....	80
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	92
7. KAYNAKLAR	94
ÖZ GEÇMİŞ	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Enfeksiyon, SIRS, sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok arasındaki ilişki...	8
Şekil 2.2. Zimosan sinyal iletisi.....	15
Şekil 2.3. Zimosanın yapısı: Mannan, glukan ve kitin.....	20
Şekil 2.4. Dtk'nin yapısı.....	33
Şekil 2.5. Dtk'nin tirozin fosforilasyonunda rol oynayan bölgeleri.....	34
Şekil 4.1. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanlarda BAY 61-3606'nın (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi.....	58
Şekil 4.2. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde Dtk protein ekspresyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	60
Şekil 4.3. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde Dtk protein fosforilasyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	61
Şekil 4.4. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein ekspresyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	63
Şekil 4.5. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein fosforilasyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	64
Şekil 4.6. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB protein ekspresyonları üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	66
Şekil 4.7. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanlarının (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB protein fosforilasyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	67
Şekil 4.8. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde iNOS protein ekspresyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	69

Şekil 4.9. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort, (D) süperiyor mezenterik arterleri ve (E) serumlarında nitrit düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	71
Şekil 4.10. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde nitrotirozin düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	73
Şekil 4.11. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde COX2 protein ekspresyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	75
Şekil 4.12. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde 6-keto-PGF _{1α} düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	77
Şekil 4.13. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde TNF-α düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	79
Şekil 4.14. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde MPO düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi.....	81
Şekil 5.1. Zimosan ile oluşan hipotansiyona Dtk'nin katkısı ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizma.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sepsis ve şok ile ilgili tanımlar.....	12
Çizelge 2.2. Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için <i>Surviving Sepsis Campaign</i> 'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar	24
Çizelge 2.3. Dtk'nin çeşitli hücre türlerindeki ekspresyonu ve işlevleri.....	37
Çizelge 2.4. Dtk inhibitörleri ve biyolojik etkinlikleri.....	42
Çizelge 2.5. Dtk inhibitörü BAY 61-3606'nın seçiciliği.....	43
Çizelge 4.1. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanlarda BAY 61-3606'nın OAB ve KH üzerindeki etkisi.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

20-HETE	20-Hidroksieikozatetraenoik asit (<i>20-hydroxyeicosatetraenoic acid</i>)
5-LO	5-Lipoksijenaz (<i>5-lipoxygenase</i>)
AA	Arakidonik asit (<i>arachidonic acid</i>)
ANOVA	Varyans analizi (<i>analysis of variance</i>)
AP-1	Etkinleştirici protein-1 (<i>activating protein-1</i>)
ARDS	Akut respiratuar distres sendromu (<i>acute respiratory distress syndrome</i>)
AT ₁	Anjiyotensin reseptörü tip 1 (<i>angiotensin II receptor type 1</i>)
AT ₂	Anjiyotensin reseptörü tip 2 (<i>angiotensin II receptor type 2</i>)
ATP	Adenozin trifosfat
BAY 61-3606	2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit
BCR	B hücre reseptörü (<i>B cell antigen receptor</i>)
COX	Siklooksijenaz (<i>cyclooxygenase</i>)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
ÇOY	Çoklu organ yetmezliği (<i>multiple organ dysfunction syndrome</i>)
DC-SIGN	<i>Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin</i>
DLBCL	<i>Diffuse large B cell lymphoma</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
Dtk	Dalak tirozin kinazı (<i>spleen tyrosine kinase</i>)
DIC	Dissemine intravasküler koagülasyon (<i>disseminated intravascular coagulation</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EKG	Elektrokardiyografi
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü (<i>epidermal growth factor receptor</i>)

FcεR	Fc-epsilon reseptörü (<i>Fc-epsilon receptor</i>)
FcγR	Fc-gama reseptörü (<i>Fc-gamma receptor</i>)
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (<i>food and drug administration</i>)
H3PO4	Fosforik asit (<i>phosphoric acid</i>)
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit (<i>hydrogen peroxide</i>)
HCl	Hidroklorik asit (<i>hydrochloric acid</i>)
IBS	Hassas Bağırsak Sendromu'dur (<i>irritable bowel syndrome</i>)
IKK	I kappa B kinaz (<i>I kappa B kinase</i>)
IL	İnterlökin (<i>interleukin</i>)
ITAM	İmmün reseptör tirozin-temelli etkinleştirme motifi (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
i.p.	İntraperitoneal (<i>intraperitoneal, intraperitoneally</i>)
i.v.	İntravenöz (<i>intravenous</i>)
kDa	Kilo dalton (<i>kilodalton</i>)
KH	Kalp hızı
KCl	Potasyum klorür (<i>potassium chloride</i>)
L-NAME	N ^G -nitro-L-arjinin metil ester (<i>N^G-nitro-L-arginine methyl ester</i>)
L-NMA	N ^G -metil-L-arjinin (<i>N^G-Methyl-L-arginine</i>)
LPS	Lipopolisakkarit (<i>lipopolysaccharide</i>)
MAPK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MPO	Miyeloperoksidaz (<i>myeloperoxidase</i>)
MyD88	Miyeloit farklılaşma faktörü 88 (<i>myeloid differentiation factor 88</i>)
NaCl	Sodyum klorür (<i>sodium chloride</i>)
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit
NED	N-1-Naftiletilediamin dihidroklorür (<i>N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride</i>)
NF-κB	Nükleer faktör-κB (<i>nuclear factor-κB</i>)
NO	Nitrik oksit (<i>nitric oxide</i>)
OAB	Ortalama arter basıncı (<i>mean arterial pressure</i>)

P	İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi (<i>probability</i>)
PARS	Poli (ADP-riboz) sentaz (<i>poly [ADP-ribose] synthase</i>)
PDGFR	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (<i>platelet derived growth factor receptor</i>)
PG	Prostaglandin (<i>prostaglandin</i>)
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (<i>prostaglandin I₂</i>); prostasiklin (<i>prostacyclin</i>)
PI3K	Fosfoinozotid-3-kinaz (<i>phosphoinositide-3-kinase</i>)
PMN	Polimorfo nüklear lökosit (<i>Polymorphonuclear leukocyte</i>)
PRR	Örnek tanıma reseptörleri (<i>pattern-recognition receptors</i>)
R112	3,3'-((5-fluoropyrimidine-2,4-diyl)bis(azanediyl))diphenol
R788	Fostamatinib; (6-(5-fluoro-2-(3,4,5 <i>trimethoxyphenylamino</i>)pyrimidin-4-ylamino)-2,2-dimethyl-3- <i>oxo-2,3-dihydropyrido[3,2-b][1,4]oxazin-4-yl</i>)methyl dihydrogen <i>phosphate</i>
ROT	Reaktif oksijen türleri (<i>reactive oxygen species</i>)
SA	Sülfanilamid (<i>sulphanylamide</i>)
SDS	Sodyum dodesil sülfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH2	Src homoloji 2 (<i>Src homology 2</i>)
SIRS	Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (<i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
sFLA ₂	Sitozolik fosfolipaz A ₂ (<i>cytosolic phospholipase A₂</i>)
SSA	Sığır serum albumini (<i>bovine serum albumin</i>)
S. cerevisiae	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TCR	T hücre reseptörü (<i>T cell receptor</i>)
TEF	Trombosit etkinleştirici faktör (<i>platelet activating factor</i>)
TEMED	Tetrametiletildiamin (<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>)
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tümör nekroze edici faktör (<i>tumor necrosis factor</i>)
TTÇ	Tris tampon çözeltisi
TXA ₂	Tromboksan A ₂ (<i>Thromboxane A₂</i>)
YKST	Yağsız kurutulmuş süt tozu (<i>non-fat dry milk</i>)
ZAP 70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

ÖZET

Sıçanlarda Zimosan ile Oluşan Hipotansiyona Dalak Tirozin Kinazının Katkısının Araştırılması

Bu çalışmada, zimosanın neden olduğu hipotansiyona dalak tirozin kinazı (Dtk)'nin katkısı seçici Dtk inhibitörü BAY 61-3606 uygulanan sıçanlarda vazodilatör ve proenflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ile ilişkilendirilerek araştırıldı. Deneylerde kontrol grubu olarak serum fizyolojik (SF) ve septik olmayan şok grubu olarak zimosan, deney grubu olarak da tek başına veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanan erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. BAY 61-3606 sıçanlara SF veya zimosan enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulandı. Sıçanlara SF veya zimosan enjeksiyonundan hemen önce ve enjeksiyondan 1, 2, 3 ve 4 saat sonra kuyruktan OAB ve kalp hızı (KH) kayıtları alındı. Deneyler sonunda öldürülen sıçanlardan alınan kanlardan hazırlanan serum örneklerinde nitrit; böbrek, kalp, torasik aort (TA) ve süperiyor mezenterik arterleri (SMA)'da Dtk, fosforile Dtk, κ B inhibitörü (I κ B)- α , fosforile I κ B- α , nükleer faktör κ B (NF- κ B) p65, fosforile NF- κ B p65, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz (COX)-2 protein ekspresyonları ölçüldü. Aynı dokularda nitrit, nitrotirozin (NT), tümör nekroze edici faktör (TNF)- α ve 6-keto-PGF_{1 α} düzeyleri ile miyeloperoksidaz (MPO) etkinliğine bakıldı. Sıçanlara zimosan uygulanmasından 4 saat sonra OAB 60 mmHg azaldı, KH 94 atım/dakika arttı. Dtk ekspresyonu zimosan uygulaması ile değişmezken; I κ B- α protein ekspresyonu azaldı. Dtk ve I κ B- α fosforilasyonu, NF- κ B p65 ekspresyonu ve fosforilasyonu, iNOS ve COX-2 protein ekspresyonları ise zimosan ile arttı. Zimosan serum ve/veya dokularda ölçülen nitrit, NT, TNF- α ve 6-keto-PGF_{1 α} düzeyleri ile MPO etkinliğinde artmaya nedne oldu. Zimosanın neden olduğu tüm bu değişiklikler BAY 61-3606 ile geri çevrildi. Bu çalışmanın bulguları, zimosan ile oluşan NO, peroksinitrit, prostasiklin ve TNF- α oluşumunda artma ile belirgin enflamasyonun eşlik ettiği hipotansiyona Dtk'nin katkıda bulunabileceğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Zimosan, hipotansiyon, enflamasyon, Dtk, BAY 61-3606

ABSTRACT

Investigation of the Contribution of Spleen Tyrosine Kinase on Zymosan-Induced Hypotension in Rats

In this study, contribution of spleen tyrosine kinase (Syk) to zymosan induced hypotension in relation with vasodilator and proinflammatory mediator production, was investigated in selective Syk inhibitor, BAY 61-3606-injected rats. In the experiments, saline-, zymosan-, BAY 61-3606- and/or zymosan+ BAY 61-3606-injected male Wistar rats were used as control, non-septic shock and experimental group, respectively. BAY 61-3606 was administered 1 hour after injection of saline or zymosan. MAP and heart rate (HR) were measured from rats received either saline or zymosan at time points of 0, 1, 2, 3 and 4 hours by tail cuff method. At the end of the experiments, rats were euthanized and serum nitrite levels and protein expression and/or phosphorylation of Syk, nuclear factor κ B (NF- κ B) p65, inhibitor of κ B α (I κ B)- α , inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 were measured in kidney, heart, thoracic aorta (TA) and superior mesenteric artery (SMA). Nitrite, nitrotyrosine (NT), tumor necrosis factor (TNF- α), and 6-keto-PGF_{1 α} levels and myeloperoxidase (MPO) activity were measured in the same tissues. MAP fell by 60 mmHg and HR rose by 94 beats/min at 4 hours after zymosan administration. Although, tissue protein expression of Syk did not change, protein expression of I κ B- α was decreased after zymosan administration. Phosphorylation of Syk and I κ B- α , expression and phosphorylation of NF- κ B p65, and protein expression of iNOS and COX-2 were increased after zymosan administration. Serum and/or tissue nitrite, NT, 6-keto-PGF_{1 α} , and TNF- α levels as well MPO activity were increased. The zymosan-induced changes were reversed by BAY 61-3606. The results of this study demonstrated that, Syk could contribute to the zymosan-induced hypotension and inflammation associated with increased production of NO, peroxynitrite, prostacyclin, and TNF- α .

Key Words: Zymosan, hypotension, inflammation, Syk, BAY 61-3606

1. GİRİŞ

Şok, tedavi edilmediğinde yaşamı tehdit eden ciddi patofizyolojik sonuçlar doğurabilen, yaşamsal organların yetersiz perfüzyonu ile belirgin akut klinik ve kardiyovasküler bir sendromdur (1). Dünya çapında yapılan çok sayıda klinik denemelere karşın, sepsis ve septik şok, yoğun bakım birimlerine gelen hastalarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni olarak bilinmektedir (2). Sepsis ve septik şok hemen hemen her organizma ile ilişkili olsa da, en yaygın etiyolojik patojenlerin başında Gram-pozitif bakteriler, Gram-negatif bakteriler ve funguslar gelmektedir. Bazı virüsler ve riketsiyalar da benzer bir sendroma neden olabilmektedir (3). Fungal organizmaların neden olduğu sepsis olgusu (fungal sepsis) sayısı, 1979-2000 yılları arasında %207'lik bir artış göstermiştir (4). Fungal enfeksiyonlardan kaynaklanan, şiddetli sepsis ya da septik şok olgularının sayısı, günümüzde büyük ölçüde artmıştır. Çoklu ilaç direnci (*multidrug resistant*) olan fungus ve bakterilerin, şiddetli sepsis ve septik şok olgularının %25'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (2). Enfeksiyon ile başlayıp septik şok ve organ yetmezliği oluşturan olaylar kaskadı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (5).

Deneysel fungal sepsis modeli oluşturmak için kullanılan zimosan (6), *Saccharomyces cerevisia* (*S. cerevisiae*)'nın hücre duvarı bileşenidir. Başlıca 1,3- β -glukan ve 1,6- β -glukan ile α -mannan gibi çapraz bağlı polisakkaritlerden ve diğer az sayıda polisakkarit polimerlerinden oluşmaktadır (7, 8). Zimosan, sıçanlara enjekte edildiğinde tümör nekroze edici faktör (TNF)- α , miyeloperoksidaz (MPO), interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi enflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesine neden olarak hemodinamik değişikliklere ve enflamasyona neden olmaktadır. Bu mediyatörler kompleman sistem, prostaglandin (PG)'ler, trombosit etkinleştirici faktör (TEF), oksijen radikalleri ve lizozomal enzimlerdir (9, 10). Zimosan uygulanması ile fare (11) ve sıçanlarda (12) septik olmayan şok modeli oluşturabilmektedir. Bu hayvanlarda, vücut ağırlığında azalma, mortalitede artma, akut pankreatit ve bağırsak zedelenmesinin ağır semptomları gözlenmektedir (11).

Daha önce bizim laboratuvarımızda *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) ile yapılan çalışmalar, LPS'ye maruziyet sonucunda aralarında proenflamatuvar sitokinler, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (MAPK)'lerin bulunduğu çeşitli sinyal ileti yollarının uyarılmasının ardından, nükleer faktör κ B (NF- κ B) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkinleşmesine ve sonuçta indüklenebilir nitrik oksit (NO) sentaz (iNOS), siklooksijenaz (COX), sitozolik fosfolipaz A₂ (sFLA₂) ve 5-lipoksijenaz (5-LO) gibi enzimlerin oluşumunda artışa ve böylece vazodilatör mediyatörler olan prostasiklin (PGI₂) ve PGE₂ gibi PG'ler ile NO'nun aşırı miktarlarda oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, septik şok patojenezinde, vazodilatör/vazokonstriktör dengenin vazodilatör metabolitler yönünde bozulduğunu açıkça ortaya koymaktadır (13, 14). Benzer olarak, zimosan bir fungus hücre duvarı bileşeni olup, bakteriyel ve endotoksik olmaması nedeniyle "septik olmayan şok modeli" (15) ya da septik şok benzeri semptomların gözlenmesinden dolayı "septik şoka benzeyen sendrom" (16) oluşturmak için kullanılmaktadır. Zimosan ile yapılan çalışmalarda, 500 mg/kg intraperitoneal (i.p.) dozda enjeksiyonu ile oluşturulan şok sırasında ortalama arter basıncının (OAB) düştüğü ve proenflamatuvar sitokinler, NF- κ B gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkinleştiği ve sonuçta vazodilatör mediyatörlerin oluşumunda artış gözleendiği belirtilmiştir (12, 17). Zimosan, septik olmayan şok (15), çoklu organ yetmezliği (ÇOY) (20) ve akut peritonit (21) gibi enflamatuvar hastalıkların patojenezinde önemli rol oynamakta ve deneysel olarak özellikle kronik enflamasyon ve septik olmayan şok modeli oluşturmak için kullanılmaktadır.

Sepsis ve septik şok tedavisinde öncelikle enfeksiyonun ortadan kaldırılması, hipotansiyonun düzeltilmesi, dokularda oluşan hipoperfüzyonun ve organ işlev bozukluğunun ortadan kaldırılması tedavi hedefleri arasında yer almaktadır (22). Ancak günümüzde, tedavi yaklaşımları, sinyal ileti mekanizmalarının ve etkinleşen çoğu enzim sisteminin düzenlenmesine dayanan, nedene yönelik ve moleküler düzeyde özgül terapötik yaklaşımlar biçiminde olmaktadır (2).

Dalak tirozin kinazı (Dtk), yaklaşık 20 yıl önce keşfedilmiş, 72 kDa ağırlığında reseptör ile kenetli olmayan bir intraselüler tirozin kinazdır (23). Dtk'nin, B hücreleri,

mast hücreleri, nötrofiller, makrofajlar ve trombositler gibi tüm hematopoitik hücrelerde ve epitel hücresi, fibroblastlar, nöronal hücreler ve damar endotel hücreleri gibi hematopoitik olmayan hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (24). Dtk ve enflamasyon ilişkisini araştıran çalışmalar romatoit artrit, astım ve alerjik rinit gibi hastalıklar ile sınırlı kalmıştır (25). Seçici bir Dtk inhibitörü olan 2-[[7-(3,4-Dimethoxyphenyl)imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-yl]amino]pyridine-3-carboxamide hydrochloride (BAY 61-3606)'nın sıçanlara oral yoldan uygulanmasının antijene bağlı gelişen pasif kütanöz anafilaktik tepkiyi ve bronkiyal ödemi önemli derecede baskıladığı gösterilmiştir (26).

Günümüzde Dtk'nin akut ve kronik enflamasyonda (25) ve zimosanın sinyal iletiminde önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar (27) olmasına karşın, septik olmayan şok tedavisinde Dtk inhibitörlerinin etkili olup olmadıklarına ilişkin literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, sıçanlarda zimosanın neden olduğu hipotansiyona Dtk'nin katkısı, seçici Dtk inhibitörü BAY 61-3606 uygulanan sıçanlarda vazodilatör ve proenflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ile ilişkilendirilerek araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sepsis, Septik ve Septik Olmayan Şok

2.1.1. Epidemiyolojisi

Dünya çapında yapılan çok sayıda klinik denemelere karşın, sepsis ve septik şok, yoğun bakım birimlerine gelen hastalarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni olarak bilinmektedir. Şiddetli sepsis ve septik şok olgularının sayısının Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2010-2020 yılları arasında 934.000'den 1.110.000'e çıkacağı ileri sürülmüştür (2). Gram-negatif bakteriyemisi olan hastaların büyük bir bölümünde sepsis geliştiği bilinmektedir. Gram-negatif bakterilerin sepsis oluşturma olasılıkları %50 olmasına karşın, Gram-pozitif bakterilerin sepsis oluşturma özellikleri %25'tir. Son yıllarda Gram-pozitif patojenler ile ortaya çıkan sepsis olgularının sayısında belirgin bir artış olduğu bildirilmiştir. Fungal, viral ve protozoal enfeksiyonlar da sepsis ve septik şokun önemli nedenleri arasında bulunmaktadır. Fungal organizmaların neden olduğu sepsis olgularının sayısı, 1979 yılında 5.231 olgudan, 2000 yılında 16.042 olguya %207'lik bir artış göstermiştir (4).

Sepsis, 2000 yılında yaklaşık 660.000 insanı etkilemiş ve 1979 yılından bu yana görülme sıklığında %8.7 artış göstermiştir. Hastaların yarısından çoğu, 15.7 gün ortalama bir kalış süresi ile yoğun bakım birimlerine kabul edilmiştir. Ölümlerin toplam sayısı, 1979 yılında her 100.000 kişiden % 21.9'dan; 2000 yılında her 100.000 kişiden 43.9'a yükselmiştir (1).

Sepsis, ulusal sağlık güvence sistemlerinde önemli bir yük olarak görülmektedir. Sepsis veya septik şoklu hastalara yaklaşık 16.7 milyon \$ yıllık harcama ile birlikte, patofizyolojiyi anlamak ve tedavi seçeneklerini kavramak klinisyenler için önem kazanmaktadır. Şiddetli sepsis ve septik şok, her bir olgu için ortalama maliyet ile

birlikte önemli miktarda sağlık bakım kaynaklarını da tüketmektedir. Angus ve ark'nın 2001 yılında yayınlamış olduğu rapora göre, hastaların kişi başına ortalama 22.000 \$ harcamaları olmakla birlikte, ulusal olarak 16.7 milyar \$'lık yıllık toplam maliyetin olduğu bildirilmiştir (4). Hesaplanan bu yıllık maliyetin toplumun yaşlanması, antimikrobiyal ilaçlara dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve girişimsel terapötik yaklaşımların yaygınlaşması nedeni ile önümüzdeki yıllarda daha da artacağı ileri sürülmektedir (1).

Şiddetli sepsisli hastalarda mortalite görülme olasılığı %40 oranındadır. Septik şok hastaları, sıklıkla yoğun bakıma gereksinim duymaktadırlar ve olguların %50-80'i ölümlerle sonuçlanmaktadır (1). Herhangi bir organ yetmezliğine sahip olan sepsisli hastaların oranı hastalığın şiddetinin bir belirteçidir ve bu oran, %19.1'den %30.2'ye artış göstermiştir. Sepsisli hastalarda en sık yetmezliği yaşanan organlar, akciğerler (hastaların %18'inde) ve böbrekler (hastaların %15'inde) olmakla birlikte, daha az sıklıkta karşılaşılan durumlar arasında ise kardiyovasküler bozukluk (%7), hematolojik bozukluk (%6), metabolik bozukluk (%4) ve nörolojik bozukluk (%2) yer almaktadır. Klinikte karşılaşılan en güç durumlardan birisi olan ÇOY sendromu, durumu kritik olan hastalarda (*critically ill patients*) önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (4). İnsanlarda, ÇOY'deki ilerleme, metabolizmanın sürekli artması ve negatif nitrojen dengesi ile gösterilmektedir (28). Fungal sepsis ile akut solunum sıkıntısı sendromu (*acute respiratory distress syndrome; ARDS*) gözlenen hastalarda solunum yetmezliği nedeni ile mortalite görülme olasılığı, %25-40 oranında değişmektedir. Buna ek olarak, ÇOY, mortalite görülme sıklığı olasılığını %40-60'a yükseltmektedir. ÇOY'nin geç fazının habercisi olan böbrek yetmezliği ve şiddetli karaciğer yetmezliği, mortalite görülme olasılığını yaklaşık olarak %100'e artırmaktadır. ÇOY yanında tek organ olarak akciğer zedelenmesinin ilerlemesi sonucu ortaya çıkan akciğer yetmezliği de hastaların %19'unda mortaliteye neden olan önemli bir ölüm nedenidir (29). Aynı zamanda, peritonit, ÇOY, sepsis ve mortaliteye neden olan ciddi bir enfeksiyondur (30). Enfeksiyon ile başlayıp septik şok ve organ yetmezliği oluşturan olaylar kaskadı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (5).

Son yıllarda, septik ya da kardiyojenik şoktan kaynaklanan ölüm oranları %70'i aşmıştır. Günümüzde, şiddetli sepsisi olan hastaların %10-30'u hastanelere başvurmakta ve bu hastaların %8.6'sı, miyokart enfarktüsünün ardından kardiyojenik şok yaşamaktadırlar. Artan tedavi yöntemleri ve gelişmiş izleme yöntemlerine karşın, şok nedeniyle ortaya çıkan mortalite, en az %30-50 oranındadır (1).

Septik şoklu hastalar, genellikle 60-70 yaşlarındadır ve bu hastaların ortalama yaşlarının sürekli olarak arttığı bildirilmiştir. Bu hastalığa zemin hazırlayan etkenler arasında; cinsiyet (erkek), Kuzey Amerikalılardaki beyaz olmayan etnik orijin, eşlik eden hastalıklar, kanser, immün sistem yetmezliği ya da immün sistemin baskılandığı durumlar, kronik organ yetmezliği, alkol bağımlılığı ve genetik etkenler bulunur. *Diabetes mellitus*, kanser veya insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonu gibi hastalıkları olan ve özellikle travmalı ya da cerrahi hastalarda, şiddetli sepsisin gelişmesi olasılığı daha yüksektir (2).

Fungal enfeksiyonlardan kaynaklanan, şiddetli sepsis ya da septik şok olgularının sayısı, günümüzde büyük ölçüde artmıştır. Çoklu ilaç direnci (*multidrug resistant*) olan fungus ve bakterilerin, şiddetli sepsis ve septik şok olgularının %25'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (2). 1979-2000 yılları arasında fungal enfeksiyonların görülme sıklığı, üç kat artış göstermiş ve tedaviye çeşitli güçlü antifungal ilaçların eklenmesine karşın, mortalite oranı %41'den %71'e yükselmiştir. *Candida albicans* dahil birçok *Candida* türünün neden olduğu fungal sepsis, 1980'li yıllarda %24'ten, 1997-2000 yılları arasında %46'ya varan önemli bir artış göstermiştir (1).

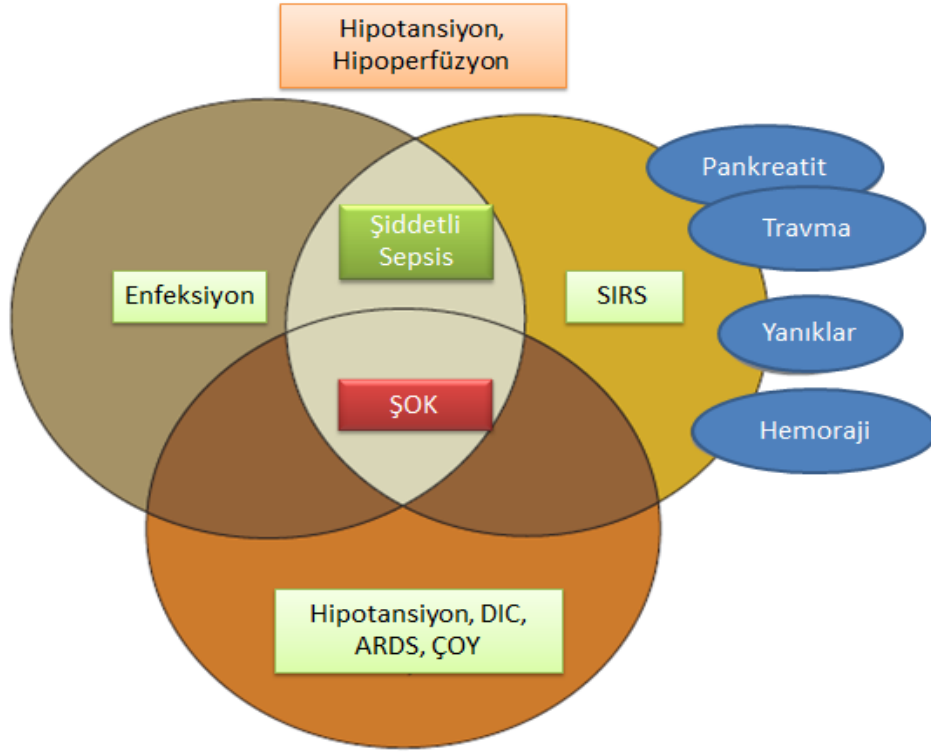
Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda fungeminin tüm aşamalarının %0.1-%3.6'sından *S. cerevisiae*'nin sorumlu olduğu ileri sürülse de, *S. cerevisiae* fungemisinin görülme sıklığı tam olarak bilinmemektedir. İlk olgu, 1970'te, protez mitral kapakçıklı bir hastada bildirilmiş ve zamanla bildirilen olgu sayısında bir artış gözlenmiştir (1970-1980 yıllarında 4; 1981-1991 yıllarında 10; 1992-2004 yıllarında ise 46 olgu olduğu bildirilmiştir.). *S. cerevisiae* fungemisi, immün sistemi baskılanmış

olan hastalarda %31 (19 hastada) ve durumu kritik olan hastalarda %46 (28 hastada) oranında tespit edilmiştir (31).

2.1.2 Etiyolojisi

Şok, tedavi edilmediğinde yaşamı tehdit eden ciddi patofizyolojik sonuçlar doğurabilen, yaşamsal organların yetersiz perfüzyonu ile belirgin akut bir klinik kardiyovasküler sendromdur. Yeterli sıvı resüsitasyonuna karşın perfüzyon anormallikleri sonucu sistolik kan basıncının 90 mm Hg'dan düşük olması ya da kan basıncında en az 40 mm Hg'lık bir azalma olarak tanımlanmaktadır (1).

Şok durumunda, (i) dokuların kan ve oksijen ile perfüzyonunda yaygın ve yüksek düzeyde bir azalma, (ii) doku zedelenmesine bağlı olarak ortaya çıkan çoklu organ işlevsizliği ve sonucunda yetmezliği gözlenmektedir. ÇOY esas olarak kalp, böbrek, karaciğer, beyin ve akciğer gibi yaşamsal önemi yüksek organları kapsamaktadır (22). ÇOY sendromu, şiddetli sepsis, septik şok, vd. şok türleri, çoklu travma, şiddetli yanık ya da pankreatit vb. durumları olan hastaların pek çok organ ve sistemi işlevlerinin gerilemesi olarak tanımlanır (32). Şokun başlıca türleri arasında septik şok, hemorajik şok, travmatik şok, kardiyojenik şok, nörojenik şok ve anafilaktik şok bulunmaktadır (22). Şokla ilişkili durumlar Şekil 2.1'de gösterilmiştir:



Şekil 2.1. Enfeksiyon, SIRS, sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok arasındaki ilişki (1). ARDS, akut solunum sıkıntısı sendromu; ÇOY, çoklu organ yetmezliği; DIC, dissemine intravasküler koagülasyon, SIRS, Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu.

Sepsis, enfeksiyon ve enfeksiyona karşı oluşan sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (*systemic inflammatory response syndrome*; SIRS) ile belirgin bir klinik sendrom olup, akut organ yetmezliği ve buna bağlı olarak hızla ölüme neden olmaktadır (2). Enfeksiyonun, genellikle patojenik ya da olası patojenik mikroorganizmalar tarafından steril doku ya da sıvı veya vücut kavitesinin invazyonuna yol açan patolojik bir süreç olduğu gösterilmiştir (33). SIRS, sistemik bir enflamatuvar yanıtın, bir çeşit enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan etkenler tarafından tetiklenebilmesi ile ortaya çıkmaktadır (2). SIRS'nin, yoğun bakım birimlerine başlıca ölüm nedeni olan sepsis/ÇOY sendromunun patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (34).

Enfeksiyon yokluğunda ortaya çıkan sistemik enflamatuvar yanıt “SIRS” olarak tanımlanmaktadır. Şiddetli klinik belirtiler ile kendini gösteren sistemik enflamatuvar yanıtta da “şiddetli sepsis” denilmektedir. Şiddetli sepsis, akut renal yetmezlik ya da

solunum yetmezliği gibi akut organ yetmezliği olan yoğun bakım hastalarında görölmektedir (3, 35).

Yoğun bakım birimlerine başvuran hastaların %10'unda, sepsisin en ciddi komplikasyonu olan septik şok bulunmaktadır (2). Sepsis ilk kez, Ashbaugh ve Petty tarafından, mekanik ventilasyon tedavisi alan ARDS'li hastalarda ortaya çıkan oldukça ölümcül bir komplikasyon olarak tanımlanmıştır (36). ÇOY olan travmalı hastaların %33'ünün kan kültürlerinin bakteriyel odaklı olduğu gösterilmiştir (37). Gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere ek olarak, fungal, viral ve protozoal enfeksiyonlar da sepsis ve septik şokun önemli nedenleri arasında yer almaktadır (3).

Bakteri ve endotoksin yokluğunda ortaya çıkan sepsis kavramı, literatürde ilk kez Goris ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Goris ve ark.'nın 1986 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, i.p. steril zimosan uygulanmasının ardından ARDS'ye benzeyen pulmoner değişiklikler ve perfüzyon bozukluğu nedeni ile çeşitli organ sistemlerinin işlevlerinin bozulması, serum laktat düzeylerinin artması ve negatif kan kültürü ile belirgin enflamatuvar yanıtların ortaya çıktığı gösterilmiştir (37).

Septik olmayan şok ise, enfeksiyöz etiyolojisi olmayan hiperlaktemi, şiddetli böbrek zedelenmesi ve organ yetmezliği ile birlikte seyreden kardiyovasküler sistem bozukluğu olarak tanımlanmaktadır (38). Sistemik enflamasyonun belirtilerinin yanık, pankreatit vd. hastalık durumlarına sahip olan hastalar arasında enfeksiyon yokluğunda da gelişebildiği gösterilmiştir (2).

S. cerevisiae adlı mantarın hücre duvarı bileşeni olan, bakteriyel ve endotoksik olmayan zimosan ile oluşan şok, bu etiyolojik farklılıktan dolayı "septik olmayan şok" olarak adlandırılmaktadır (15). Semptomları septik şoka benzediği için zimosanla oluşturulan şoka aynı zamanda "septik şoka benzeyen sendrom" da denilmektedir (16, 39).

Sepsise neden olan ve mikrobiyolojik olarak gösterilen enfeksiyonların etkilediği birincil hedefler, solunum yolu (%21-68), intraabdominal bölge (%14-22) ve

üriner bölgeler (%14-18)'dir. Sepsis ve septik şok hemen hemen her organizma ile ilişkili olsa da, en yaygın etiyolojik patojenlerin başında *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) gibi Gram-pozitif bakteriler (hastaların %40'ı), *E. coli* gibi Gram-negatif bakteriler (%38) ve funguslar (%17) gelmektedir. Bazı virüsler ve riketsiyalar da benzer bir sendroma neden olabilmektedir (3).

Etiyolojisine göre en yaygın görülen sepsis türleri aşağıdaki gibi tanımlanabilmektedir:

Gram-Pozitif Bakteriyel Sepsis

Staphylococcus aureus, *S. pneumoniae*, koagülaz-negatif stafilokok ve *Enterococcus* türleri Gram-pozitif bakteriyel sepsise neden olan önemli türlerdir. *Staphylococcus epidermidis* sıklıkla, yapay kalp kapakçıkları ile intravenöz ve intraarteriyel kateterler gibi enfekte intravasküler aygıtların kullanımı ile ilişkili bulunmuştur. Hastanelerde *enterokokal* bakteriyemi ve ilişkili sepsisin görülme sıklığı günümüzde oldukça artmaktadır. *Enterococci* türleri, sıklıkla uzun süreli hastanede yatan hastaların kan kültürlerinde en sık rastlanan bakteri türleri olmuştur (1).

Gram-Negatif Bakteriyel Sepsis

Gram-pozitif organizmalarla karşılaştırıldığında, Gram-negatif bakterilerin septik şok ve mortalite geliştirme olasılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (sırasıyla %25 ve %50). *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) sepsiste en yaygın iki Gram-negatif mikroorganizma türüdür. Yaygın olarak görülen öbür negatif patojenler arasında *Klebsiella*, *Serratia* ve *Enterobacter* türleri ile *P. aeruginosa* bulunmaktadır (1).

Fungal Sepsis

Fungal bir mikroorganizma ya da fungal ürünlerin sistemik dolaşıma geçerek neden olduğu sepsis "fungal sepsis" olarak tanımlanmaktadır (40). Hastanede yatan

hastalarda, fungal sepsisin yaygın nedeni olarak *Candida* türleri görülmektedir. *C. albicans* en sık rastlanan tür olmasına karşın, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi diğer *Candida* türleri de tespit edilmiştir (1).

Cryptococcus, *Coccidioides*, *Fusarium* ve *Aspergillus*'u içeren öteki mantarlar da, fungal sepsisin nedeni olarak tanımlanmıştır. Fungal enfeksiyonlar için risk etkenleri arasında; abdominal girişim, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi, kortikosteroid kullanımı, hastanede uzun süreli kalış, santral venöz kateter, total parenteral beslenme, hematolojik malignite, kronik ve kalıcı mesane kateteri bulunmaktadır (1).

S. cerevisiae pnömoni, ampiyem (göğüste ve özellikle akciğerin dış tarafında irin toplanması), karaciğer absesi, peritonit, vajinit, özofajit, üriner sistem enfeksiyonları, selülit, açıklanamayan ateş ya da septik şok gibi çeşitli klinik sendromlara neden olabilmektedir. *S. cerevisiae*, aynı zamanda enflamatuvar bir hastalık olan Crohn hastalığı ile de ilişkilidir. *S. cerevisiae*'nin astımlı, ülseratif kolitli ve diyareli hastalarda da bulunduğu gösterilmiştir. *S. cerevisiae* tarafından oluşturulan en önemli klinik sendrom fungemidir, çünkü fungemi, genellikle hastalığın en şiddetli ve kanıtlanmış klinik tablosudur (31).

Deneysel fungal sepsis modeli oluşturmak için kullanılan zimosan (6), *S. cerevisiae*'nin hücre duvarı bileşenidir ve sıçanlara enjekte edildiğinde TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi enflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesine neden olarak hemodinamik değişikliklere ve enflamasyona neden olmaktadır. Bu mediyatörler kompleman sistem, PG'ler, TEF, oksijen radikalleri ve lizozomal enzimlerdir (9, 10). Zimosan uygulanması farelerde (11) ve sıçanlarda (12) septik olmayan şoka neden olmaktadır. Bu hayvanlar, vücut ağırlığında azalma, mortalitede artma ve akut pankreatit ve bağırsak zedelenmesinin ağır belirtilerini göstermektedir (11).

Konakta, basit bir enfeksiyona maruziyet ile başlayan ve klinik açıdan son derece ciddi ÇOY'e kadar gidebilen durumlarla ilişkili yapılmış olan tanımlar Çizelge 2.1'de verilmiştir (41).

Çizelge 2.1. Sepsis ve şok ile ilgili tanımlar (41).

Enfeksiyon	Normalde steril olan konakçıda mikroorganizmanın varlığı veya mikroorganizmanın yayılmasına karşı verilen yangılı yanıt ile belirgin mikrobiyal durum.
Bakteriyemi	Kanda canlı bakteri bulunması durumu.
Fungemi	Kanda canlı fungusun bulunması durumu.
Sistemik yangılı yanıt sendromu	Şiddetli klinik belirtiler ile kendini gösteren sistemik enflamatuvar yanıt. Sayılan durumlardan en az ikisi olmalı: Ateş > 38 °C veya < 36 °C; kalp hızı > 90 atım/dk; solunum hızı ≥ 20 solunum/dakika veya Pa _{CO2} < 32 torr (< 4.3 kPa); lökosit > 12.000 hücre/mm ³ veya > %10 olgunlaşmamış hücre.
Sepsis	Bilinen veya olası bir enfeksiyona karşı verilen sistemik yanıt durumu. Sayılan durumlardan bazıları olabilir: <u>Genel değişkenler</u> (ateş > 38.3°C; hipotermi < 36°C; kalp hızı > 90 atım/dk. veya yaşa göre normal değerinden iki standart sapma daha çok; takipne; mental durumda değişiklik; anlamlı derecede ödem veya pozitif sıvı dengesi [24 saatten uzun süre > 20 ml/kg]; hiperglisemi [diyabet yokluğunda kan glukozu > 140 mg/dl veya 7.7 mmol/l]); <u>enfla-masyona 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 hipotan-siyon [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 _{IO2} değeri < 300]; iyeğen 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 anormal-likleri [uluslararası normalize oranı > 1.5 veya etkinleştirilmiş kısmi tromboplastin süresi > 60 Sn.]; ileus [bağırsak sesleri yokluğunda]; trombositopeni [trombosit sayısı < 100.000 µl]; hiperbilirubinemi [plazma toplam bilirubini > 4 mg/dl veya 70 µmol/l]); <u>doku perfüzyonu ile ilgili değişkenler</u> (hiperlaktatemi [> 1 mmol/l]; azalmış kapiler dolun veya lekelenme).
Sepsisin neden olduğu hipotansiyon	Hipotansiyona neden olabilecek bir durum olmamasına karşın, SKB'nin 90 mmHg'den düşük olması veya OAB'nin 70 mmHg'den düşük olması ya da SKB'de 40 mmHg'den daha çok bir azalma olması veya kan basıncının yaşa göre normal değerinden iki standart sapma daha az olması durumu.
Sepsisin neden olduğu doku hipoperfüzyonu	Enfeksiyonun neden olduğu hipotansiyon, laktat düzeylerinde yükselme veya oligoüri olması durumu.

Şiddetli sepsis	Sepsisin neden olduğu organ işlev bozukluğu veya doku hipoperfüzyonu ile birlikte olan sepsis durumu. Enfeksiyon nedeniyle olduğunu düşündüren sayılan durumlardan herhangi biri olabilir: Sepsisin neden olduğu hipotansiyon; laktat düzeyleri normal laboratuvar üst değerlerinin üzerinde; yeterli miktarda sıvı uygulanmasına karşın idrar çıkışı 2 saatten uzun süre < 0.5 ml/kg/sa. enfeksiyon kaynağı olarak pnömoni yokluğunda Pao ₂ /Fio ₂ değeri < 250 ile birlikte ıveğen akciğer zedelenmesi; enfeksiyon kaynağı olarak pnömoni varlığında Pao ₂ /Fio ₂ 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	Yeterli sıvı resüsitasyonuna karşın hipotansiyon ve perfüzyon anormalliklerinin de birlikte olduğu sepsis. Her zaman değil ise de, laktik asidoz, oligoüri veya mental durumda ıveğen bir bir değışiklik ile birlikte görülebilir. İnotropik veya vazopresör ilaçları kullanan hastalar perfüzyon anormalliklerinin ölçüldüğü sırada hipotansif olmayabilirler.
Septik olmayan şok	Enfeksiyöz etiyolojisi olmayan organ yetmezliğı (renal zedelenme, hiperlaktemi) ile beraber seyreden kardiyovasküler sistem bozukluğu (38). Bakteriyel ve endotoksik olmayan bir ajan olan zimosanla uyarılan şok, etiyolojik farklılıktan dolayı “septik olmayan şok” olarak isimlendirilmektedir (42).
Septik şoka benzeyen sendrom	Semptomları septik şoka benzediğı için zimosanla oluşturulan şoka verilen isim (16).
Hipotansiyon	Sistolik kan basıncının 90 mmHg'den düşük olması veya hipotansiyona neden olabilecek bir durum olmamasına karşın, kan basıncında normalden 40 mmHg'den daha çok bir azalma olması durumu.
Çoklu organ yetmezliğı	Girişim ile homeostazın sağlanamadığı hastalarda organ işlevlerinin değışmesi.

Fio₂, inspirasyonla alınan oksijen fraksiyonu; OAB, ortalama arteriyel basınç; Pa_{CO₂}, kan kısmi karbondioksit basıncı; SIRS, sistemik enflamatuvar yanıt sendromu; SKB, sistolik kan basıncı.

2.1.3 Patofizyolojisi

Zimosanın Kullandığı Sinyal İleti Yolları

Funguslar, ya doğrudan (opsonik olmayan tanınma) ya da dolaylı olarak (opsonik tanınma) tanınmaktadır. Opsonik olmayan tanınma, mannoz reseptörleri, *dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN) veya dektin-1 gibi membran örnek tanıma reseptör (*pattern-recognition receptors*; PRR)'leri (komplemanlar, pentraksinler ya da sürfaktan proteinler A ve D gibi opsoninler) tarafından gerçekleştirilmektedir. Opsonik tanınmada ise, opsonik reseptörler tarafından tanınma gerçekleştirilmektedir. Pek çok durumda, tanınma karmaşıktır; çoklu opsonik ve opsonik olmayan reseptörleri içermektedir ve mikroorganizmaların *uptake*'i ve çeşitli mekanizmalar yoluyla öldürülmesine neden olmaktadır (43).

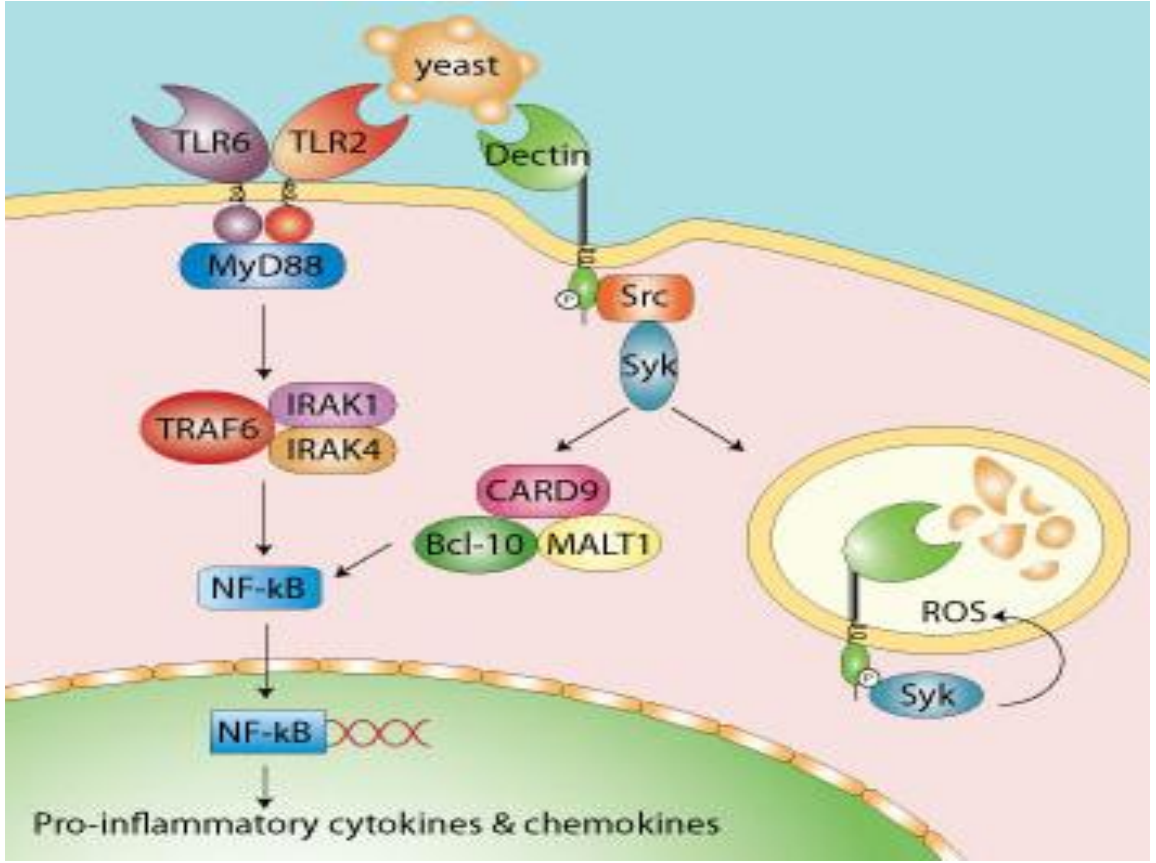
Zimosan, başlıca α -mannan/mannoproteinler ve β -glukanları içermektedir. Makrofajlar tarafından zimosanın fagositozunu α -mannan ve β -glukanların her ikisinin de çözünebilir formlarını inhibe etmesi, bu yapıların reseptörlerinin, partikülün tanınmasına ve *uptake*'ine neden olduğu ileri sürülmüştür. α -Mannan ile etkileşen mannoz reseptörünün ve β -glukan ile etkileşen dektin-1 reseptörünün mayanın ve zimosanın fagositozuna aracılık ettiği gösterilmiştir (44).

1-3- β -glukan, fungal maruziyetin iyi bir belirteçidir (45). Zimosan parçacığının fagositozu, dektin-1, *Toll-like Receptor* (TLR)2 ve partikülün çeşitli bileşenlerini tanıyan *integrin macrophage-1 antigen* (Mac-1)'in bulunduğu reseptörler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (46, 47). Enflamatuvar sitokin üretiminin uyarılmasını başlıca, TLR2 ve TLR6 heterodimerine bağlıdır (48). TLR2/6 ve miyeloid farklılaşma faktörü 88 (*myeloid differentiation factor 88*; MyD88) sinyal ileti yolunun, TNF- α üretimi gibi enflamatuvar sitokin yanıtlarını oluşturan zimosan için gerekli olduğu gösterilmiştir (49). Zimosanın doğal immün hücrelerle doğrudan temas etmesinin, TLR2 yolunu etkinleştirdiği gösterilmiştir (47).

Fagositik ve enflamatuvar sinyalleme reseptörleri arasındaki iş birliğine verilebilecek bir örnek, zimosanın tespit edilmesidir. İki lektin reseptörü (mannoz ve

dektin-1), zimosanın internalizasyonu için önemlidir. Makrofajlarda zimosan tarafından sitokinlerin ve kemokinlerin oluşturulması TLR2 ve TLR6 arasındaki ortak etkileşim aracılığıyla gerçekleşmektedir (50) (Şekil 2.2). Sonuç olarak, makrofajlarda baskın negatif TLR2 veya TLR6'nın ekspresyonu, zimosanın oluşturduğu internalizasyonu bloke etmeksizin NF- κ B'nin etkinleşmesini ve TNF- α üretimini bloke etmektedir (46).

Dektin-1, bitki ve mantarların hücre duvarında ve bazı bakterilerde bulunan karbonhidratlar olan 1,3- β -glukanları tanımaktadır ve bu moleküllerin miyeloit hücrelerindeki başlıca reseptörüdür. Dektin-1, TLR ailesi dışındaki ilk PRR'dir ve kendi hücre içi sinyallerini oluşturma yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Liganda bağlanmasının ardından bu reseptörün oluşturduğu sinyalleme, sitoplazmik immünoresseptör tirozin-temelli etkinleşme motifini (*immünoreceptor tyrosine-based activation motif*; ITAM) benzeri motif aracılığıyla, oluşmaktadır. Dektin-1 için, Dtk, sitokin üretimi ve *respiratory burst* oluşumu gibi pek çok reseptörün *downstream* hücresel yanıtlarına aracılık eden önemli bir kinazdır (27). Karbonhidrat tanıma bölgeleri ile etkileşen ligantların kimyasal yapıları geniş değişkenlik göstermekte ve mannoz reseptörleri karbonhidrat tanıma bölgeleri taşımaktadır. Mannoz reseptörleri, alveolar, peritoneal ve dolaşımdaki monositlerden farklılaşan makrofajlarda eksprese edilmektedir ve işgalci patojenlere karşı erken immün yanıt oluşumunda rol oynamaktadır (51).



Şekil 2.2. Zimosan sinyal iletisi (50). *Bcl-10*, protein B-cell lymphoma 10; *CARD*, caspase-associated recruitment domain; *IRAK*, interleukin-1 receptor-associated-kinase; *MALT*, Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1; *MyD*, miyeloid farklılaşma faktörü; *NF-κB*, nükleer faktör kappa B; *ROS*, reaktif oksijen türleri; *Syk*, dalak tirozin kinazı; *TRAF*, tümör nekroze edici faktör reseptörü ile ilişkili faktör;

Sepsis ve Septik Şok

Sepsis ve septik şok, ÇOY sendromu ve sonucunda ölüme neden olan enflamatuvar ve antienflamatuvar süreçlerin, hümmoral ve hüccresel tepkilerin, solunum, gastrointestinal, renal ve dolaşım ile ilgili işlev bozukluklarının eşlik ettiği işgalci patojenlere karşı oluşan yanıtta sistemik olayların kompleks bir zinciri olarak karşımıza çıkmaktadır (2). Septik şokta birçok damar yatağında vazodilatasyon ortaya çıkmakta ve kalp debisi uzun süre yükselmiş olarak seyretmektedir (22).

Sepsis ve septik şokun patofizyolojisinin patojenler (LPS vb.) ve konak immün-enflamatuvar yanıtları (sitokinler, reaktif oksijen ve nitrojen türleri, eikozanoitler vb.)

tarafından salıverilen dolaşımdaki maddelere bağı olduğu gösterilmiştir (2). Sepsis, enflamatuvar yolun etkinleşmesine neden olmaktadır; ayrıca proenflamatuvar ve antienflamatuvar mediyatörler arasındaki karmaşık etkileşme, sepsisin patojenezinde en önemli role sahiptir. Anahtar proenflamatuvar mediyatörler, uyarılmış makrofajlardan salıverilen TNF- α , IL-1 ve IL-6'dır. Sepsis patojenezinde rol oynayan öteki mediyatörler ise IL-8, TEF, lökotrienler ve tromboksan A₂ (TXA₂)'dir. TNF- α , sepsisin başlıca mediyatörü olarak düşünölmektedir. Çeşitli hastalıklara sahip olan hastalarda ve pek çok sağılıklı insanda TNF- α düzeylerinin artabilmesine karşın, sepsisin şiddeti ile TNF- α düzeyleri arasında bir ilişkisi bulunmaktadır. TNF- α düzeyleri, sepsisli hastalarda ortaya çıkan enflamatuvar yanıtta çok erken yükselmektedir. TNF- α salıverilmesi, hücrenel zedelenme ile ilişkili IL-6 ve IL-8 gibi öteki sitokinlerin etkinleşmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte, TNF- α , TXA₂ ve PG'ler gibi COX enzimi aracılığıyla oluşan arakidonik asit (AA) metabolitlerinin salıverilmesini uyarılmaktadır. TNF- α , endotel hücrelerinin, granülositlerin *influx*'ını kolaylaştıran adezyon moleküllerini eksprese etmelerine neden olmaktadır. Önemli antienflamatuvar mediyatörler arasında IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA), IL-4 ve IL-10 da bulunmaktadır. Bu antienflamatuvar sitokinler, proenflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe etmekte ve bazı enflamatuvar hücrelerin sentezinin *down-regülasyonuna* neden olmaktadır. Sepsiste, tüm antienflamatuvar sitokinler yüksek miktarlarda üretilmektedir. IL-10 ve IL-1RA, septik şokta sepsisten daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır (52-54).

Sepsis Kaskadı

Sepsisin gelişmesine neden olan kaskat, karmaşık ve çok etkenlidir; ayrıca çeşitli mediyatörleri ve hücreleri kapsamaktadır. Mediyatörlerin etkileri ile zararlı kaskadı başlatan çeşitli hücreler uyarılmaktadır. Başlangıçta, makrofajlar etkinleşmekte ve enflamatuvar sitokinleri üretmektedir. Bunun ardından enflamatuvar sitokinler, endotel hücreleri, lenfositler, hepatositler, nötrofiller ve trombositler gibi çok çeşitli hücreleri etkilemektedir. Çeşitli sitokinlere yanıt oluşturan ve sitokinleri üreten endotel hücreleri, sepsis nedeniyle gelişen zedelenmenin birincil mekanizmasına aracılık etmektedir.

Zedelenme başladığında endotel hücreleri ve granüositler gibi dolaşımdaki hücrelerin ve plazma bileşenlerinin enflamasyonlu dokulara girişine izin verilmektedir. Bu durum, organ zedelenmesi ile sonuçlanabilmektedir. Mikrosirkülasyon, sepsisin neden olduğu enflamasyondan etkilenmektedir. Arteriyollerin, vazokonstriktörler ya da vazodilatörlere verdiği yanıt azalmaktadır. Kapillerler daha az perfüze olmakta ve venüllerin içine doğru nötrofil infiltrasyonu ve protein sızıntısı gerçekleşmektedir. Pulmoner işlev bozukluğu, başlıca IL-8'in etkisi ile akciğer dokusuna saldırıda bulunan nötrofillerin yıkıcı mekanizmalarından kaynaklanabilmektedir (55).

Sepsiste kompleman sistemin etkinleşmesi, enflamatuvar yanıtı artıran ya da şiddetlendiren anafilaktik toksinlerin vd. maddelerin üretimini kapsayan patofizyolojik olaylarla sonuçlanmaktadır. Lökosit kemotaksisinin uyarılması, lizozomal enzimlerin saliverilmesi ile fagositozu artmış trombositlerin adezyon ve agregasyonu, nötrofillerin infiltrasyonu ve toksik süperoksit radikallerinin üretiminden kısmen kompleman sistemin etkinleşmesi sorumlu bulunmuştur. Mast hücrelerinden histamin saliverilmesi ve kapiler permeabilitede artış bu yanıtlardan birkaçıdır. Sepsisteki enflamatuvar yanıt aynı zamanda pıhtılaşma sistemi ile de doğrudan ilişkilidir. Fibrinolitik mekanizmalar antiinflamatuvar olabilmesine karşın, sepsisi şiddetlendiren proinflamatuvar mekanizmalar, aynı zamanda prokoagülan ve antifibrinolitikdir (56).

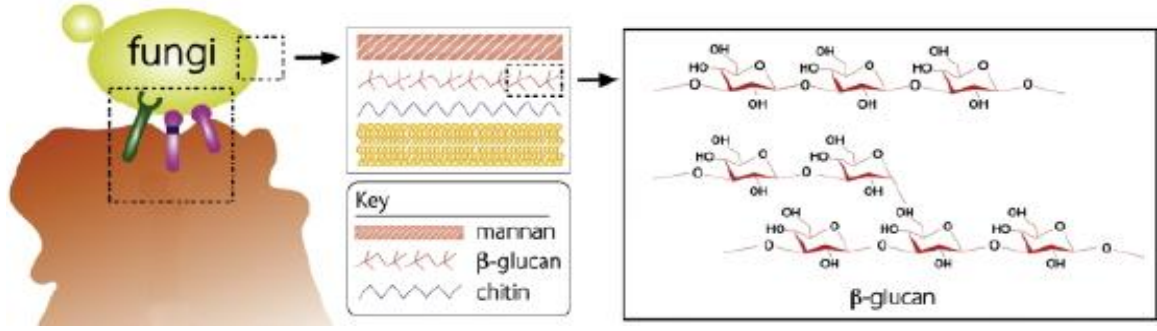
Zimosan, Fungal Sepsis ve Septik Olmayan Şok

Fungusları memeli hücrelerinden ayıran temel özellik sert bir hücre duvarına sahip olmalarıdır. Bu hücre duvarı, mantarların fiziksel korunmalarını sağlamakta ve yapı destekleri olarak görev almaktadır. Hücre duvarı, polisakkaritler gibi farklı molekülleri içermektedir. Bu patojenle ilişkili moleküler örnekler (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMP'lar) β -glukanlar, kitin ve mannopteini (mannanları) içermektedir. β -glukanlar ve mannanların memeli PRR'ler tarafından tanındığı gösterilmiştir (57).

Fungusların temel hücre duvarı yapısı, β -glukana ek olarak kitin ve mannoprotein dallarının kovalent olarak saldırdı bulunduğu, doğrusal bir β -glukan iskeletinden oluşmaktadır. Mannoproteinler, yüksek oranda glikozillenme eğilimindedirler: N-bağları, sıklıkla geniş ölçüde dallanabilen yüzlerce mannoz rezidülerinden oluşmaktadır. O-bağları, daha kısa olma eğilimindedir, ancak genellikle mannozdan oluşmaktadır. Tersine, memeli glikoproteinleri seyrek olarak mannozillenmiştir. Bu durum, konaktaki mannoz resptörleri tarafından maruz kalınan hücre duvarı mannozunun ve dolaşımdaki mannoproteinlerinin yabancı olarak tanınmasını sağlamaktadır (57).

β -Glukanlar, fungal hücre duvarının kuru ağırlığının en az %50'sini oluşturabilen ve esneklik ve mekanik dayanıklılığı sağlayan temel yapısal bileşenlerdir (58). 1,3- β -glukanlar, fungal hücre duvarı ana bileşenini oluşturan D-glukoz polimerleridir (59). β -Glukanlar, fungal, bakteriyel, viral ya da protozoal patojenler ile tümör gelişimi ya da enfeksiyona karşı korumayı sağlayan bağışıklık sistemini uyardığı bilinmektedir (60, 61). Maya ve fungus hücre duvarının farklı bileşenlerinin pulmoner enflamasyon oluşturma potansiyeli değerlendirildiğinde, 1-3- β -glukan en güçlü enflamatuvar molekül olarak gösterilmektedir ve β -glukan içeren zimosan, kısmen saf 1-3- β -glukan parçacığından daha büyük bir enflamatuvar etkinliğe sahiptir (62). β -Glukanların (63, 64) ve çözünebilir küf (*mold*) ekstrelerinin (65) farelerde ovalbumine karşı oluşan alerjik yanıtta adjuvan etkiye sahip oldukları gösterilmiştir.

Zimosan, *S. cerevisiae*'nin hücre duvarından elde edilen bir bileşendir. Çeşitli moleküler ağırlıklarda polisakkarit zincirlerinden oluşmaktadır. Bu zincir yaklaşık %73 polisakkarit, %15 protein, %7 lipit ve inorganik bileşenlerden meydana gelmektedir (10). Zimosan, başlıca 1,3- β -glukan ve 1,6- β -glukan ile α -mannan gibi çapraz bağlı polisakkaritlerden vd. az sayıda polisakkarit polimerlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.3) (7, 8). Zimosan, %50-57 oranında 1,3- β -glukan içermektedir (7). Hayvanlara enjekte edildiğinde kompleman sistem, PG'ler, TEF'ler, oksijen radikalleri ve lizozomal enzimler gibi birçok enflamatuvar mediyatörün salıverilmesine neden olarak enflamasyon oluşturmaktadır (10).



Şekil 2.3. Zimosanın yapısı: Mannan, glukon ve kitin (7, 8).

Zimosan, başlıca monosit ve makrofajlar tarafından tanınmakta ve fagosite edilmekte olup, bunun sonucunda hüresel etkinliğe neden olmaktadır (48). Zimosan makrofajları doğrudan etkinleştirmektedir ve bundan sorumlu olan yapı, β -glukandır (66). 1-3- β -glukanlar, zimosanın başlıca retiküloendotelyal sistemi uyaran bileşenleridir (67).

Zimosan, fungal sepsis (6), septik olmayan şok (15), ÇOY (21), ARDS (29), akut peritonit (21), irritabl bağırsak sendromu (*irritable bowel syndrome*; IBS) (69) gibi enflamatuvar hastalıkların patojenezinde rol oynamakta ve deneysel bir model olarak kullanılmaktadır. Zimosan, akciğer zedelenmesi oluşturmakta (70), adaptif immün yanıtı değiştirmekte (71) ve pulmoner yoldan uygulandığında, bakteriyel bir patojenin akciğer klirensini önemli düzeyde etkilemektedir (72, 73).

Mikrobiyolojik olarak bildirilen enfeksiyonların birincil olarak etkiledikleri bölgeler, solunum yolu (%21-68), karın içi bölge (%14-22) ve idrar yolu (%14-18) bölgeleridir (1). Zimosanla oluşturulan septik şoka benzeyen sendromun ayırıcı özelliği, bağırsak ve akciğerde doku zedelenmesini artıran nötrofillerin birikmesidir (16). Zimosan uygulanması, hayvan modellerinde şiddetli bir hastalık, kilo kaybı, hipotansiyon ile karaciğer, bağırsak, akciğer ve böbrekte işlevsel ve yapısal değişiklikler ile belirgin akut peritonit ve ÇOY oluşturmaktadır (30, 74).

Zimosanla oluşturulan peritonit, akut enflamasyonun iyi tanımlanmış bir modeli olarak gösterilmektedir. Zimosanın lökositler üzerindeki TLR2 ve TLR6'ya özgül bir biçimde olarak bağlanması, NF-κB'nin etkinleşmesi ve fosforilasyonunu başlatmaktadır. Bu durum, NF-κB p65 alt biriminin çekirdekte birikmesine ve ardından proenflamatuvar sitokin genlerinin ekspresyonlarının *up*-regülasyonuna neden olmaktadır (75). Zimosanla uyarılan şokta, NF-κB, TNF-α'ya ek olarak öteki pek çok sitokinin gen transkripsiyonunu düzenlemektedir. Zimosanın bileşenlerinden biri olan 1,3-β-glukan, NF-κB'yi etkinleştirebilmekte ve TNF-α'yı uyarabilmektedir (76-78). TNF-α çeşitli hücrelerde iNOS'un indüksiyonuna yol açarak, NO üretiminde artışa neden olmakta ve bunun sonucunda organ zedelenmesi oluşmaktadır. Enflamasyon ve şokta enflamatuvar sitokinler ve bakteriyel hücre duvarı bileşenleri endotel ve düz kas hücreleri ile makrofajlarda iNOS aracılığıyla NO üretimini uyarmaktadır. Şoktaki organ ve doku zedelenmesinde *in vivo* koşullarda NO miktarının artışı, damar direncinin ve kasılabilirliğinin azalmasına ve hipotansiyona neden olmaktadır (79).

Zimosan ayrıca sıçanların akciğerlerinde nitrotirozin düzeylerini artırmaktadır (80). Yapılan bir çalışmada, Sprague-Dawley sıçanlara 500 mg/kg (i.p.) zimosan uygulanmasının sonra 18. saatte öldürülen sıçanların torasik aortlarında yapılan incelemelerde, vasküler halkalardaki endotel zedelenmesinin ve vasküler hiporeaktivitenin önemli bir mekanizması olarak peroksinitrit ve poli-ADP-riboz polimeraz enzim [*Poly (ADP-ribose) polymerase*; PARS] etkinleşmesinin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (81).

Zimosan, hücre içi kalsiyum düzeylerini artırmakta ve makrofajlarda sFLA₂'yi S5⁰⁵ bölgesi üzerinden fosforilleyerek AA salıverilmesini uyarmaktadır (82-84). Periton içine zimosan enjeksiyonu, farelerde eikozanoit ve plazma sızıntısı oluşumu ile belgindir (82, 85). Aynı zamanda AA, dokazohekzaenoik asit ve linoleik asit miktarı ile FLA₂ etkinliğinin artmasını uyarmaktadır (82). Zimosan, *in vitro* koşullarda lökositlerde AA salıverilmesini (87) ve FLA₂ etkinliğini (88) uyarmaktadır. Fosfolipaz aracılığıyla membran fosfolipitlerinden salıverilen serbest AA'yı tüm prostanoitlerin genel öncül molekülü olan PGH₂'ye dönüştüren enzim COX enzimidir.

Zimosan kullanılarak bakteriden bağımsız bir biçimde gelişen ÇOY sendromu modeli ilk kez Steinberg ve ark. tarafından 1989 yılında tanımlanmıştır. Pulmoner, hepatik, renal ve bağırsak duvarı bozukluğu (*gut barrier dysfunction*) ile belirgin histopatolojik değişiklikler, ÇOY'nin gelişmesini tanımlayan kriterlerdir. Gelişen ÇOY, başlıca 3 fazdan oluşmaktadır (20):

Faz 1 Akut faz, akut genel enflamatuvar yanıtın açıkça ortaya çıktığı, ilk 48 saat içindeki bulguların olduğu fazdır. Steril peritonit gözlenmektedir.

Faz 2 3-7 gün arasında gelişen, klinik olarak hayvanların iyileşme gösterdiği süreçtir.

Faz 3 Konağın proenflamatuvar döneminde ikinci bir artış ile karakterize klinik olarak hastalığın ve organ yetmezliğinin ilerlediği fazdır. Yaklaşık 8 günde gelişmektedir.

2.1.4 Tedavisi

Sepsis hastalarında tedavinin temel hedefleri arasında tanının zamanında yapılması ve patojenin tanımlanması, enfeksiyon kaynağının hızlı bir biçimde yok edilmesi, antimikrobiyal tedavinin erken dönemde başlanması, septik şoka neden olabilecek olaylar zincirinin engellenmesi ve organ yetmezliğinin önlenmesidir. Enfeksiyonun kaynağının belirlenmesinde altta yatan herhangi bir nedene ek olarak son dönemde yapılan seyahat, yaralanma, hayvanlara maruziyet, enfeksiyon ya da antibiyotik kullanımının da değerlendirilmesi gerekmektedir. Antimikrobiyal tedaviye başlamadan önce alınan örnekleri de kültür yapılmalıdır (1).

Şok tedavisinde amaç, yaşamsal organlara yeterli perfüzyona olanak verecek derecede kan akımını sağlamaktır; bunu yaparken kan basıncı yükselebilir veya yükselmeyebilir. Gelişen bozuklukların seyrini izlemek ve tedavinin etkinliğini değerlendirmek için bazı hemodinamik (arteriyel kan basıncı, mümkün olan durumlarda

santral ve akciğer ven basıncı gibi), metabolik (kan laktat düzeyi gibi), respiratuvar (kan gazları ve pH değeri gibi) ve renal (idrara hızı gibi) parametrelerle ilgili ölçümlerinin yapılması ve elektrokardiyogramın izlenmesi gerekmektedir (22) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *Surviving Sepsis Campaign*'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar (42).

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 (süperiyör vena kava) veya karışık venöz oksijen doygunluğu 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. Yapılabiliyorsa 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 en 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 (42).

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 kullanılmamalıdır (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, vurum hacmi değişikliği vb.) ya da statik (arteriyel basınç, kalp hızı vb.) değişkenler açısından hemodinamik düzelme 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 noradrenalin'dir (derece 1B).
 3. Kan basıncının yeterli düzeyde sürdürülebilmesi 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 kullanılmamalıdır (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 (42).

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 hemoglobin derişimini 7-9 g/dl arasında olmasını sağlamak amacıyla, hemoglobin derişimi < 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. İmmüoglobulinler

1. Şiddetli sepsis ve septik şoku olan erişkin hastalarda intravenöz immüoglobulinler 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 (42).

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 kullanılmalıdır (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 kullanılmalıdır (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 kullanılmalıdır (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 (derecelendirilmemiş).
-

Çizelge 2.2 (devam). Sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok tedavisi için *Surviving Sepsis Campaign*'in yapılmasını şiddetle önerdiği yaklaşımlar (42).

O. Renal replasman tedavisi

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

Ö. 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 karşı her gün farmakoprofilaksi tedavisi alırlar (derece 1B). Farmakoprofilaksi günlük olarak subkütan düşük molekül ağırlıklı heparin uygulanmasıyla yapılmalıdır (günde iki kez fraksiyonlanmamış heparine karşı derece 1B, günde üç kez fraksiyonlanmamış heparine karşı derece 2C). Kreatinin klirensi < 30 ml/dk. ise dalteparin (derece 1A) veya renal metabolizması düşük olan bir başka düşük molekül ağırlıklı heparin (derece 2C) ya da fraksiyonlanmamış 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 geçirilmiş 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 kullanımını gibi mekanik profilaktik özellikte bir tedavi uygulanabilir (derece 2C). Risk azaldığında farmakoprofilaksiye başlanmalıdır (derece 2C).

R. Stres ülseri 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 ülseri profilaksisinde H₂-reseptör blokörlerinden 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 aç 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 düşünölmelidir (derece 2B).
3. Şiddetli sepsis/septik şok tanısından sonra ilk 7 gün içinde tek başına 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 özgöl olmayan destekleme ile beslenme uygulanmalıdır (derece 2C).

Ş. Bakım amaçlarının düzenlenmesi

1. Hasta ve ailesi ile bakımın amaçları ve prognoz tartışılmalıdır (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 başvurdan 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 çalışmalara dayanılarak); derece C, düşük (kontrol randomize klinik denemeler ile birlikte iyi yapılmış gözlemsel çalışmalara dayanılarak); derece D, çok düşük (*downgraded* kontrollü çalışmalar veya başka kanıtlara göre uzman görüşüne dayanılarak). Önerinin gücüne göre sınıflandırma: Derece 1, güçlü; derece 2, zayıf. ACTH, adrenokortikotropik hormon; ARDS, iyeğin solunum sıkıntısı sendromu; Fio₂, inspirasyonla alınan oksijen fraksiyonu; OAB, ortalama arter basıncı; PaCO₂, kan kısmi karbondioksit basıncı.

Septik şokta sepsise yol açan enfeksiyon odağının (abdominal apse, piyelonefrit, pnömoni gibi) antibiyotik uygulaması yapılarak tedavisi esastır. Ancak, ağır nötropenili hastalarda sepsisin belirgin bir enfeksiyon odağına değil, barsak ve deri florası gibi normalde enfektif olmayan kaynaklardan ileri gelebileceği unutulmamalıdır. Septik şokun gelişmesi önlenemezse ölüm oranı yüksek olmaktadır (%50 kadar). Hemodinamik durumu düzeltmek için yeğlenen ilaç dopamindir; kalbi uyararak ve periferik damar direncini azaltarak kalp debisini belirgin bir biçimde artırmaktadır. Dopamine yanıt alınmadığı durumlarda, kısa süre iv noradrenalin (NA) infüzyonu yapılabilmekte veya metaraminol enjekte edilebilmektedir. Lizozomal membranı stabilize etmeleri nedeniyle parenteral glukokortikoid uygulanması septik şokta özellikle yararlı olmaktadır. Yapılan araştırmalarda, deney hayvanlarında oluşturulan septik şokun monoklonal TNF- α antikorlarıyla düzeltilebileceği bildirilmiştir (22).

S. cerevisiae fungemisinin tedavisinde antifungal ilaçlar kullanılmaktadır. Amfoterisin B, *flucytosine*, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol fungemi tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlardır. Flukonazol ve itrakonazol tedavisine karşı direnç gelişmiş olmasına karşın *S. cerevisiae*, amfoterisin B ve fluorositozin tedavilerine duyarlıdır (31). Hematolojik hastalıklar, nötropeni ve daha yüksek bir pozitif kan kültürü sayısı, hastanın cinsiyeti, yaşı ya da antifungal ilaç ile tedavisinin süresi ne olursa olsun olumsuz sonuçlanmaktadır. Fungal enfeksiyonlarda en sık kandida türleri ile karşılaşmakta olup, invazif kandidiyaz tedavisinde amfoterisin B, azol antifungal ilaçlar ya da flukonazol+amfoterisin B gibi kombinasyon tedavileri kullanılmaktadır (1).

2.2 Dalak Tirozin Kinazı

2.2.1 Özellikleri

Protein kinazlar, sitoplazmik ve ekstraselüler bilgileri nükleusa ileten sinyal ileti yolunun birçok bölgesinde bulunan önemli enzimlerdir. Böylece gen transkripsiyonunu ve/veya deoksiribonükleik asit (DNA) sentezini etkilemektedirler. İnsan genomu yaklaşık 550 adet protein kinaz içermekte ve 130 adet protein fosfataz, farklı protein kinazların etkinliğini düzenlemektedir. Protein kinazlar 3 farklı gruba ayrılmaktadır (89): (1) Yalnızca tirozin rezidüleri için özel etkinliği olan tirozin kinazlar; (2) yalnızca serin ve treonin rezidüleri için özel etkinliği olan serin/treonin kinazlar ve (3) bu üç rezidü için etkinliği olan kinazlar.

Protein kinazlar, kendi substrat proteinlerinde bulunan tirozin, serin veya treonin rezidülerine ATP'nin fosfat grubunun aktarılmasını katalizleyerek çok sayıda sinyal ileti yolunu düzenleyen enzimlerdir ve insan enzimleri içerisinde en geniş familyaya sahiplerdir. Protein kinazların substratlarının fosforilasyonu sonucu, hücre içindeki yerleşim, stabilite ve substrat etkinliğinde değişiklikler olmaktadır. İlgili genler, pek çok durumda protein kinazlardan özellikle tirozin kinazları kodlamaktadır. Tirozin kinazlar, hücre büyümesi, farklılaşması, metabolizması ve migrasyonu ile apoptozu düzenleyen sinyal ileti yollarının etkinleşmesinde, hücre dışı sinyallerin iletiminde önemli bir rol oynamaktadır. Normal olmayan kinaz etkinliğinin kanser, otoimmün ve enflamatuvar birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (90). Kanser gibi patolojik durumlarda mutasyona uğrayan veya fazla eksprese edilen kinazlar, proliferasyonun yayılması, pro-apoptotik faktörlerin inhibisyonu, anti-apoptotik faktörlerin etkinleşmesi ve/veya anjiyojenezin yayılmasına neden olan hücresel yolların etkinleşmesinde önemli rol oynamaktadır (91, 92). Protein kinazlar, hücre sinyal ileti yollarının düzenlenmesinde anahtar mediyatör olarak görev aldıklarından, önemli ilaç hedefleri arasında bulunmaktadır; ayrıca seçici ve etkili kinaz inhibitörleri hücresel işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (90). Birçok insan kanserinde özel protein kinazların anormal etkinliği saptanmıştır ve bu durum onları kanser tedavisi için

moleküler bir hedef yapmaktadır. İmatinib, gefitinib ve erlotinib gibi düşük molekül ağırlıklı protein tirozin kinaz inhibitörleri Amerika Birleşik Devletleri'nde İlaç ve Gıda Dairesi (*Food and Drug Administration*; FDA) tarafından onaylanmıştır ve birçoğu da klinik deneme aşamasındadır (89).

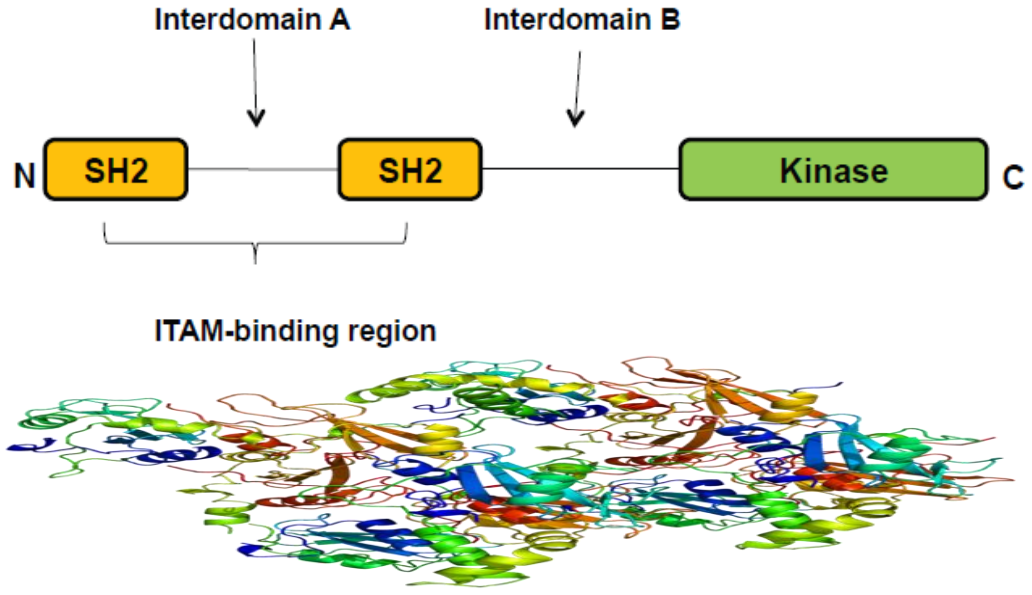
Tirozin kinazlar, reseptör ile kenetli tirozin kinazlar ve reseptör ile kenetli olmayan (sitoplazmik) tirozin kinazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Tirozin kinazların proteinleri alt gruplara ayrılabilen ekstraselüler ligant bağlama bölgeleri (reseptör tirozin kinazı) vardır ve bu enzimler sitoplazma ve/veya hücrenel nükleer bileşen (sitoplazmik) tirozin kinazlar ile çevrelenmiştir (89). Reseptör ile kenetli tirozin kinazlar intrinsik tirozin rezidülerinin fosforilasyonu; sitoplazmik tirozin kinazlar ise farklı yüzey reseptörlerinin sinyal iletisine aracılık ederler (93). İnsan genomunda 518 protein kinaz arasında 90 adet tirozin kinaz vardır. Bunların 58'i reseptör ile kenetli tirozin kinaz, 32'si ise reseptör ile kenetli olmayan tirozin kinazdır (94).

Yaklaşık 60 adet tanımlanmış reseptör ile kenetli tirozin kinaz vardır ve bunlar 20 alt gruba ayrılmıştır (94). Reseptör ile kenetli tirozin kinazlar immünoglobuline benzeyen sekans, lipofilik transmembranal segment ve katalitik bölümleri olan intraselüler karboksil terminalleri ile belirgindirler (95, 96). Reseptör ile kenetli tirozin kinazlar trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (*platelet derived growth factor receptor*, PDGFR), epidermal büyüme faktörü reseptörü (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) ve fibroblast büyüme faktörlerini içerir (23, 97).

Memelilerde 30 adet reseptör ile kenetli olmayan tirozin kinaz tanımlanmıştır ve bunlar da kendi içinde işlevsel bölüm ve sekans motiflerine göre 11 alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar arasında Src ailesi (Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck ve Fgr), Tec ailesi (Itk, Btk, Tec, Bmx ve Rlk), JAK ailesi (Jak1, Jak2, Tyk2 ve Jak3), Csk ailesi (Csk ve Ctk), Fes ailesi (Fes ve Fer), Abl ailesi (Abl, Arg), Fak ailesi (Fak ve CAKp/Pyk2/RAFTK), ve Dtk ailesi (Dtk ve ZAP-70) iyi tanımlanmış reseptör ile kenetli olmayan tirozin kinazlardır (23, 97, 98). Reseptör ile kenetli olmayan tirozin kinazlar da intraselüler sinyallerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Reseptör ile kenetli olmayan tirozin kinazlar, hücre yüzeyindeki reseptörlerle etkileşerek, reseptörle

etkinleşen sinyalleri hücre içinde amplifiye etmektedirler (93). Dtk çeşitli hücrelerde çok fazla eksprese edilmekte ve immün olmayan hücrelerde de bulunmaktayken, Zap-70'in ekspresyonu T hücresi ve doğal öldürücü hücrelerle sınırlıdır (99).

Dtk, 72 kDa ağırlığında olup, reseptör ile kenetli olmayan bir protein tirozin kinazdır. İlk kez timüs ve dalakta keşfedildiği için bu adı almıştır. Dtk ailesinin genel kimyasal yapısına bakıldığında, N-terminalinde birbirine bağlı iki adet Src homoloji 2 (SH2) bölgesi ve bir adet C-terminali kinaz bölgesinden oluşmaktadır. Bu üç alan, *interdomain A* ve *interdomain B* ile birbirlerinden ayrılmaktadır. Dtk'nin her bir bölgesinin farklı işlevi bulunmaktadır. Yinelenen SH2 bölgesi, fosforillenmiş ITAM'yi bağlamaktadır. Dtk ailesinde bulunan SH2 bölgesi T hücreleri, B hücreleri, Fc reseptörleri, makrofajlar ve doğal öldürücü hücre reseptörleri gibi immünoresseptörlerin sitoplazmik uzantısı olan ITAM'ye seçici olarak bağlanmakta ve ITAM'yi fosforillemektedir. Bu da çeşitli hücrel yanıtı indükleyen kaskatları başlatmaktadır. Dtk kinazların ITAM sekanslarına bağlanması kinaz etkinliğini artırmanın yanı sıra, bu kinazların substratlarının yanına lokalize olmasını da sağlamaktadır (25, 98). *Interdomain B* bölgesi, otoposforilasyon bölgeleri içermekte ve *downstream* sinyal ileti moleküllerinin hareketinde rol oynamaktadır. *Interdomain A* bölgesi ise, difosforile ITAM'yi kullanarak helikal sarmal yapıya bağlanmak için birbirine bağlı iki adet SH2 bölgesinin uygun konformasyonunun sağlanmasında rol oynamaktadır (100) (Şekil 2.4.).

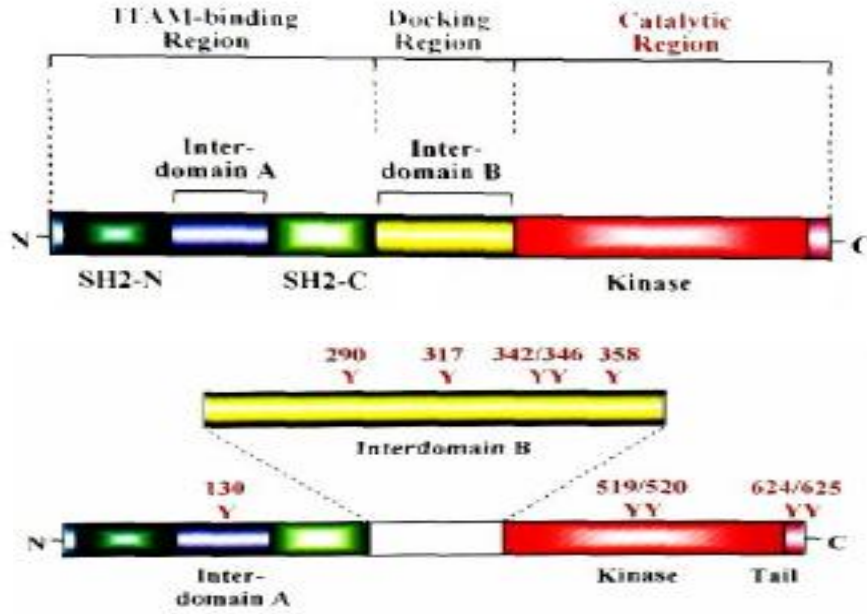


Şekil 2.4. Dtk'nin yapısı (100). *ITAM*, immunoreceptor tyrosine-based activation motif, *SH2*, *Src* homology 2.

Dtk'nin, *in vitro* kinaz tepkimesi kullanılarak tanımlanan 10 adet otofosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Her fosfotirozin rezidüsü farklı bir moleküle ilişkili olup, değişik işlevlerde rol almaktadır (98). Dtk'nin otofosforilasyon bölgeleri Tyr¹³⁰, Tyr²⁹⁰, Tyr³¹⁷, Tyr³⁴², Tyr³⁴⁶, Tyr³⁵⁸, Tyr⁵¹⁹, Tyr⁵²⁰, Tyr⁶²⁴ ve Tyr⁶²⁵'tir. Bu bölgelerin fosforilasyonu, immünoresptörler aracılı Dtk'nin etkinleşmesi ve *downstream* sinyal iletimi için gereklidir (98, 101).

Ek olarak, *interdomain A*'nın tirozin rezidüsü olmayan C-terminal bölümü, dinlenme durumunda kinaz etkinliğinin düzenlenmesi için önem taşımaktadır (24, 98, 102-104).

Dtk'nin tirozin fosforilasyonunda rol oynayan bölgeleri Şekil 2.5.'te gösterilmiştir (98, 105).



Şekil 2.5. Dtk'nin tirozin fosforilasyonunda rol oynayan bölgeleri (98). *ITAM*, immunoreceptor tyrosine-based activation motif, *SH2*, *Src* homology 2.

Dtk, çoğunlukla sitozolde yerleşmiş olmasına karşın bir bölümü de nükleusta bulunmaktadır (106). Src kinazın etkinleşmesi, Dtk'nin de etkinleşmesine neden olmaktadır. Dtk yapısal olarak farklı özelliklere sahip bir kinazdır. Örneğin Dtk, Src ailesi protein tirozin kinazlardan farklı olarak, birbirine bağlı iki SH2 bölgesine sahiptir. İmmun yanıtı ortaya çıkaran reseptörlerde ITAM'lerin bu iki SH2 gruplarıyla etkileşimi Dtk etkinleşmesine yol açmaktadır. ITAM'ler birbirinden net bir uzaklıkta olan tirozin rezidüleri ile çevrelenmiş SH2 bölgelerinin oluşturduğu özgün bağlanma bölgelerine sahiptir. ITAM'leri bu iki tirozin rezidüleri arasındaki göreceli uzaklık farklı reseptörlerde değişkenlik göstermektedir. Dtk'nin sahip olduğu bu SH2 bölgeleri tirozin rezidüleri arasındaki boşluğa uyacak biçimde konum alabilirler; çünkü bu SH2 bölgeleri yüksek konformasyonel esnekliğe sahiptir. Dtk'nin bu farklı özelliği B ve T hücre reseptörleri gibi farklı immünoresptörler ve ayrıca G protein kenetli reseptörler ile etkileşebilmesine olanak sağlamaktadır. Hematopoietik hücrelerde Dtk'nin integrinler ile etkinleştiği bildirilmiştir. İntegrinler ise ITAM'ler içermez. Bu durum Dtk'nin işlevini çok farklı biçimlerde düzenlendiğini düşündürmektedir (107, 108). İmmünoresptör etkinleşmesinin ardından, Src-ailesi kinazları, ITAM adaptör proteinini fosforillemektedir. Dtk'nin birbirine bağlı iki adet SH2 alanının ITAM'ye bağlanması,

kinaz etkinleşmesini uyarmakta ve substratın yanındaki kinazın yerini belirlemektedir. Dtk ve ZAP-70, dinlenme durumunda etkisiz durumda iken, Dtk'nın iki SH2 bölgesinin bağlanmasıyla oluşan ITAM'lerin ikili fosforilasyonunun ardından, immünoresptör bağlantısı ile etkinleşmektedir. Dtk aracılığıyla oluşan *downstream* sinyallemeden sonra oluşan immünoresptör bağlantısı, kinaz etkinliği ve her iki SH2 alanlarını gerektirmektedir. Öte yandan, fosforile ITAM'lerin yokluğunda Dtk'nin kinaz bölgeleri, bağlantı bölgelerinde tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile etkinleşebilmektedir (103).

2.2.2 Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

Dtk ile ilgili ilk çalışmalar bu tirozin kinazın hematopoietik hücrelerde eksprese edildiğini göstermiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda Dtk'nin organizmada daha geniş bir dağılıma sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Monosit/makrofajlar, mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller, nötrofiller, olgunlaşmamış T hücreleri, CD4 efektör T hücreleri, B hücreleri, doğal katil hücreler, trombositler, dendritik hücreler ve eritrositler gibi immün sistem hücrelerine ek olarak, fibroblastlar ve osteoklastlarda Dtk protein ekspresyonu; böbrekler, hepatositler ve nöronal hücrelerde ise işlevsel özellikleri olduğu belirlenmiştir. Akciğer, böbrekler ve kardiyomiyositler gibi çeşitli dokuların epitel hücrelerinde de Dtk varlığı gösterilmiştir (109). Dtk'nin hücre sinyal iletimindeki rolü ilk olarak B lenfositlerde tanımlanmıştır. Dtk, hematopoetik sistem hücrelerinin çok sayıda hücrelerini içeren pek çok hücre türünde ve az sayıda bazı epitel hücrelerinde, fibroblastlarda, hepatositlerde, damar düz kas hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve nöronal hücrelerde eksprese edilmektedir (105). Dtk, morfojeniz, hücre büyümesi, migrasyon ve yaşamda kalma gibi endotel hücresel işlevlerde kritik bir rol oynamakta ve *in vivo* damar bütünlüğünün sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır (24, 102, 106, 110, 111). Dtk'si eksik olan farelerde endotel hücrelerindeki veya damar sistemindeki bozukluk, kanama nedeniyle prenatal ölümlere neden olmaktadır.

Dtk, reseptörlerin sitoplazmik uzantısı olan ITAM'ye bağlanmaktadır. Bu motif, FcγR, yüksek afiniteli IgE reseptörü (FcεR), Igα (B hücreler), CD3ζ (T hücreler) ve integrinlerin sitoplazmik bölgelerine yerleşmiştir. Bu reseptörleri bağlayan immün

kompleksler veya antijenler, Dtk'yi etkinleştiren ITAM'leri fosforile etmektedir. Etkinleşen Dtk, MAPK'le, fosfoinozimid-3-kinaz (*phosphoinositide-3-kinase*; PI3K) ve PLC gibi çoklu sinyal ileti yolları ile enflamasyonu düzenlemektedir (112). IgE reseptörü aracılığıyla antijen tarafından uyarılan mast hücrelerinde Dtk, sFLA₂'nin etkinleşmesi için gereklidir (113). Miyeloid hücreler ile T ve epitel hücrelerinde proapoptotik ve enflamatuvar sitokin olan TNF- α , Dtk ile etkinleşmektedir. Dtk'nin TNF- α ile ilişkisi, MAPK'nin etkinleşmesinde, NF- κ B etkinleşmesine ve apoptoza yol açmaktadır. Dtk, oksitleyici koşullar altında tirozin fosforilasyonu sonucunda etkinleşmekte ve hidrojen peroksit ile oluşturulan NF- κ B etkinliğine katılmaktadır. NF- κ B etkinliği, inhibitör kappa B (I κ B)- α 'nın Dtk aracılıklı tirozin fosforilasyonu aracılığıyla oluşmaktadır. B hücrelerde oksidatif stresle indüklenen hücresel yanıtlar, hidrojen peroksit yoğunluğuna göre, nekroz, apoptoz ve mitotik blokaj gibi farklı örnekleri iletirmektedir. Proapoptotik ve yaşamda kalma yolları arasındaki denge, oksidatif strese maruz kalan bir hücrenin durumunu belirlemektedir (24).

Dtk'yi etkinleştiren ITAM motifi olmayan reseptörler için bulgular ve Dtk bağımlı sinyalleme, ilk olarak hematopoietik hücrelerde bulunmuştur ve özellikle integrinleri içermektedir (24). Yani Dtk, ITAM'leri kapsamayan integrinler tarafından da etkinleşebilmektedir (104). İntegrinler, ekstraselüler matriks proteini tarafından etkinleşen transmembranal reseptörlerdir. Kanser ve özellikle invazyon/metastaz sürecine katkıları büyük ölçüde gösterilmiştir (24). Dtk, adaptif olmayan immün sistemde iyi tanımlanmamıştır ve Dtk'nin doğal bağışıklık sistemindeki işlevinin önemli olduğu kabul edilmiştir. Dtk, immünoresseptör sinyalinde, integrinlerin nötrofil, monosit veya trombositlerin hücre yüzeyine bağlanmasında rol oynar. Dtk-eksik *mürine* makrofaj hücrelerinde yapılan çalışmalarda, Dtk'nin, Fc γ reseptör aracılıklı fagositozda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (110).

2.2.3 Fizyolojik Olaylardaki Rolü

Dtk, T hücre aracılıklı reseptör sinyal iletiminde ITAM'in fosforilasyonuna neden olarak önemli rol oynar (98, 114). Dtk'nin, B hücrelerinde bazı adaptör moleküllerin fosforilasyonuna katılarak *downstream* olayların etkinleşmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, B hücrelerinde Dtk'nin kalsiyum mobilizasyonu, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) yolu ve PI3K etkinleşmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (115). Makrofajlar ve nötrofiller gibi enflamatuvar hücrelerin immünoresptör sinyal iletiminde Dtk başlıca aracı moleküldür (116).

Dtk, mast hücreleri, makrofajlar, osteoklastlar ve nötrofillerde FcεR reseptörü sinyal iletiminde de kritik ve özgün bir rol oynar. Örneğin, lökositlerde Fcε reseptörlerinin uyarılmasının ardından gerçekleşen fagositik hücre etkinleşmesinde Dtk'nin başlıca düzenleyici molekül olduğu gösterilmiştir (117). Antijenle uyarılmış mast hücresi etkinleşmesinde ise Dtk ve fosfolipaz D'yi de içeren bir dizi intraselüler sinyal ileti kaskadının sorumlu olduğu bilinmektedir (118).

Çizelge 2.3'te Dtk'nin çeşitli hücre türlerindeki ekspresyonu ve işlevleri ile ilgili bilgiler verilmiştir (104).

Çizelge 2. 3. Dtk'nin çeşitli hücre türlerindeki ekspresyonu ve işlevleri (104).

Hücre Türü	Reseptör	Hastalıklarla İlişkisi	İşlevleri
T Hücreleri	TCR	Otoimmünite	Proliferasyon, farklılaşma, mediyatör salıverilmesi
B Hücreleri	BCR	Otoimmünite	Öncü B hücrelerinin gelişmesi ve etkinleşmesi
Eritrositler	---	Otoimmünite	Band 3 protein fosforilasyonu, glikoliz, membran transportu, hücre biçimi, kan dolaşımından hücre
Nötrofiller	FcγR1; FcγR2; FcεR1; FcγR3; İntegrin	Enflamasyon, otoimmünite	NO salıverilmesi, reaktif oksijen türleri, fagositoz
Bazofiller	FcεR1	Alerji	Degranülasyon
Eozinofiller	FcγR; FcεR	Alerji	Degranülasyon, reaktif oksijen türleri
Makrofajlar	FcγR1; FcγR2; FcεR1; FcγR3; İntegrin	Enflamasyon, alerji, otoimmünite	NO salıverilmesi, reaktif oksijen türleri, fagositoz
Mast hücreleri	FcεR1	Alerji, otoimmünite	Degranülasyon, sitokin üretimi, AA metabolizması
Dendritik hücreler	FcRs	Otoimmünite	Antijen internalizasyonu, hücre olgunlaşması, IL-12 salıverilmesi
Osteoklastlar	RANK	Kemik rezorpsiyonu	Osteoklast oluşumu
Trombositler	GpVI; GpIb-IX-V; CLEC-2; avb3	---	Agregasyon, AA metabolitleri ve serotonin salıverilmesi
Fibroblastlar			Adipositlerin farklılaşması, adipojenez
Meme kanseri hücreleri			Tümörjenezin negatif düzenleyicisi
Hepatositler	AT1; AT2	Viral hepatitle oluşan karsinogenez	ERK'in etkinleşmesi
Düz kas hücreleri	AT1; AT2	Hipertansiyon, vasküler zedelenme	Protein sentezi, hücre migrasyonu
Endotel hücreler		Hipertansiyon, vasküler zedelenme	Hücre büyümesi, migrasyonu, sağkalım, kan damarlarından lenfatik damarların ayrılması
Nöronal hücreler			Nöronal farklılaşma, nörit genişlemesi
Sinoviyositler	TNF-R	Romatoit artrit	TNF-α ile tetiklenen IL-32 salıverilmesi, metalloproteaz 3 gen ekspresyonu, matriks degradasyonu, sinoviyal sıvı düzenlenmesi
Epitel hücreler		Tümör ilerlemesi	Hücre bölünmesinin kontrolü

TCR, T hücresi reseptörü; BCR, B hücresi reseptörü; FcεR, Yüksek afiniteli immünoglobulin E reseptörü, NO, nitrik oksit; AA, arakidonik asit; RANK, receptor activator of nuclear factor-κB; AT, anjiyotensin II reseptörü; ERK, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz; TNF-R, tümör nekroze edici faktör reseptörü

2.2.4 Patolojik Olaylardaki Rolü

Dtk, yalnızca adaptif immün yanıtta hücrelerde değil, aynı zamanda otoimmün, otoenflamatuvar ve alerjik hastalıkların patolojisinde eksprese olan hücrelerde önemli bir rol oynamaktadır (100).

Dtk, B hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller gibi enflamatuvar hücrelerde immünoresptör sinyalleme anahtar mediyatörü olduğu için, birçok hastalık için tedavi hedefi olarak görülmektedir. Fc reseptörleri ve B hücre reseptörleri içeren bu immünoresptörler, alerjik ve antikor aracılıklı otoimmün hastalıklar için önemlidir ve Dtk'nin inhibisyonunun, bu hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceği ileri sürülmektedir. Pek çok çalışmada lenfoma, lösemi, karsinoma, metastaz, işlevsel gastrointestinal bozukluk, idiyopatik trombositopenik purpura, *Wiskott-Aldrich* sendromu, sistemik lupus eritematoz, *multiple sclerosis* ve anaflaktik şok gibi hastalıkların patojenezinde anahtar oyuncu olan Dtk'nin önemi vurgulamaktadır. Bu hastalıkların yanı sıra romatoid artrit, astım ve alerjik rinit gibi enflamatuvar hastalıkların patojenezinde de Dtk'nin rolü büyüktür (25).

İnsan nazal poliplerinde, Dtk *antisense* oligodeoksinükleotitleri Dtk ekspresyonunu ve kemokin üretimini baskılamaktadır. Stenton ve ark., Dtk *antisense* oligodeoksinükleotitlerinin aerosoller aracılığıyla akciğerlere dağıldığını ve *in vivo* koşullarda Dtk ekspresyonunu ve pulmoner enflamasyonu baskıladığını göstermişlerdir. Dtk ekspresyonunun düzenlenmesi, astım ve nazal polipler gibi solunum yolu hastalıklarının tedavi stratejilerinden birisi olarak yararlı olabilir (104).

Dtk ekspresyonunun düzenlenmesi, astım ve nazal polipler gibi solunum yolu hastalıklarının tedavi stratejilerinden biri olarak denenmektedir. Anjiyojenez süresince damar endotel hücrelerinin morfojenезinin kontrolünde Dtk rol oynamaktadır ve bu nedenle tümör büyümesinde anjiyojenezin inhibisyonu için Dtk güçlü bir hedef olarak gösterilmektedir. Yapılan bir çalışmada, Dtk'nin epitel hücre büyümesinin güçlü bir düzenleyicisi ve insan meme kanserinde güçlü bir tümör baskılayıcısı olarak rol oynadığı gösterilmiştir (104).

Dtk, anjiojenez süresince vasküler endotel hücrelerin morfojenезinin kontrolünde rol oynamaktadır ve tümör büyümesinde anjiojenezin inhibisyonu için potansiyel bir hedef olarak kullanılabilir (104). Ayrıca, Dtk, epitel hücre büyümesinin güçlü bir düzenleyicisi ve insan meme kanserinde potansiyel bir tümör baskılayıcı rol oynamaktadır (24).

Dtk, romatoid artritli hastaların sinoviyumunda bulunmakta ve Dtk'nin etkinleşmesi romatoid artritli hastaların fibroblast-benzeri sinoviositlerinde TNF- α tarafından oluşturulan sitokin ve metalloproteinaz üretimi için önemlidir (24).

2.2.5 İnhibitörleri

Dtk inhibitörlerinin önemi günümüzde enflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde büyüktür (100). 1991 yılında keşfedilen bu sitoplazmik tirozin kinaz (23) B hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller gibi immün hücrelerin ile osteoklastlar gibi immün olmayan hücrelerin yüzeyindeki reseptörler ile ilişkilidir (25). Bu reseptörlerin ligantlarıyla bağlanmaları Dtk'yi etkinleştirir ve Dtk'nin etkinleşmesi sitokin üretimi (T hücreleri ve monositlerde), kemik rezorpsiyonu (osteoklastlarda) ve fagositoz (makrofajlarda) gibi olayların düzenlenmesine katılır (119). Ek olarak, Dtk'nin hücre sinyal iletiminde *up stream* molekül olması onu *down-stream* olayları inhibe eden ilaçlara göre daha avantajlı kılmaktadır (120).

Dtk etkinliğinin inhibisyonu ile pek çok patoloji tedavi edilebilmektedir. Yapılan bir çalışmada inhibitör etkinliğe sahip, klinikte kullanılan ve klinik denemeleri süren 100'den çok sayıda molekül olduğu bildirilmiştir (121).

Fostamatinib, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda antitümör etkinlik gösteren, ATP ile yarışarak etki gösteren oral bir Dtk inhibitörüdür (122). Kemirgenlerde kolajenle oluşturulan artrit modellerinde, oral olarak kullanılan Dtk inhibitörü, R788 (fostamatinib disodium), hızlı bir biçimde görece daha seçici inhibitör olan R406'ya

dönüşerek etkisini gösteren bir ön ilaç olup, romatoit artrit tedavisinde güçlü antienflamatuvar etkinliğinden dolayı yararlı olabileceği gösterilmiştir (123, 124, 125).

Preklinik çalışmalarda R406, *diffuse large B cell lymphoma* (DLBCL) hücre dizisinin proliferasyonunu inhibe etmekte ve apoptoza neden olmaktadır (122). Hücre yüzeyindeki immünoglobulinlerin yüksek düzeylerde eksprese edildiği DLBCL hücre dizisi, R406'ya karşı duyarlıdır. DLBCL'li 5 hastanın örnekleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, fosforile Dtk 5 hastadan 3'ünde aşırı miktarda eksprese edildiği bildirilmiştir. R406, fare modelinde enflamasyonu azaltmış ve insanlarda oral olarak kullanılabilir (125).

Romatoit artritli hastalarda, Dtk inhibitörü R788 faz II çalışmalarında kullanılmış ve hastalığın etkinliğini azaltmıştır. Öte yandan ters etki olarak diyare, hipertansiyon ve nötropeni gözlemlenmiştir (126).

R112, topikal intranazal özellikte, stabl bir süspansiyon olarak formüle edilmiş bir Dtk inhibitörüdür. R112, çoklu doz güvenlik testlerinden (*multiple dose safety assessments*) geçtikten sonra, 319 mevsimsel alerjik rinit hastalarında 2 gün çift kör plasebo-kontrollü klinik çalışmaları yapılmıştır. R112, tüm klinik semptomlarda önemli bir azalma (plaseboya oranla %23, $p=0.0005$) sağlamış olup, alerjik rinitin akut semptomlarını düzeltmede Dtk inhibisyonunun klinik önemini ortaya koymuştur (127, 128).

Dtk inhibitörleri ve fizyolojik etkileri Çizelge 2.4.'te özetlenmiştir (25).

Çizelge 2.4. Dtk inhibitörleri ve biyolojik etkinlikleri (25).

Bileşik	Dtk inhibitörü olarak biyolojik etkinliği (IC ₅₀)
Staurosporine	13 nM
Imatinib (GleevecW, STI-571)	---
Piceatannol	---
R112	226 nM
R406	41 nM
R788	---
R343	---
BAY61-3606	7.5 nM
ER-27319	10 nM
NVP-QAB205-AA	10 nM

Piketanol, *Euphorbia lagascae* tohumlarından izole edilen trans-3,4,3',5'-tetrahidroksistilben yapısında, antiinflamatuvar, immünomodülatör ve antiproliferatif özelliklere sahip, güçlü bir Dtk inhibitörüdür (129). Piketanol kullanılarak yapılan insan miyeloit hücrelerinin tedavisinde, piketanolün, NF-κB'nin TNF-α ile indüklenen DNA'ya bağlanma etkinliğini baskıladığı gösterilmiştir (130) Bileşik keşfedildiği zaman her ne kadar dokuları seçici bir biçimde etkilediği bildirilse de son yıllarda Dtk'yi daha güçlü ve seçici olarak inhibe ettiği bilinen bileşikler keşfedilmiştir (25).

BAY 61-3606, antijenle indüklenen bronkokonstriksiyon ve hava yolu enflamasyonunu önleyerek astım tedavisinde yararlı olduğu bildirilmiştir. BAY 61-3606, imidazopirimidin analoglarının bir serisinden elde edilen bir Dtk inhibitörüdür. BAY 61-3606, Dtk'yi derişime bağımlı olarak inhibe etmiştir. BAY 61-3606, Dtk'yi yüksek seçicilikte inhibe etmektedir. Lyn, Fyn, Src, Itk ve Btk gibi diğer tirozin kinazları 4.7 μM derişimde bile inhibe etmezken, Dtk'yi 7.5 nM'da inhibe ettiği gösterilmiştir (26) (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Dtk inhibitörü BAY 61-3606'nın seçiciliği (26).

Enzimler	Ki (nM)
Dtk	7.5 ±2.5
Lyn	>5.400
Fyn	>12.500
Src	>6.250
Itk	>4.700
Btk	>5.000

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Deney Hayvanı

Deneylerde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda senkronize edilen 250-350 g ağırlığında 35 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezinden sağlanmıştır. Doku olarak kan, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arter kullanılmıştır. Bu tezde sıçanlar üzerinde yapılan tüm işlemler için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmıştır (Kurulun 28/07/2011 tarih ve 2011/50 sayılı kararı).

3.1.2 Sarf Malzemesi

β -Aktin için primer antikor (C4) (SC-47778, Santa Cruz, Amerika)

β -Gliserofosfat (G9891, Sigma, Amerika)

β -Merkaptoetanol (A1108, AppliChem, Almanya)

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

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

Amonyum persülfat (A2941, AppliChem, Almanya)

Aprotinin (A2132, AppliChem, Almanya)

Asetik asit (64-197, Climax, Türkiye)

Ayırıcı cam (*spacer plate*) (1.5 mm) (165-3312, Bio-Rad, Amerika)

BAY 61-3606 (2-[7-(3,4-dimetoksifenil)-imidazo-[1,2-c]pirimidin-5-ilamino]-
nikotinamit dihidroklorit) (Syk Inhibitor IV) (SC-202351, Santa Cruz)

Benzamidin (B6506, Sigma, Amerika)

Bradford reajanı (B6916, Sigma, Amerika)

Bromfenol mavisi (A3640, AppliChem, Almanya)

Coomassie mavisi (1.12553, Merck, Almanya)

COX-2 proteini için primer antikor (*COX-2 [29] mouse monoclonal IgG₁*) (SC-19999, Santa Cruz, Amerika)

Ditiyotritol (A2948, AppliChem, Almanya)

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

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

Dtk proteini için primer antikor (Syk (C-20), sc-929, Santa Cruz, Amerika)

Enzim proteinlerini görüntüleme çözeltisi (*ECL plus western blotting detection reagents; ECL prime western blotting detection reagents*) (RPN2132; RPN2232 Amersham, İngiltere)

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

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

Etanol (Riedel-de-Haën, Almanya)

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

Fenilmetansülfonilflorit (A0999, AppliChem, Almanya)

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

Fosforile Dtk proteini için primer antikor (Phospho-Syk (Tyr525/526) Antibody; #2711; Cell Signalling)

Fosforile I κ B- α proteini için primer antikor (*p-I κ B α (Ser 32) goat IgG*) (SC-7977, Santa Cruz, Amerika)

Fosforile NF- κ B p65 proteini için primer antikor (*p-NF- κ B p65 (Ser 536) mouse monoclonal IgG*) (SC-33020, Santa Cruz, Amerika)

Gliserol (A2926, AppliChem, Almanya)

Glisin (A1067, AppliChem, Almanya)

Hidroklorik asit (HCl) (100314, Merck, Almanya)

HEPES (A3724, AppliChem, Almanya)

I κ B- α proteini için primer antikor (*I κ B α mouse monoclonal IgG*) (SC-1643, Santa Cruz)

iNOS proteini için primer antikor (*iNOS/NOS type II mouse IgG1*) (610432, BD Transduction Lab., Amerika)

İzobütanol (A1150, AppliChem, Almanya)

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

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

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

Kültür plağı için yapışkanlı kapak (676001, Greiner, Almanya)

Löpeptin (L9783, Sigma, Amerika)

Metanol (1.06008, Merck, Almanya)

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

N,N,N',N'-Tetrametiletillenendiamin (*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine* (TEMED)) (A1148, AppliChem, Almanya)

N-1-Naftiletilediamin dihidroklorür (NED) (N9125, Sigma, Amerika)

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

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

Nitrotirozin proteini için primer antikor (*Nitrotyrosine [18G4] mouse monoclonal IgG*) (SC-65385, Santa Cruz, Amerika)

Nitrotyrosine ELISA kit (NWK-NTR01, Northwest Life Science Specialities, Amerika)

Orto-fosforik asit (H₃PO₄) (100564, Merck, Almanya)

Otomatik pipet (0-200 µl) (Rainin Pipet-Lite, Rainin, Amerika)

Otomatik pipet (100-1000 µl) (Labart, Almanya)

Otomatik pipet (100-1000 µl) (Socorex, İsveç)

Otomatik pipet (10-100 µl) (Hamilton, Amerika)

Otomatik pipet (1-10 µl) (Socorex, İsveç)

Otomatik pipet (2-20 µl) (Eagle, Amerika)

Otomatik pipet (2-20 µl) (Socorex, İsveç)

Otomatik pipet (50-200 µl) (Socorex, İsveç)

Otomatik pipet (5-50 µl) (Boeco, Almanya)

Otomatik pipet (*Stepper 411, Adjustable Repeater Pipette*) (411.5000, Socorex, İsveç)

Pipet Ucu (3686290, Greiner, Almanya)
Pipet Ucu (770291)
Pipet Ucu (mavi) (686290, Greiner)
Pipet Ucu (sarı) (3685290, Greiner, Almanya)
Polistiren tüp (15 ml) (188271, Greiner, Almanya)
Polistiren tüp (50 ml) (227261, Greiner, Almanya)
Ponceau S (A1405, AppliChem, Almanya)
Potasyum klarür (KCl) (1.04936, Merck, Almanya)
Primer antikora özgü sekonder antikor (*goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4301, Amersham)
Primer antikora özgü sekonder antikor (*sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4201, Amersham, İngiltere)
Serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye)
Sıçan (Wistar, Erkek, 250-350 g, Türkiye)
Sığır serum albümini (SSA) (A7906, Sigma, Amerika)
Sıvı azot (125 L) (Lindgaz, Türkiye)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (A2263, AppliChem, Almanya)
Sodyum klorür (NaCl) (1.06404, Merck, Almanya)
Sodyum nitrit (S2252, Sigma, Amerika)
Sodyum ortovanadat (A2196, AppliChem, Almanya)
Sodyum pirofosfat (A2197, AppliChem, Almanya)
Sülfanilamit (SA) (1.11799, Merck, Almanya)
Sülfosalisilik asit (A0416, AppliChem, Almanya)
TNF- α ELISA Kit (BMS622, Bendermed, Amerika)
Trikloroasetik asit (A1431, AppliChem, Almanya)
Tris (A2264, AppliChem, Almanya)
Tris baz (A2264, AppliChem, Almanya)
Tween 20 (A4974, AppliChem, Almanya)
Yağsız kurutulmuş süt tozu (YKST) (*non-fat dry milk*) (A0830, AppliChem, Almanya)
Zimosan A (*Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen zimosan, Z4250, Sigma)

3.1.3 Teçhizat

- Çalkalayıcı (*red rotor orbital shaker*) (PR500-176, Hoefler, Almanya)
- Derin dondurucu (dik tip, -80°C) (Ilshin, Kore)
- Derin dondurucu (dikey, 240 L, -20 °C) (2041 ND, Arçelik)
- Derin donduruculu buzdolabı (Model 1060 T, Arçelik, Türkiye)
- Derin donduruculu buzdolabı (Model 4240 T FH, Arçelik, Türkiye)
- Elektroforez sistemi (*mighty small II, 10x8 cm, complete*) (SE250-10A-.75, Hoefler, Almanya)
- Elektroforez sistemi (*mini-protean tetra 1 mm*) (165-8001, Biorad, Amerika)
- Güç desteği (*power supply*) (*EV 265 consort power supply, 230 VAC*) (PS265-230V, Hoefler, Almanya)
- Hassas terazi (Model APX 200, Denver, Almanya)
- Homojenizatör (Ultra-Turrax, T25, Ika, Almanya)
- Jel dökümentasyon ve analiz sistemi (*EC3-CHEMI HR imaging system*) (Ultra-Violet Products, UVP, İngiltere)
- Kan basıncı kayıt sistemi ve ısıtıcılı bölme (*Indirect Blood Pressure Recorder System*, Model BPHR 9610, Commat İletişim Ltd., Türkiye)
- Kesintisiz güç kaynağı (AC/DC, 1 kVA)
- Kesintisiz güç kaynağı (AC/DC, 3 kVA)
- Manyetik karıştırıcı (*BOE 8056500 magnetic stirrer*) (MMS-3000, ACAdapter 220V, Boeco, Almanya)
- pH metre (Orion 3 Star, Thermo, Amerika)
- Plak okuma cihazı (405, 450, 490, 550 ve 630 nm olmak üzere beş adet filtrelili) (ELX800, Biotek, Türkiye)
- Sıvı azot tankı (2 L) (Isotherm, Almanya)
- Sıvı azot tankı (21.5 L) (TR 21, Air Liquide, Fransa)
- Soğutmalı santrifüj (Model Mikro 22R, Hettich, Almanya)
- Tarak (*Comb*) (10 wells, 1.5 mm) (165-3365, Bio-Rad, Amerika)
- Ultrasonik banyo (ısıtmalı, frekans ayarlı) (Elmasonic S 40 / (H), Elma, Almanya)
- Üstten kefeli terazi (Model SPB 52, Scaltec, Almanya)

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

3.2 Yöntem

3.2.1 *In Vivo* Çalışmalar

Dtk inhibitörü BAY 61-3606'nın zimosanla oluşan sıçanlardaki etkisini araştırmak amacıyla aşağıda belirtilen gruplarda *in vivo* çalışmalar yapılmıştır:

- Grup 1. Kontrol grubu olarak serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) uygulanan sıçanlar (n= 8)
- Grup 2. Septik olmayan şok grubu olarak zimosan (500 mg/kg, i.p.) (12) uygulanan sıçanlar (n= 8)
- Grup 3. Seçici Dtk inhibitörü BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.) uygulanan sıçanlar (n= 4)
- Grup 4. Zimosan ile birlikte BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.) uygulanan sıçanlar (n= 8)

Ortalama arter basıncı (OAB) ve kalp hızı (KH) ölçümleri için, sıçanların kuyruğundan ölçüm yapılmasına olanak veren kan basıncı kayıt sistemi kullanılmıştır. Sıçanlara serum fizyolojik veya zimosan enjeksiyonundan hemen önce ve uygulandıktan 1, 2, 3 ve 4 saat sonra OAB ve KH kayıtları alınmıştır. BAY 61-3606'nın etkili dozuna karar vermek için yapılan ön deneylerde bu bileşik 0.3, 1 ve 3 mg/kg dozlarda denenmiş ve 3 mg/kg en etkili doz olarak tespit edilmiştir. Serum fizyolojik veya zimosan enjeksiyonundan 1 saat sonra BAY 61-3606 uygulanmasının ardından 1., 2. ve 3. saatlerde OAB ve KH kayıtları alınmıştır. OAB ve KH kayıtları alınırken sıçanın ölçüm kabininde en fazla 5 dakika kalmasına dikkat edilmiştir.

Deneyler sonunda, sıçanların başı sert bir zemine hızla vurularak sersemletildikten sonra hızla boyundan kanatılarak ötanazi yapılmasının ardından kan, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterleri alınmıştır. Alınan kandan

hazırlanan serum örnekleri nitrit düzeyleri ölçülmesine kadar -20°C'de dondurularak saklanmıştır. İzole edilen dokular nitrit, 6-keto-PGF_{1α}, nitrotirozin, TNF-α ve toplam protein düzeyleri ile MPO etkinliği, ayrıca Dtk, fosforile Dtk, IκB-α, fosforile IκB-α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, iNOS, COX-2, nitrotirozin ve aktin protein ekspresyonlarının ölçülmesi amacı ile doku homojenatları hazırlanincaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Zimosanın çözücüsü olarak serum fizyolojik kullanılmış. Zimosanın üzerine serum fizyolojik eklenmesinin ardından 1 saat su banyosu ve 30 dakika santrifüj uygulandıktan sonra çökelek kısmı süspansiyon olarak deneylerde kullanılmıştır. BAY 61-3606, %5 etanol içeren serum fizyolojik içerisinde çözülmüştür.

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

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 (132). Ayrılan serum örnekleri kullanıncaya dek -20°C'de dondurularak saklanmıştır. Dondurulmuş dokular ise sıvı azot ile porselen havanda toz biçimine getirildikten sonra doku tozları üzerine 1-2 ml (sırasıyla; torasik aort ve süperiyor mezenterik arter; kalp ve böbrek için) HEPES tamponu (mM: HEPES 20 [pH 7.5], β-gliserofosfat 20, sodyum pirofosfat 20, benzamidin 10, ditiyotritol 1, sodyum ortovanadat 0.2, sodyum florür 20, EDTA 2, löpeptin 20 ve aprotinin 10) eklenerek örnekler homojenize edilmiştir (132).

Homojenatlar 23.910 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar toplanarak, üzerlerine 50-100 µl tris (50 mM, pH 8.0)+KCl (0.5 M) (sırasıyla; torasik aort ve süperiyor mezenterik arter; kalp ve böbrek için) çözeltisi eklenmiş, ardarda 2 kez 15 saniye su banyosu sonikatöründe bekletilmiş ve 23.910 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar kriyoprezervatif tüplere bölünerek -80°C'de dondurularak saklanmıştır.

3.2.3 Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi

Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda toplam protein düzeyi Coomassie mavisi yöntemi ile ölçülmüştür (132-134). Standart olarak kullanılan SSA'nın %1 ağırlık/hacim derişiminde olacak biçimde distile suda hazırlanan stok çözeltilerinden, 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 rejanı eklenip bu çözeltilerden alınan 100 µl örnek (aynı örnekten 2 kez olmak üzere) kültür plağına aktarıldıktan hemen sonra örneklerin verdikleri absorbanslar 630 nm'de kültür plağı okuyucuda okunmuştur. SSA derişimlerine karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, SSA'nın kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemler yardımıyla, örneklerde okunan absorbans değerlerinden protein düzeyleri tespit edilmiştir.

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

Serum ve doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda iNOS etkinliğinin bir göstergesi olarak nitrit düzeyleri, ortamda nitrit varlığında oluşan pembe rengin spektrofotometrik olarak 550 nm'de ölçülmesi prensibine dayanan diazotizasyon yöntemi (Griess tepkimesi) ile ölçülmüştür (135, 136). Serum örnekleri ölçümden hemen önce 1:5 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan sodyum nitritin 2 mM biçiminde distile suda hazırlanan stok çözeltilerinden, distile su ile 1 ml hacimde dizi dilüsyonları (0.25-100 µM) hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden veya serum ya da doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda alınan 50 µl örnek, 50 µl SA (25 µl) ve NED (25 µl) reaktifi ile düz tabanlı 96 kuyucuklu kültür plağında karıştırılmıştır. Örneklerin oda sıcaklığında 15 dakika bekledikten sonra verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda 550 nm'de okunmuş

ve sodyum nitrit miktarlarına karşı elde edilen absorbanlardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, sodyum nitritin kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorban değerlerinden nitrit miktarları tespit edilmiştir.

6-keto-PGF_{1α}, COX-2 etkinliğinin bir göstergesi olarak, nitrotirozin, peroksinitrit oluşumunun bir göstergesi olarak ve proenflamatuvar sitokinlerden TNF-α düzeyleri de enflamasyonun bir göstergesi olarak uygun ELISA kitleri kullanılarak prospektüslerinde yazıldığı biçimde ölçülmüştür. Enflamasyonun bir başka göstergesi olarak MPO etkinliği ise, hidrojen peroksite homojenat tarafından oksitlenerek o-dianozidini indirgemesi ve indirgenmiş o-diazonidinin 410 nm'de ölçülmesi prensibine dayanan bir yöntem ile ölçülmüştür (137).

3.2.5 Doku Homojenatlarında Dtk, Fosforile Dtk, IκB-α, Fosforile IκB-α, NF-κB p65, Fosforile NF-κB p65, iNOS, COX-2 ve β-Aktin Protein Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Dokularda Dtk, fosforile Dtk, IκB-α, fosforile IκB-α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, iNOS, COX-2 ve β-aktin protein ekspresyonları daha önce tanımlanan yöntemlere göre ölçülmüştür (13, 14, 133, 138). 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 akrilamid 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 3 µl molekül ağırlığı belirteci, son çukura ise 10 µl Laemmli örnek tamponu ve diğer çukurlara da 30 µl örnek eklenmiştir. Elektroforez tampon çözeltisi olarak 500 ml distile su içinde 15 g tris, 72 g glisin ve 5 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında seyreltilerek pH değeri 8.3'e ayarlanmıştır.

465 µl HEPES tamponu içinde kalp ve böbrekte 117 µg, torasik aortta 63 µg ve SMA'da 54 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-merkaptoetanol 10 ml distile su içinde) içeren doku homojenatlarından hazırlanan ve -80°C'de dondurulmuş olan süpernatantlar çözündükten sonra 2 dakika kaynar su içinde bekletilmiş, 4°C'de 23.810 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, 30 µl'de kalp ve böbrek için 117 µg; torasik aort için 63 µg; süperiyor mezenterik arter için 54 µg toplam protein olacak biçimde üst jelde oluşturulan çukurlara eklenmiş ve %10 SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile yaklaşık 2 saatlik bir sürede ayrılmıştır.

Proteinlerin jelden nitroselüloz membrana aktarılması işlemi yarı-kuru aktarma (*semi-dry transfer*) yöntemi kullanılarak 4,5 saatlik bir sürede gerçekleştirilmiştir. 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 etanol (%20) eklenmiştir.

Jellerin proteinleri özgül olmayan bir biçimde geri dönüşümsüz olarak bağlayan Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanması sonucu proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığı tespit edilmektedir (139). Coomassie mavisi çözeltisi, 1 L 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 boyanarak ve distile su ile yıkanmıştır (140).

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 L distile içinde, pH 7.4) ile yıkanarak, YKST içeren TTÇ ile bloke edilecek ve primer antikorlar ile 4°C'de 12 saat inkübe edilmiştir. Membranların, bağlanmamış proteinler 3 kez 5 dakika TTÇ ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmelerinin ardından 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkanmıştır. Bazı deneylerde kullanılan membranlar, 3 kez 5 dakika TTÇ ile yıkandıktan sonra, %2 YKST + %2 SSA karışımı ile oda sıcaklığında 20 dakika bloke edilmiş, 3 kez 10 dakika TTÇ ile yıkanmış ve β -aktin protein için primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edilmeye hazır duruma getirilmiştir.

Jel dokümantasyon ve analiz sistemi ile görüntülenen immünoreaktif proteinlerin yoğunluk analizi bir yazılım programı (*NIH image software; Image J 1.46r, Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*) kullanılarak yapılmıştır. Dansitometrik analizlerde β -aktin protein ekspresyonu standart olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kontrol grubunun yüzdesi olarak hesaplanmış ve grafiklere aktarılmıştır.

3.2.6 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak 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 *In Vivo* Çalışmalar

4.1.1 Zimosanın OAB ve KH Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya zimosan uygulanmasından sonra OAB ve KH'de oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

Sıçanlara serum fizyolojik uygulanmasından sonra 4 saat içinde OAB ve KH değerlerinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir ($P > 0.05$). Öte yandan, zimosan uygulanmasından sonra, OAB birinci saatte düşmeye başlamış ve bu düşüş kan basıncının ölçülebildiği beşinci saate dek sürmüştür. Ancak, dört ve beşinci saatlerde ölçülen OAB değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmediğinden ($P > 0.05$), daha sonraki deneyler zimosan uygulanmasının ardından 4 saat sonra sonlandırılmıştır. Bununla birlikte, zimosan uygulanmasıyla azalan OAB'ye paralel olarak KH'de bir artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). Sıçanlara BAY61-3606'nın çözücüsü %5 etanol içeren serum fizyolojik uygulanmasından sonra 4 saat içinde OAB ve KH değerlerinde ise bir değişiklik görülmemiştir (OAB: 124 ± 0.74 , 124 ± 1.03 , 123 ± 1.01 , 124 ± 0.86 ve 125 ± 0.92 mmHg; KH: 337 ± 19.30 , 346 ± 23.29 , 326 ± 12.45 , 329 ± 16.83 ve 337 ± 15.95 atım/dakika, sırasıyla 0., 1., 2., 3. ve 4. saatler, Çizelge 4.1'deki kontrol grubunun OAB ve KH değerleri ile karşılaştırıldığında, $P > 0.05$).

OAB ve KH'de oluşan değişikliklerin birinci saatten itibaren kontrol grubundan anlamlı bir biçimde farklı olması, sıçanlarda zimosan ile septik olmayan şok modelinin oluşturulduğunu göstermektedir.

4.1.2 Zimosan ile Azalan OAB ve Artan KH Üzerinde BAY 61-3606'nın Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya zimosan enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanan BAY 61-3606 ile OAB ve KH'de oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

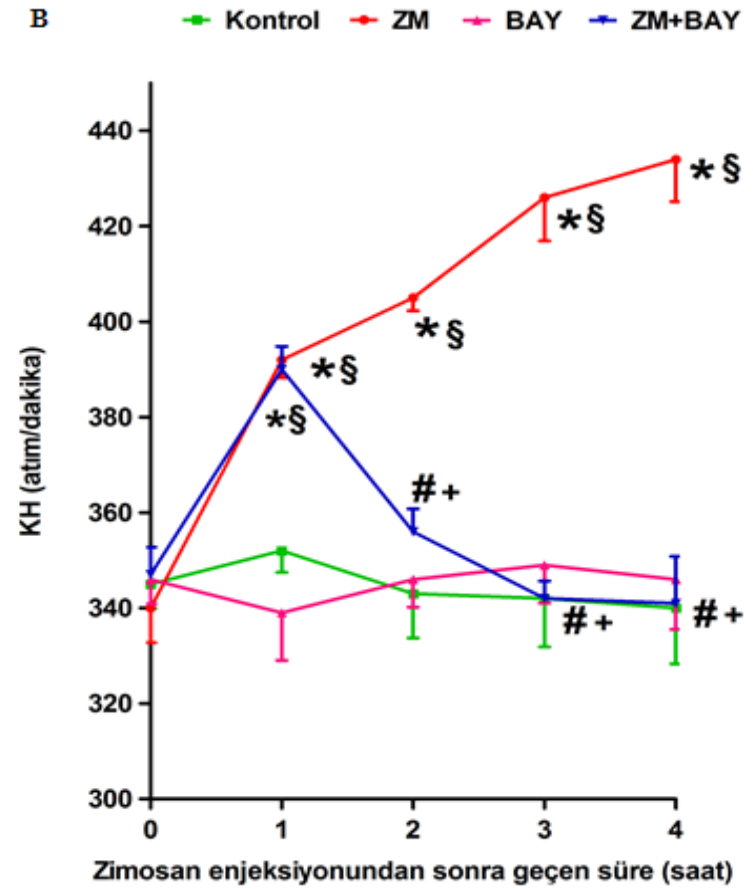
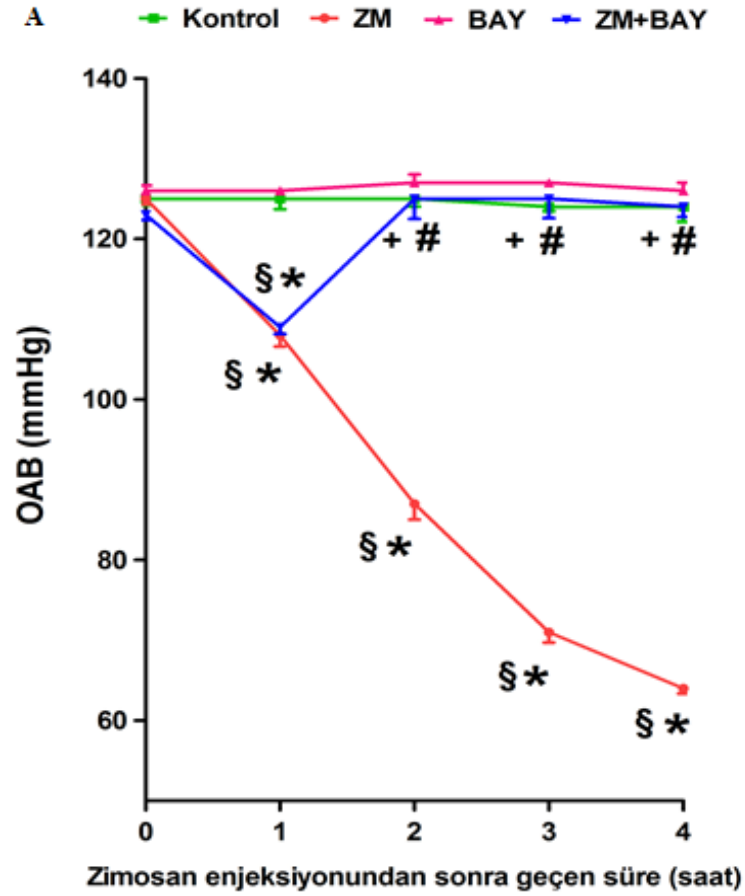
Zimosan enjeksiyonundan 1 saat sonra OAB'de oluşan azalma ve KH'deki artma, BAY 61-3606 uygulanmasından sonraki birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). Zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanan grupta ölçülen OAB ve KH değerleri arasındaki farklılık birinci saat değerleri dışında kontrol veya BAY 61-3606 gruplarından farklı değildir ($P > 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında OAB ve KH değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 1 saat sonra başlayan hipotansiyona ve KH'deki artmaya Dtk'nin katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımız, ayrıca, zimosanın OAB ve KH'de neden olduğu değişikliklerin Dtk inhibitörü BAY 61-3606 ile önlenebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanlarda BAY 61-3606'nın OAB ve KH üzerindeki etkisi.

	ZM uygulanmasından sonra geçen süre (saat)				
	0	1	2	3	4
Kontrol					
OAB	125±0.77 (n= 8)	125±1.30 (n= 8)	125±0.97 (n= 8)	124±0.57 (n= 8)	124±1.88 (n= 8)
KH	345±5.07 (n= 8)	352,00±4.54 (n= 8)	343,00±9.27 (n= 8)	342,00±10.15 (n= 8)	340±11.68 (n= 8)
ZM					
OAB	125±0.69 (n= 8)	108±1.39 (n= 8)* [§]	87±1.98 (n= 8)* [§]	71±1.30 (n= 8)* [§]	64±0.64 (n= 8)* [§]
KH	340±7.28 (n= 8)	392±3.69 (n= 8)* [§]	405±2.73 (n= 8)* [§]	426±9.09 (n= 8)* [§]	434±8.81 (n= 8)* [§]
BAY					
OAB	126±0.51 (n= 4)	126±0.56 (n= 4)	127±1.03 (n= 4)	127±0.48 (n= 4)	126±1.01 (n= 4)
KH	346±5.15 (n= 4)	339±9.96 (n= 4)	346±5.82 (n= 4)	349±7.97 (n= 4)	346±10.50 (n= 4)
ZM+ BAY					
OAB	123±0.63 (n= 8)	109±3.52 (n= 8)* [§]	125±2.52 (n= 8) ^{#+}	125±2.42 (n= 8) ^{#+}	124±1.29 (n= 8) ^{#+}
KH	347±5.79 (n= 8)	390±4.80 (n= 8)* [§]	356±4.79 (n= 8) ^{#+}	342±3.66 (n= 8) ^{#+}	341±9.84 (n= 8) ^{#+}

BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; KH, kalp hızı; OAB, ortalama arter basıncı, ZM, zimosan. BAY (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya zimosan (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım/dakika olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. n kullanılan sıçan sayısını ifade etmektedir. *Kontrol ve [#] ZYM 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; $P < 0.05$).



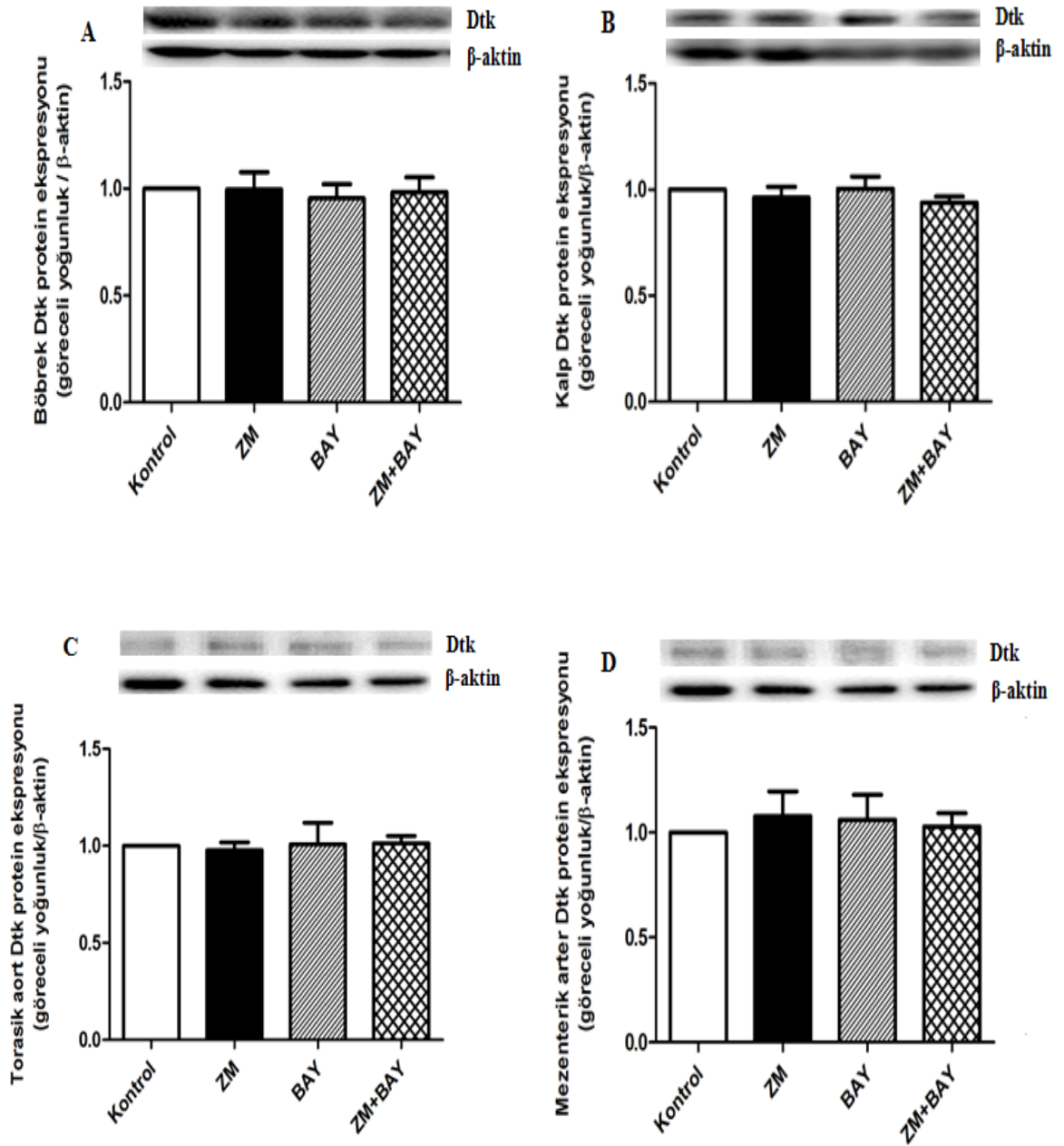
Şekil 4.1. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanlarda BAY'ın (A) OAB ve (B) KH üzerindeki etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; KH, kalp hızı; OAB, ortalama arter basıncı; ZM, zimosan. BAY (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. 4-8 adet sıçandan elde edilen OAB değerleri mmHg ve KH değerleri atım hızı/dakika olarak ortalama±ortalamaların standart hatası biçiminde gösterilmiştir. * Kontrol ve # ZM 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 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Dtk Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi

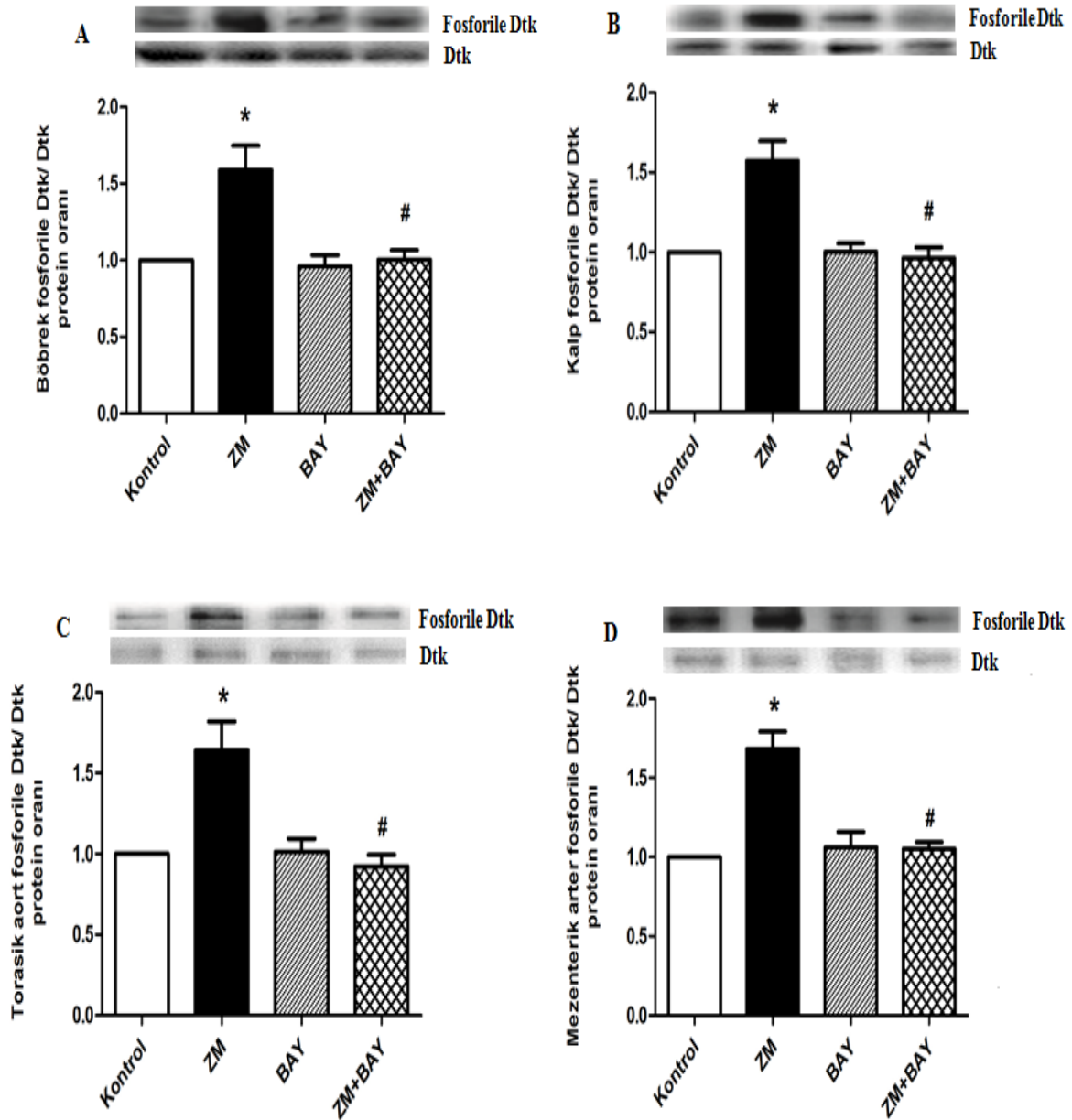
Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde Dtk protein ekspresyonu ve fosforilasyonu ile ilgili bulgular Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen Dtk protein ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmezken ($P > 0.05$), fosforile Dtk/Dtk protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). Zimosanın fosforile Dtk/Dtk protein oranında neden olduğu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında doku Dtk ekspresyonu ve fosforile Dtk/Dtk protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde Dtk protein ekspresyonu ve etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın neden olduğu Dtk protein ekspresyonu ve etkinliğindeki artış BAY 61-3606 ile önlenebilmektedir.



Şekil 4.2. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde Dtk protein ekspresyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; Dtk, dalak tirozin kinazı; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterler izole edilmiştir. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's *t* veya Mann-Whitney *U* testi; $P < 0.05$).



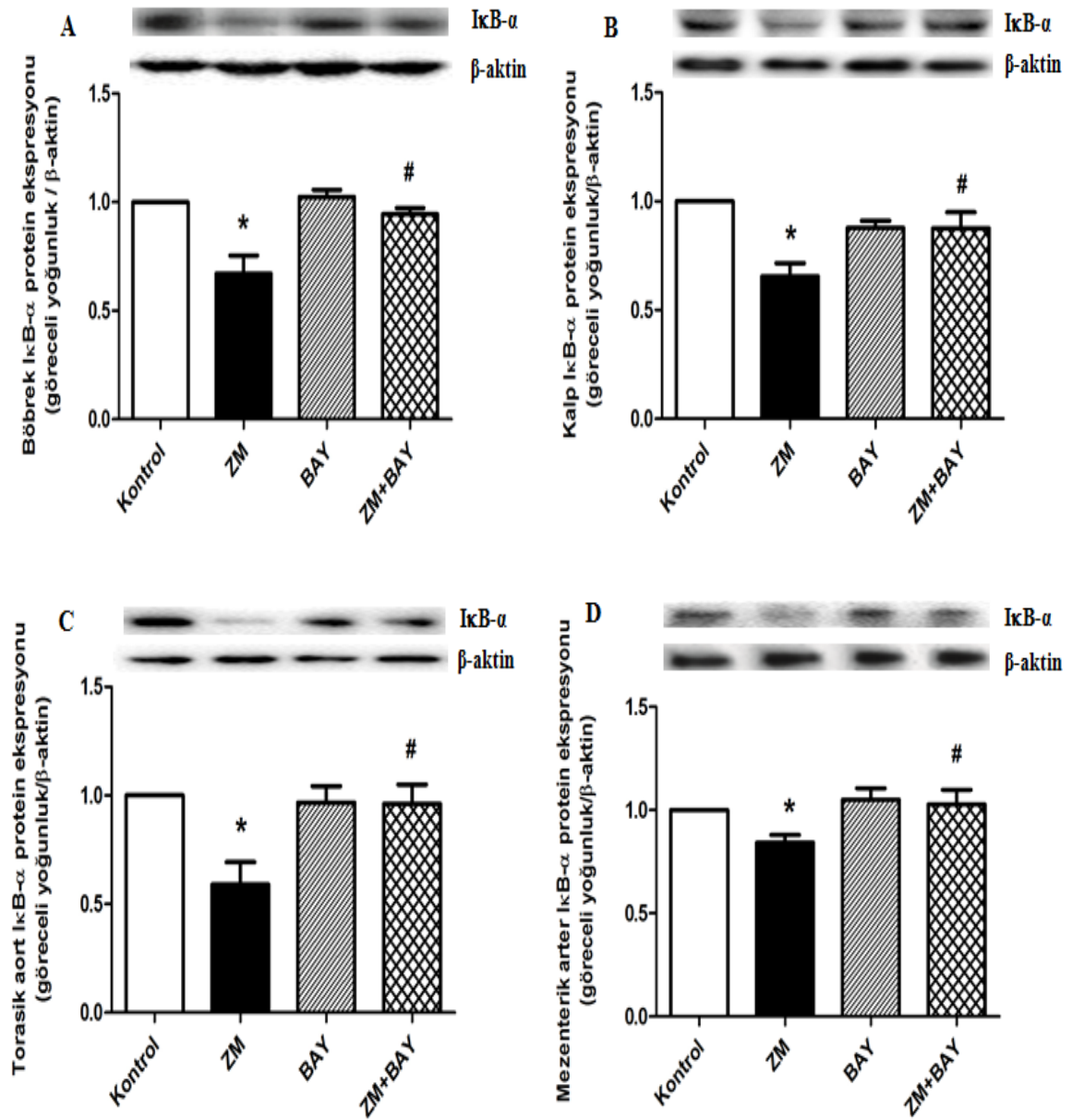
Şekil 4.3. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde Dtk protein fosforilasyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; Dtk, dalak tirozin kinazı; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.3 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın IκB-α Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi

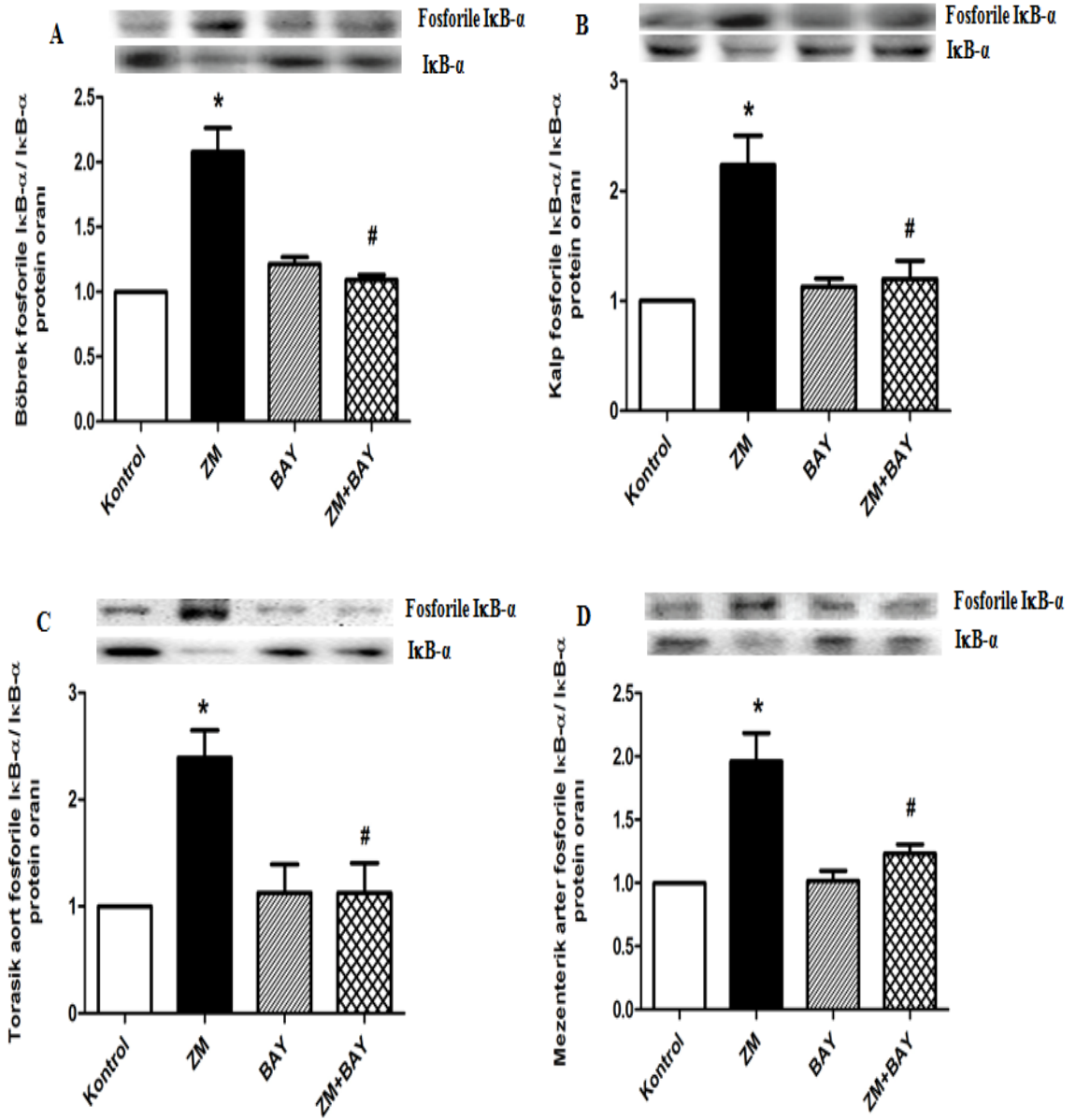
Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein ekspresyonu ve fosforilasyonu ile ilgili bulgular Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'da verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen IκB-α protein ekspresyonu azalırken ($P < 0.05$), fosforile IκB-α/IκB-α protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). Zimosanın IκB-α protein ekspresyonunda neden olduğu azalma fosforile IκB-α/IκB-α protein oranında neden olduğu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında doku IκB-α ve fosforile IκB-α/IκB-α protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein ekspresyonunun azaldığını ve etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın neden olduğu IκB-α protein ekspresyonundaki azalma ve etkinliğindeki artış BAY 61-3606 ile önlenebilmektedir.



Şekil 4.4. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein ekspresyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; IκB, κB inhibitörü; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



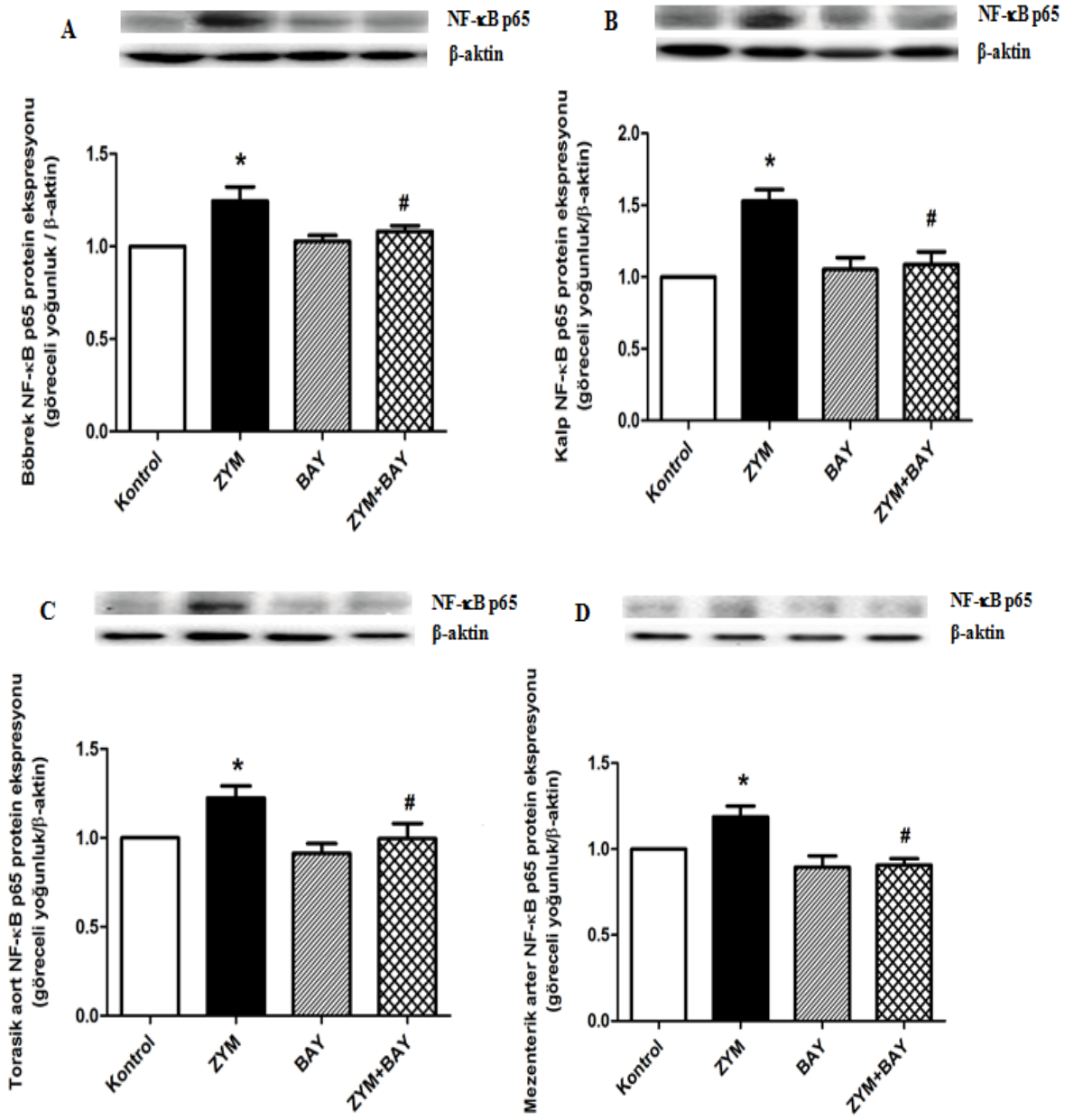
Şekil 4.5. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde IκB-α protein fosforilasyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; IκB, κB inhibitörü; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.4 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın NF-κB p65 Protein Ekspresyonu ve Etkinliği Üzerindeki Etkisi

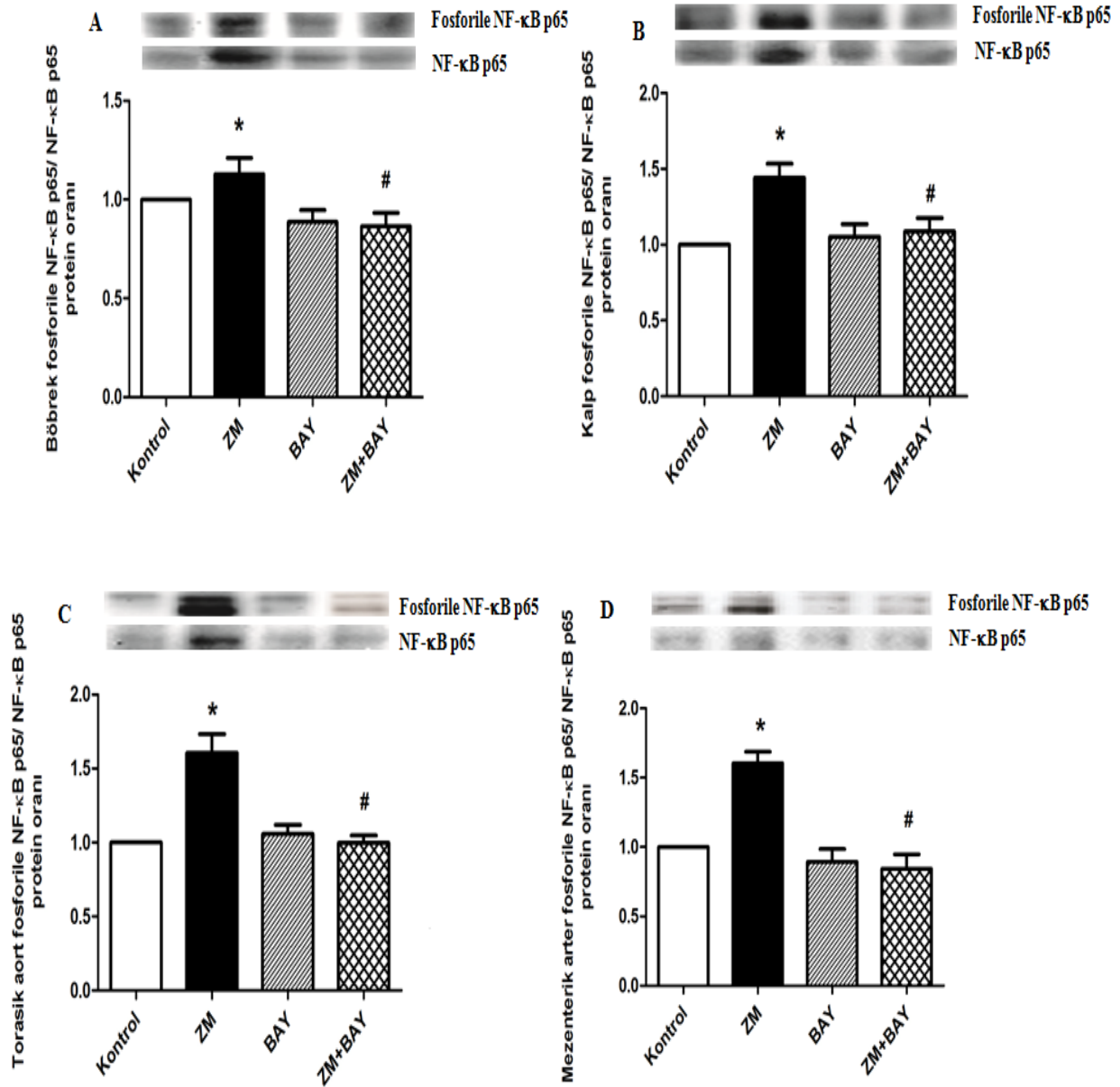
Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB p65 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu ile ilgili bulgular Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). Zimosanın NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında neden olduğu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında doku NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB p65 protein ekspresyonunun ve etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın neden olduğu NF-κB p65 protein ekspresyonu ve etkinliğindeki artış BAY 61-3606 ile önlenebilmektedir.



Şekil 4.6. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB protein ekspresyonları üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. . BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; NF-κB, nükleer faktör κB; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.7. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde NF-κB protein fosforilasyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. . BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; NF-κB, nükleer faktör κB; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

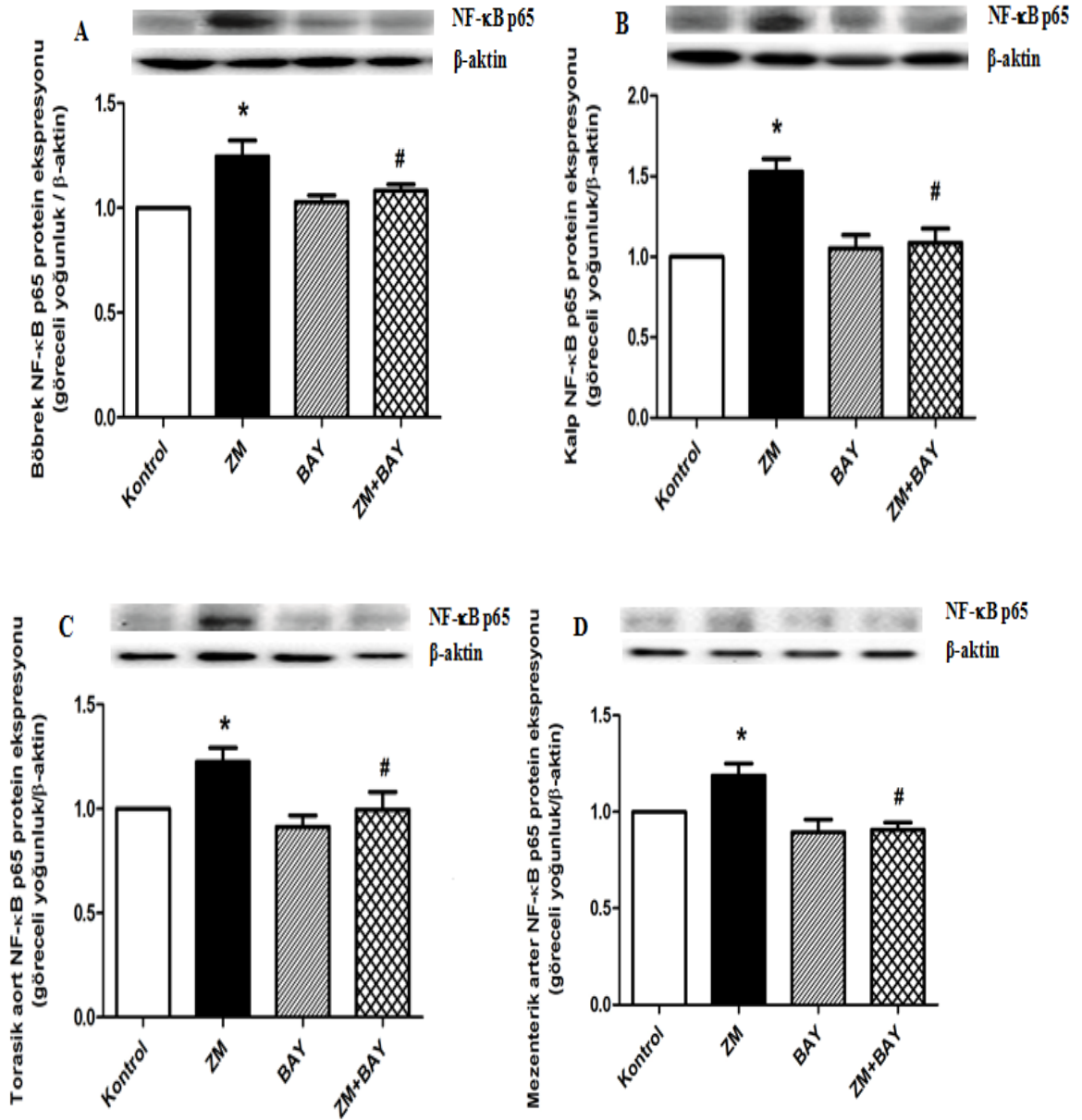
4.5. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın iNOS Protein Ekspresyonu ile Nitrit ve Nitrotirozin Düzeyi Üzerindeki Etkisi

4.5.1. Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın iNOS Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde iNOS protein ekspresyon düzeylerinde oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Şekil 4.8'da verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen iNOS protein ekspresyon düzeylerinde artış gözlenirken, bu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında doku iNOS protein ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde iNOS protein ekspresyon düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın doku iNOS protein ekspresyonunda neden olduğu artış BAY 61-3606 ile önlenabilmektedir.



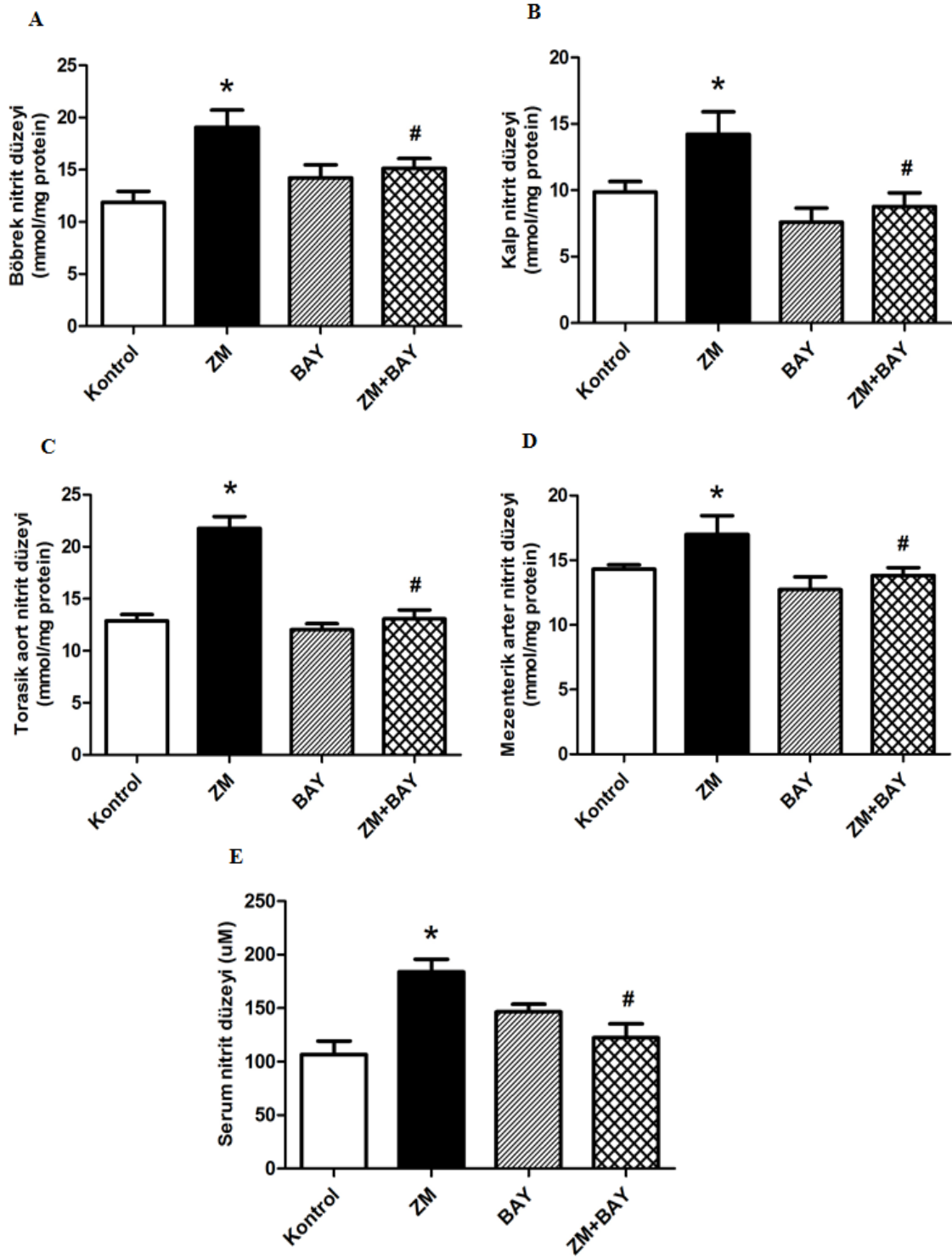
Şekil 4.8. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde iNOS protein ekspresyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.)(septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. *In vivo* deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's *t* veya Mann-Whitney *U* testi; $P < 0.05$).

4.5.2 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Serum ve Doku Nitrit Düzeyi Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra ayrılan serum örnekleri ve izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nitrit düzeylerinde oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Şekil 4.9'da verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların serum, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen nitrit düzeylerinde artış gözlenirken, bu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında serum ve doku nitrit düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra serum, böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde NO oluşumunun bir göstergesi olarak ölçülen nitrit düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, zimosanın NO oluşumunda neden olduğu artış BAY 61-3606 ile önlenmektedir.



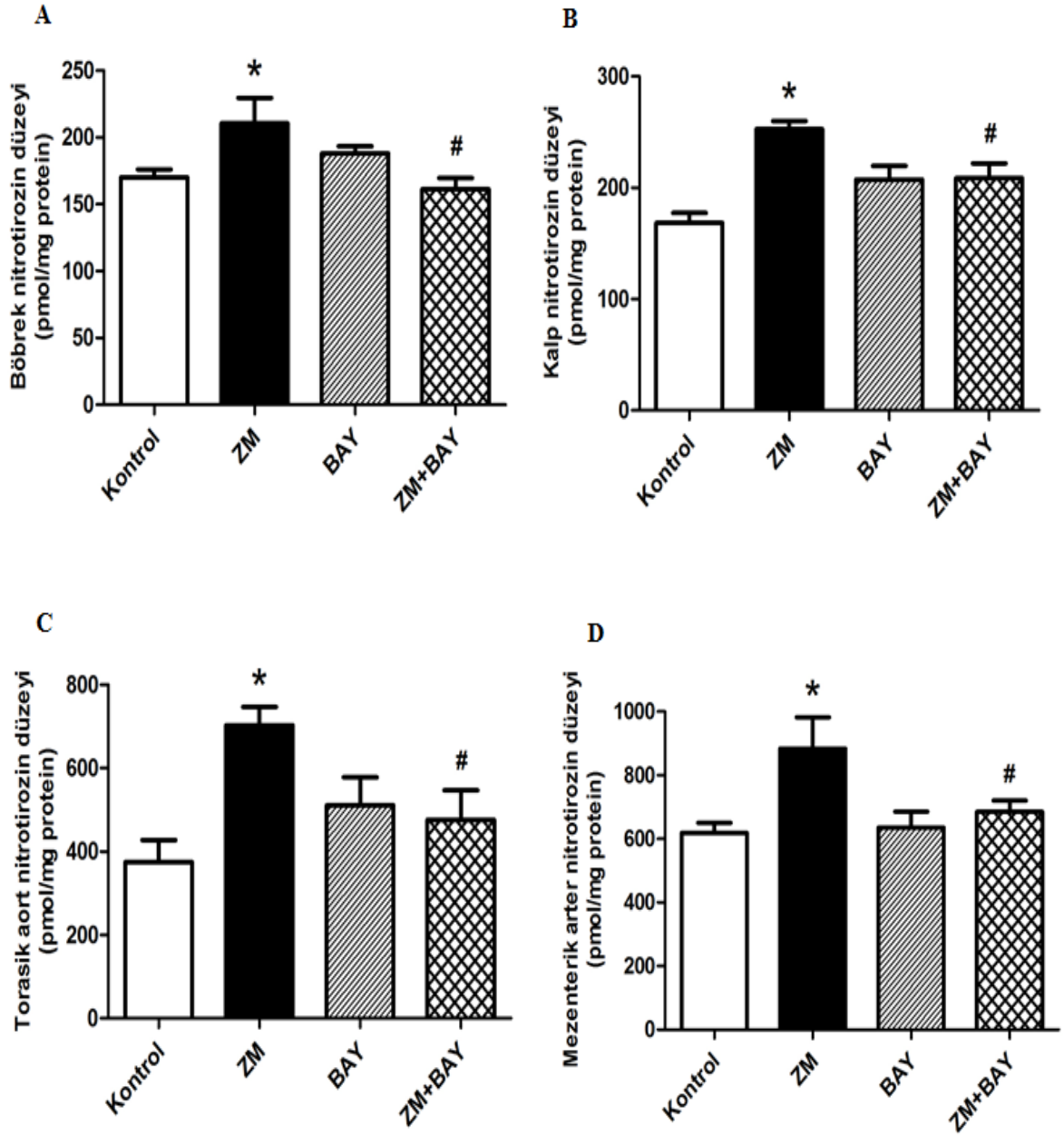
Şekil 4.9. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort, (D) süperiyor mezenterik arterleri ve (E) serumlarında nitrit düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4-6 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.5.3 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Doku Nitrotirozin Düzeyi Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nitrotirozin düzeylerinde oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Şekil 4.10'de verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen nitrotirozin düzeylerinde artış gözlenirken, bu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında, doku nitrotirozin düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde peroksinitrit oluşumunun bir göstergesi olarak ölçülebilen nitrotirozin düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın peroksinitrit oluşumunda neden olduğu artış BAY 61-3606 ile önlenmektedir.



Şekil 4.10. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde nitrotirozin düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4-6 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

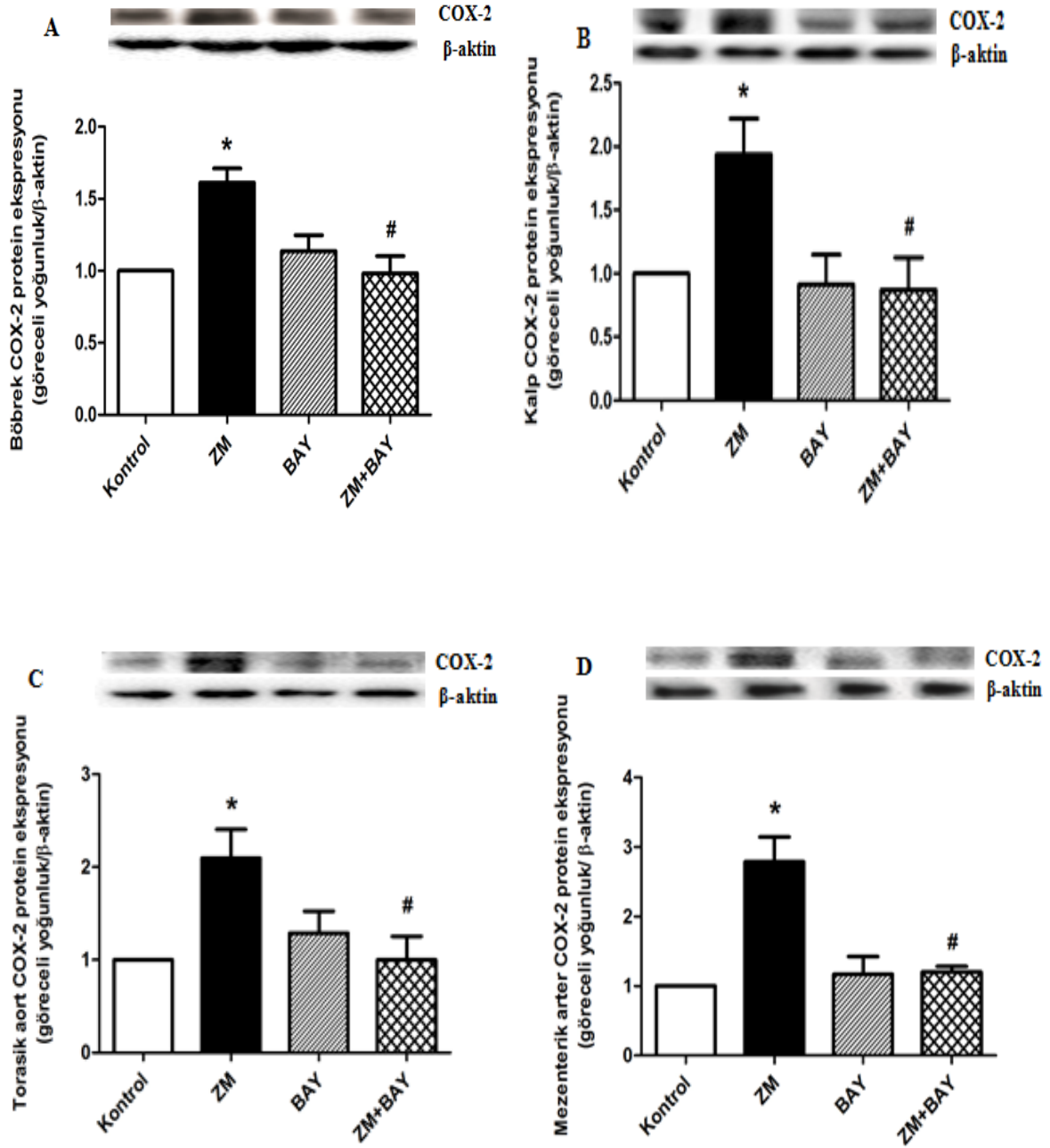
4.6 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın COX-2 Protein Ekspresyonu ve 6-Keto-PGF_{1α} Düzeyi Üzerindeki Etkisi

4.6.1 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın COX-2 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik ve/veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde COX-2 protein ekspresyon düzeylerinde oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Şekil 4.11'da verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen COX-2 protein ekspresyon düzeylerinde artış gözlenirken, bu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında doku COX-2 protein ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde COX-2 protein ekspresyon düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın doku COX-2 protein ekspresyonunda neden olduğu artış BAY 61-3606 ile önlenebilmektedir.



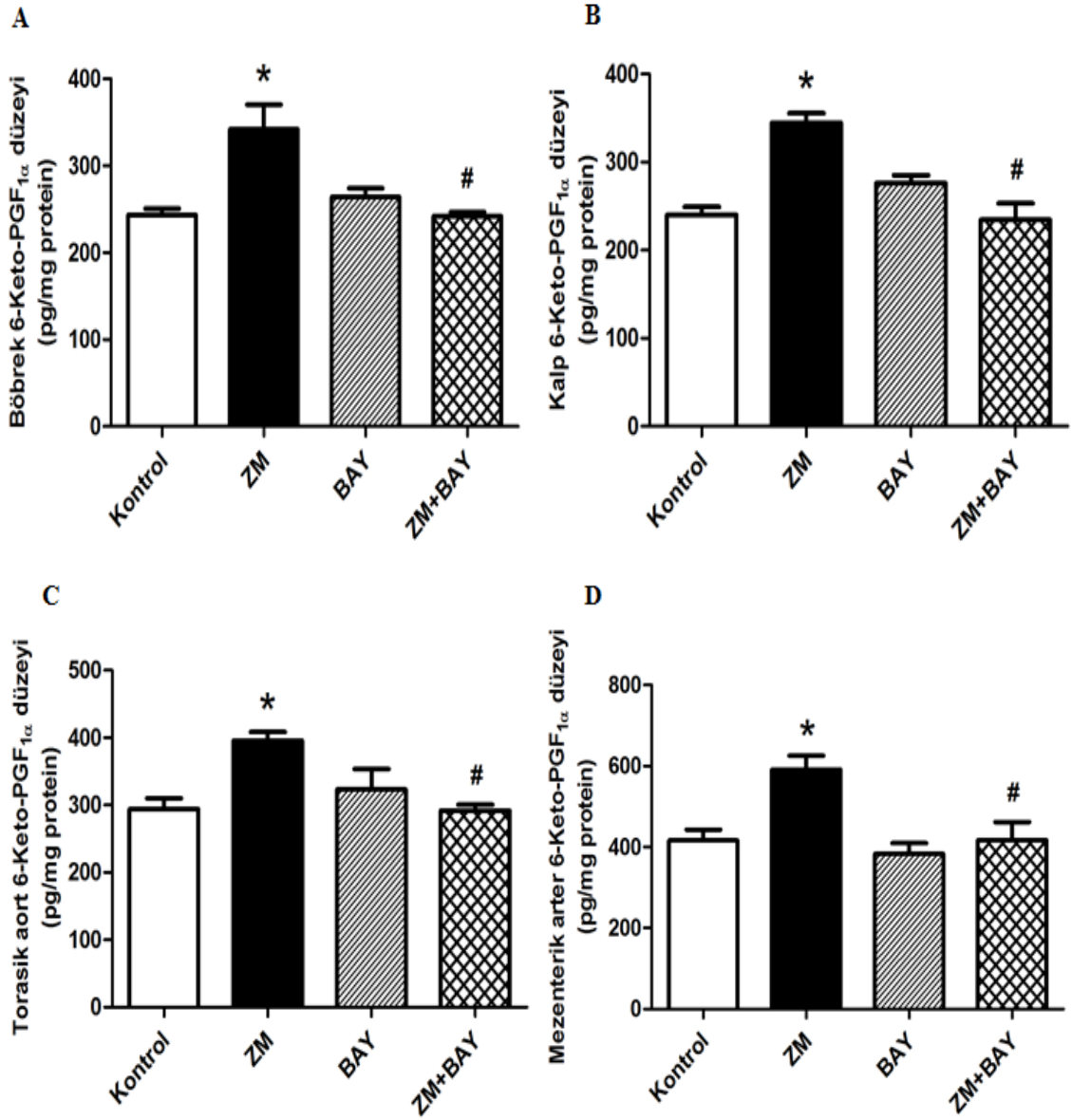
Şekil 4.11. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde COX-2 protein ekspresyonu üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; COX, siklooksijenaz; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.)(septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.6.2 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Doku 6-Keto-PGF_{1α} Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde 6-keto-PGF_{1α} düzeylerinde oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Şekil 4.12'de verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen 6-keto-PGF_{1α} düzeylerinde artış gözlenirken, bu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında, doku 6-keto-PGF_{1α} düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde COX-2 etkinliğinin bir göstergesi olarak ölçülen 6-keto-PGF_{1α} düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın COX-2 etkinliğinde neden olduğu artış BAY 61-3606 ile önlenmektedir.



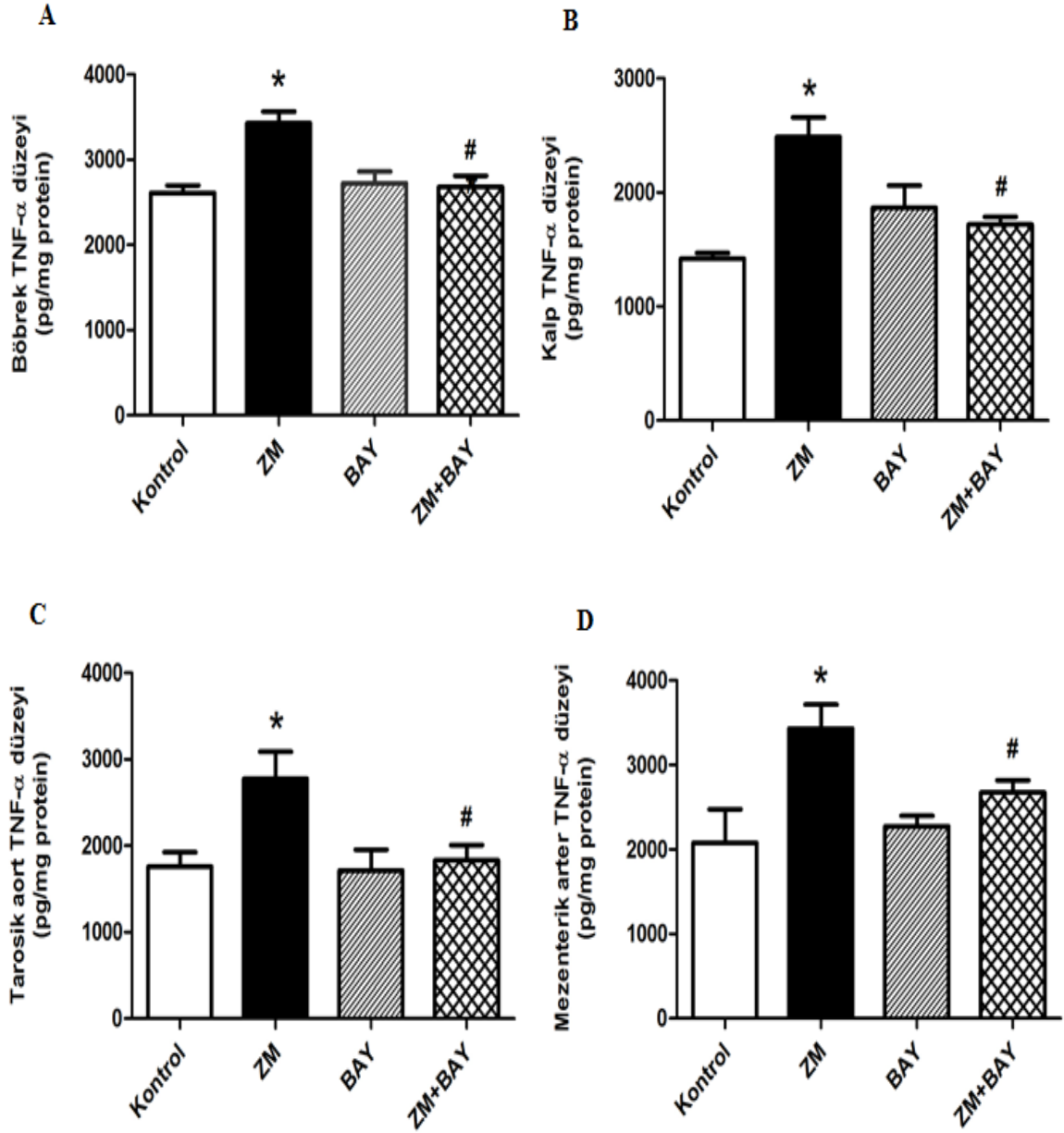
Şekil 4.12. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde 6-keto-PGF_{1α} düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.)(septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4-6 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; P < 0.05).

4.7 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Doku TNF- α Düzeyi Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde TNF- α düzeylerinde oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Şekil 4.13'de verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen TNF- α düzeylerinde artış gözlenirken, bu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). Bay 61-3606 tek başına uygulandığında, doku TNF- α düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerde TNF- α düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın TNF- α düzeylerinde neden olduğu artış BAY 61-3606 ile önlenmektedir.



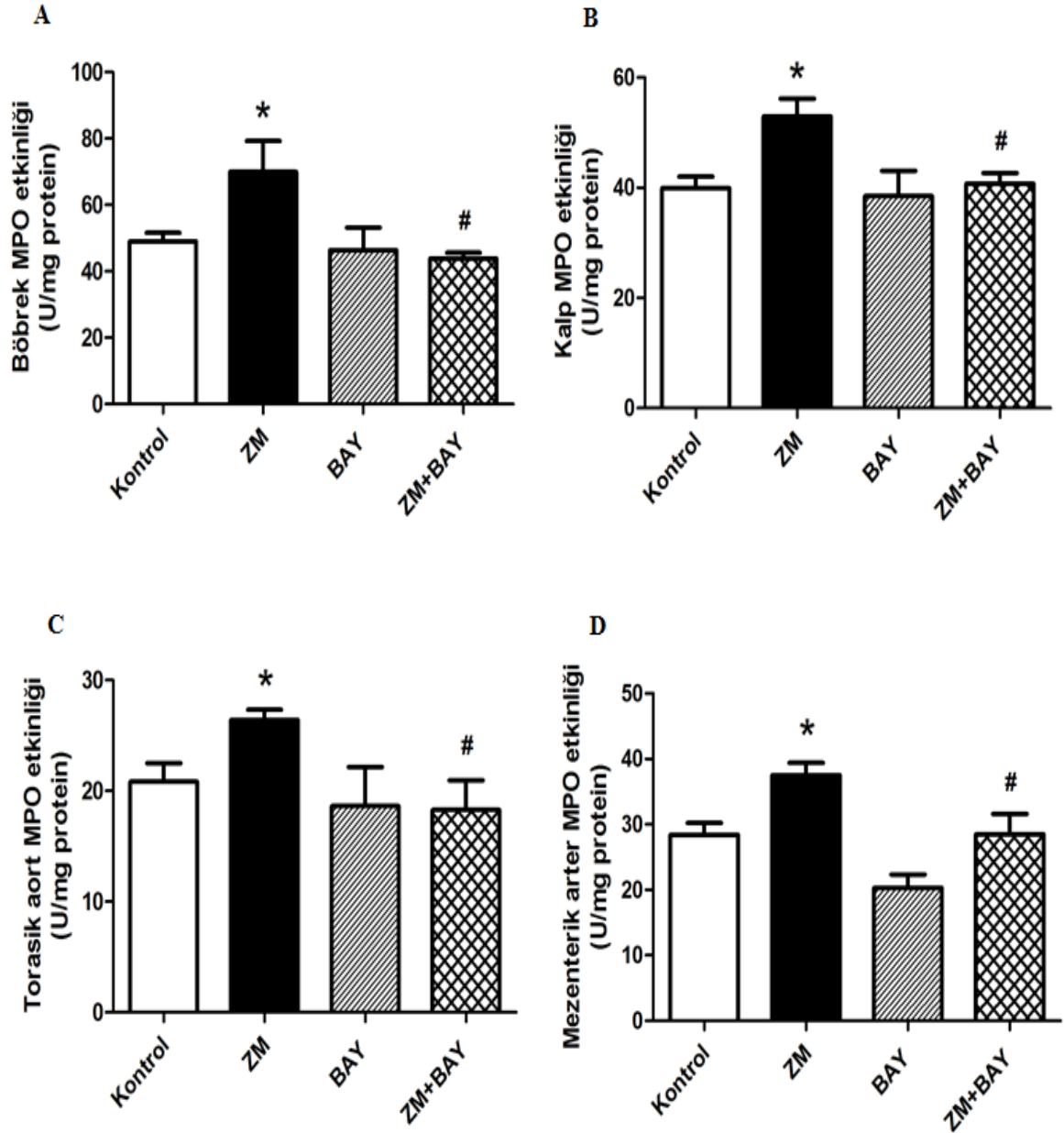
Şekil 4.13. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde TNF- α düzeyleri üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4-6 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

4.8 Zimosan ve/veya BAY 61-3606'nın Doku MPO Etkinliği Üzerindeki Etkisi

Sıçanlara serum fizyolojik veya zimosan ile birlikte BAY 61-3606 uygulanmasından 4 saat sonra ayrılan izole edilen böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde MPO etkinliğinde oluşan değişiklikler ile ilgili bulgular Şekil 4.14'te verilmiştir.

Zimosan uygulanmasından 4 saat sonra sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen MPO etkinliğinde artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). Zimosanın böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde ölçülen MPO etkinliğinde bu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir ($P < 0.05$). BAY 61-3606 tek başına uygulandığında, doku MPO etkinliğinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinde nötrofil infiltrasyonu ve enflamasyonun bir göstergesi olarak ölçülebilen MPO etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, ayrıca, zimosanın neden olduğu MPO etkinliğindeki artış BAY 61-3606 ile önlenbilmektedir.



Şekil 4.14. Kontrol ve zimosan grubundaki sıçanların (A) böbrek, (B) kalp, (C) torasik aort ve (D) süperiyor mezenterik arterlerinde MPO etkinliği üzerinde BAY 61-3606'nın etkisi. BAY, 2-[[7-(3,4-dimetoksifenil)imidazo[1,2-c]pirimidin-5-il]amino]piridin-3-karboksamit dihidroklorit; MPO, miyeloperoksidaz; ZM, zimosan. BAY 61-3606 (3 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (kontrol grubu) veya ZM (500 mg/kg, i.p.) (septik olmayan şok grubu) enjeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. In vivo deneyler sonunda öldürülen sıçanların böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerinin izole edilmiştir. 4-6 adet sıçandan elde edilen sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir. * Kontrol ve # ZM değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (Student's t veya Mann-Whitney U testi; $P < 0.05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, sıçanlarda zimosanın neden olduğu hipotansiyona Dtk'nin katkısı, seçici Dtk inhibitörü BAY 61-3606 uygulanan sıçanlarda, Dtk/İkB- α /NF- κ B yolu etkinliğinin artması sonucunda proenflamatuvar ve aynı zamanda vazodilatör etkili mediyatörlerin artan oluşumları üzerinde oluşturabileceği değişiklikler ile ilişkilendirilerek araştırılmıştır. Bu çalışmanın bulguları, Dtk'nin BAY 61-3606 tarafından inhibisyonunun zimosanın neden olduğu hipotansiyon, takikardi ve enflamasyona karşı koruyucu etkisine Dtk/İkB- α /NF- κ B yolu etkinliğinin azalması ile birlikte, TNF- α , iNOS kaynaklı NO, COX-2 kaynaklı PGI₂ ve peroksinitrit oluşumu ile MPO etkinliğindeki azalmaya katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, OAB'de gözlenen düşme ve KH'deki artma, sıçanlara zimosan uygulanmasının ardından 1 saat içerisinde başlamış ve 4 saat sürmüştür. BAY 61-3606'nın uygulanmasının ardından 1 saat sonra zimosanın neden olduğu OAB'deki düşmeyi ve KH'deki artmayı geri çevirmiştir. Bu tez çalışmasında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek başına zimosan uygulamasından 1 saat sonra OAB ve KH değerlerinin birinci saatten itibaren sırasıyla 30 mmHg düşmesi ve 94 atım/dakika artması şeklinde kontrol grubundan anlamlı bir biçimde farklı olması, sıçanlarda zimosan ile septik olmayan şok modelinin oluştuğunu göstermektedir. Dtk inhibitörü BAY 61-3606, zimosan ile azalan OAB ve artan KH değerlerini geri çevirmiştir. Dolayısıyla bu durum, reseptör ile kenetli olmayan bir tirozin kinaz olan Dtk'nin zimosan ile oluşan septik olmayan şokta ortaya çıkan OAB ve KH gibi kardiyovasküler işlevlerdeki değişikliklere katkıda bulunduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin yanında, günümüzde fungal, viral ve protozoal etkenlerin de önemli derecede katkıda bulunduğu sepsis ve septik şok patojenezinde, ortaya çıkan sistemik enflamatuvar yanıtta katekolamin düzeylerinde artış olmasına karşın dirençli arteriyel hipotansiyon ortaya çıkmaktadır. Klinikte hala tedavisi tam olarak gerçekleştirilemeyen sepsisin en belirgin hemodinamik özelliği, toplam damar direncin azalması ile ilişkili arteriyel vazodilatasyondur. Vazopresör maddelere karşı yanıtız kalan periferik vazodilatasyonun neden olduğu

refrakter hipotansiyon ve bunun ardından gelişen çoklu organ yetmezliği sepsisli hastalarda en yaygın görülen ölüm nedenidir (1).

İlgili literatür incelendiğinde, zimosanın bakteriyel ve endotoksik bir madde olmamasından dolayı “septik olmayan şok modeli” (12, 141) veya “septik şoka benzeyen sendrom” (16, 39) veya başka bir deyişle ile “fungal sepsis” modeli (6) oluşturmak için kullanılan önemli bir enflamatuvar ve hipotansif bileşen olduğu göze çarpmaktadır. Damas ve Lagneaux yaptıkları bir çalışmada, Wistar sıçanlara zimosan (3 mg/kg; i.v.) uygulanmasının ardından sistemik arteriyel kan basıncının 3-5 dakika içerisinde kontrole göre %51 azalma ile en düşük düzeyine ulaştığını gözlemişlerdir. Bununla birlikte, zimosan uygulanmasının ardından sağ ventrikül sistol basıncında ve arteriyel pulmoner kan basıncında artış gözlenmiştir (9). Steib ve ark.’nın Sprague-Dawley sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, zimosanın portal basınç üzerine etkilerini incelemek amacıyla karın içine tüp yerleştirilerek infüzyon ile 150 µg/ml zimosan uygulandığında OAB’de 40 dakikada yaklaşık 40 mmHg’lık bir azalma ortaya çıkmıştır (142, 143). Cuzzocrea ve ark.’nın çalışmasında, bizim de çalışmamızda kullandığımız yönteme benzer olarak, i.p. yoldan ve aynı dozda, ancak Sprague-Dawley cinsi sıçanlara uygulanan zimosan (500 mg/kg), kan basıncında belirgin düşme ile birlikte, buruşmuş deri, letarji, kilo kaybı, konjonktivit ve diyareye yola açmıştır (12). Gözlenen bu azalmanın 6-7 saatte başladığı ve kan basıncında en düşük değerlere 18. saatte ulaşıldığı gözlemlenmiştir. Burada dikkati çeken nokta, zimosanın farklı uygulama yollarından uygulanması sonucu OAB’de meydana gelen azalmanın ortaya çıkış süresinin değişmesidir. Bu durum, zaman içerisindeki ilerleyiş (*time-course*) açısından bizim bulgularımızdan farklılık göstermektedir ki, bu farklılık kullanılan sıçan türlerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Sıçanlara zimosan uygulanmasının ardından OAB’de düşme gözlenirken bununla paralel olarak KH’deki artış gözlenmektedir. Sprague-Dawley sıçanlara 0.25 g/kg (i.p.) zimosan uygulanması sonucunda 10 saat boyunca ölçülen KH dakikada 380’den 430 atıma çıkmıştır (20). Bir başka çalışmada, Sprague-Dawley sıçanlara karaciğere infüzyonla zimosan uygulanmasından sonra 40 dakika boyunca KH’de herhangi bir değişme gözlenmemiştir. Bununla birlikte, zimosanın yüksek doz (8

mg/kg, i.v.) uygulanmasının ardından, sağ ventriküler sistolik basınçta eş zamanlı bir düşüş kaydedilmiştir (142). Çalışmamızda, sıçanlara zimosan uygulanmasının ardından (500 mg/kg; i.p.) KH'de gözlenen 90 atım/dakika'lık artma, BAY 61-3606 tarafından geri çevrilmiştir ki, bu durum zimosanın KH üzerinde neden olduğu artışın Dtk'nin inhibisyonu sonucu önlenebileceğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada, sıçanlara zimosan uygulanmasının ardından OAB'de gözlenen düşme ve KH'deki artmaya, serum, böbrek, kalp, torasik aort ve mezenterik arterlerin iNOS protein ekspresyonunda artma ile birlikte, serum ve doku nitrit düzeyleri ile doku nitrotirozin düzeylerinde artma da eşlik etmektedir. Dtk'nin BAY 61-3606 tarafından inhibisyonu zimosanın neden olduğu bu değişiklikleri geri çevirmiştir. Sprague-Dawley sıçanlara i.p. yoldan zimosan (500 mg/kg) uygulanması, NO sentezinin bir göstergesi olan serumda ölçülen nitrit ve nitrat düzeylerinde 18 saat sonra kontrole göre aşırı miktarda artırmaktadır ve NO sentezindeki bu artış, zimosan ile oluşturulan şok modelinde, şiddetli hipotansiyon ile yakından ilişkili bulunmuştur. Aynı zamanda, noradrenalin ve endotelin-1'in aortik halkalarda vazokonstriktör etki güçlerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Zimosan ile oluşturulan şokta zimosan uygulanmasından 15 dakika önce NOS inhibitörü olan *N (G)-nitro-L- arginine methyl ester* (L-NAME) ya da *N (G)-Methyl-L-arginine* (L-NMA) uygulanması ile NOS etkinliğinin inhibisyonu, hipotansiyonu önemli ölçüde geri çevirirken mortaliteyi de azaltmış, peritonit gelişmesini önlemiş ve *ex vivo* koşullarda vasküler reaktiviteyi artırmıştır. Bu veriler, sıçanlarda zimosanla oluşan kardiyovasküler değişiklikler ve enflamatuvar yanıtta, aşırı miktarda NO oluşumunun rol oynadığını göstermektedir (19, 81).

Zimosan ile oluşan hemodinamik değişikliklerin mekanizmasının araştırıldığı çalışmalarda AA metabolitleri (9), NO, peroksinitrit (19), TEF (147) ve poli-ADp-riboz sentaz (*poly (ADP-ribose) synthetase*; PARS) etkinliğinin (144) rol aldığı gösterilmiştir. Örneğin, sıçanlarda zimosanın neden olduğu sistemik hipotansiyon ve plazma ekstrasvazasyonu, bir COX inhibitörü olan indometasin ile daha da artarken, bir TEF antagonisti ile geri çevrilmiştir (9). Seçici olmayan bir COX inhibitörü olan indometasinin sistemik damarlar üzerine bu etkisi, mast hücreleri (145) ve lökositlerden

(146) vazoaktif mediyatörlerin salıverilmesi üzerine PG'lerin inhibitör etkilerinin baskılanmasına bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (9). Dolayısıyla, bu veriler zimosan ile oluşan hemodinamik değişikliklerde sistemik vazodilatasyonda TEF'nin etkin olabileceğini düşündürmektedir (147). TEF kendi başına rol alabileceği gibi, makrofajlar, endotel ve düz kas hücrelerinden salıverilen ve dolaşımda bulunan proenflamatuvar sitokinlerden biri olan TNF- α ile sinerjistik etki göstererek de hipotansiyonu şiddetlendirebilir (148). TNF- α adrenerjik reseptörlerde işlev bozukluğuna (149) ve α_1 adrenerjik reseptörlerin gen ekspresyonunun baskılanmasına (150) yol açarak vazodilatasyonu artırmaktadır. Ayrıca, TNF- α ve IL-1'in, β -adrenerjik reseptörlerin adenilil siklaz ile kenetini bozarak miyokardın yanıt verirliliğini azalttığı bildirilmiştir (151, 152). BAY 61-3606'nın zimosan ile azalan OAB'yi geri çevirici etkisine, yukarıda belirtilen mekanizmaların inhibisyonun da katkısı olabilir.

Çalışmamızda, sıçanlarda zimosan ile oluşturulan hipotansiyona BAY 61-3606 ile inhibisyonu sonucu katkıda bulunduğu düşünülen Dtk'nin böbrek, kalp, torasik aort ve süperiyor mezenterik arterlerindeki ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmezken, zimosan uygulanmasından 4 saat sonra bu dokularda, fosforile Dtk'nin düzeylerinde artış gözlenmiştir. Dtk'nin (Tyr^{525, 526}) protein fosforilasyonundaki bu artış BAY 61-3606 ile geri çevrilmiştir. Bu veriler, zimosan ile oluşturulan şokun kardiyovasküler sistemdeki kardiyak, renal ve vasküler hedef organlarında Dtk'nin zimosan uygulanması ile etkinleştiğini ve bu etkinleşmenin BAY 61-3606 ile ortadan kalktığını göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızda zimosan ile etkinleştiği gösterilen Dtk'nin I κ B- α ve NF- κ B ekspresyon ve etkinliği üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, I κ B- α ile NF- κ B p65 protein ekspresyonları ve fosforilasyonları incelenmiştir. Zimosan uygulanması, NF- κ B p65 ekspresyonu ve Ser⁵³⁶ üzerinden fosforilasyonunu artırırken, NF- κ B'nin etkinleşmesinde rol oynayan I κ B- α 'nın Ser³² üzerinden fosforilasyonu (17) artmış, ekspresyonu ise azalmıştır. I κ B- α ve ile NF- κ B'de zimosan uygulanması ile ortaya çıkan bu değişiklikler, Dtk'nin seçici inhibitörü BAY 61-3606 tarafından geri çevrilmiştir. Bulgularımıza göre, zimosan ile oluşan hipotansiyona katkıda bulunduğunu düşündüğümüz Dtk'nin etkisine I κ B- α etkinliği ile birlikte NF- κ B etkinliği aracılık etmektedir.

NF- κ B, fizyolojik koşullarda I κ B- α 'lara bağlı olarak sitoplazmada sekestre olmaktadır. Enflamasyon, oksidatif stres, enfeksiyon ve hipoksi gibi durumlarda I κ B kinaz (IKK) enzimi tarafından I κ B fosforile olmaktadır (153). Bunun ardından, n κ kleusun içine transloke olmak için serbest duruma geçen NF- κ B dimeri salıverilmektedir (154). NF- κ B, enfeksiyona karşı oluşan imm \ddot{u} n yanıtın d \ddot{u} zenlenmesinde anahtar bir rol oynamaktadır. Bu rol ile uyumlu olarak, NF- κ B'nin yanlış d \ddot{u} zenlenmesi, kanser, enflamatuvar ve otoimm \ddot{u} n hastalıklar, septik şok ve viral enfeksiyonlar ile bağlantılıdır (155). NF- κ B'nin p65 alt birimi, kendi fizyolojik inhibit \ddot{u} r \ddot{u} I κ B- α 'dan ayrılmakta ve n κ kleusa transloke olarak enflamatuvar yolu etkinleştirmektedir. Zimosan uygulanmasından 18 saat sonra fare akciğerlerinde I κ B- α degradasyonunun gerçekleştiği ve NF- κ B p65'in n κ kleer translokasyonunun arttığı g \ddot{u} sterilmiştir (17).

Çalışmamızda, Dtk, I κ B- α ve NF- κ B etkinliklerinde artışa paralel olarak, g \ddot{u} l \ddot{u} enflamatuvar ve vazodilat \ddot{u} r etkileri bilinen COX-2 ekspresyonu ile birlikte, COX-2 kaynaklı PGI $_2$ ile TNF- α ve enflamasyonun \ddot{u} nemli bir g \ddot{u} stergesi olan MPO etkinliğinin zimosan uygulanması sonucu arttığı g \ddot{u} zlenmiştir. Dtk'nin BAY 61-3606 ile inhibisyonunun t \ddot{u} m bu artmaları geri çevirmesi, Dtk/I κ B- α /NF- κ B yolu aracılığı ile oluşan enflamasyonla ilişkili hipotansiyona bu mediyat \ddot{u} rlerin katkıda bulunduğunun bir g \ddot{u} stergesi olarak d \ddot{u} ř \ddot{u} n \ddot{u} lebilir. Zimosan tarafından NF- κ B'nin etkinleşmesi ve TNF- α gibi enflamatuvar sitokinlerin \ddot{u} retimi için TLR2 ve TLR6'nın gerekli olduğu bildirilmiştir ve zimosanın TLR2 aracılıklı NF- κ B etkinliğini artırdığı bilinmektedir (156). Zimosan doğal imm \ddot{u} n h \ddot{u} crelerle doğrudan temas ederek, TLR2 yolunu g \ddot{u} l \ddot{u} bir biçimde etkinleştirmekte ve sitokin yanıtlarını oluşurmaktadır (47). Zimosan, TNF- α 'ya ek olarak NF- κ B, IL-1 β , IL-6 ve IL-8'in oluşumlarını da artırmaktadır (157). NF- κ B'nin etkinleşmesi, enflamatuvar mediyat \ddot{u} rlerin sentezinde *upstream* olarak rol oynamaktadır. Bu genlerin arasında ekspresyonu NF- κ B tarafından d \ddot{u} zenlenen iNOS ve COX-2 enzimleri de bulunmaktadır (158). NF- κ B'nin etkinleşmesi iNOS, COX-2 oluşumu ve TNF- α \ddot{u} retimi ile sonuçlanmaktadır (159). Makrofajlarda zimosan A ile oluşturulan TNF- α \ddot{u} retiminde, NF- κ B'nin etkinleşmesinin rol \ddot{u} olduğu g \ddot{u} sterilmiştir. Zimosan A ile oluşturulan TNF- α \ddot{u} retimi, TNF- α gen *promoter* etkinliğindeki artış ile

ilişkili bulunmuştur. TNF- α gen *promoter* etkinliği, NF- κ B'nin etkinliğine bağımlıdır. NF- κ B'nin etkinliğinin inhibisyonu, zimosana karşı oluşan yanıtta hem TNF- α gen *promoter* etkinliğinde hem de TNF- α protein üretiminde dramatik bir azalmaya neden olmaktadır (70). Zimosanın yapısında bulunan 1,3- β -glukan, dektin-1 ve Dtk, CARD9 ve Bcl10 yolu aracılığıyla NF- κ B'yi etkinleştirmektedir (160). IKK'nin potent bir inhibitörü olan S1627'nin, spinal kordta zimosanın neden olduğu NF- κ B nükleer translokasyonunu önlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, COX-2, TNF- α ve IL-1 β gibi NF- κ B'ye yanıt veren genlerin (*NF- κ B-responsive genes*) *up*-regülasyonunu önlemektedir (161).

Zimosan, başlıca monosit ve makrofajlar tarafından tanınmakta ve fagosite edilmekte olup, bunun sonucunda hücresel etkinlikte değişikliklere neden olmaktadır (48). Makrofajların etkinliği, sepsis benzeri sendroma neden olmaktadır (142). Makrofajlar tarafından parçalanamayan zimosanın fagositozu uzatılan enflamatuvar yanıtta neden olmaktadır (10). Zimosanın güçlü enflamatuvar etkinliğinde rol oynayan ve makrofajların doğrudan etkinleştirilmesinde sorumlu olan yapı, β -glukandır (66). Zimosan aracılığıyla makrofajlardan TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler ile hidrojen peroksit ve AA metabolitleri gibi enflamatuvar ürünler salıverilmektedir. Bununla birlikte, polimorfonükleer lökosit (PMN)'lerin etkinleşmesi ile de reaktif oksijen türleri (ROT), AA metabolitleri oluşmakta ve lizozomal proteazlar salıverilmekte, sonuçta bunlara bağlı olarak organ zedelenmesi oluşabilmektedir. PMN'ler, enflamatuvar bölgede, büyüme faktörleri, kemokinler, proteazlar, sitokinler, kompleman bileşenleri, NO, ROT ve peroksinitrit gibi önemli mediyatörlerinin salıverilmesini etkinleştirerek organ zedelenmesine neden olmaktadır (162). Enflamatuvar yanıtta salıverilen sitokinler, enflamasyona bağlı damar hasarına yol açabilirler (149). Zimosan enjeksiyonu farelerde, son organ zedelenmesine yol açan TNF- α düzeyleri ile lökosit düzeyleri ve MPO etkinliğini aşırı düzeyde artırmaktadır (32). Sitokinlerin salıverilmesi, ateş, damarlarda genişleme ve öteki immün hücrelerin enflamasyon bölgesine gitmesi gibi bazı patofizyolojik değişimleri uyarmakta olup, bazı durumlarda doku zedelenmesi, ÇOY ve ölümlerle sonuçlanabilmektedir (163). Zimosan uygulanması, kilo kaybı, hipotansiyon ile karaciğer, bağırsak, akciğer ve böbrekte işlevsel ve yapısal değişiklikler ile belirgin akut peritonitin önemli bir nedenidir (30),

124). Zimosanla oluşturulan peritonit, akut enflamasyonun iyi tanımlanmış bir modeli olarak gösterilmektedir. Zimosanın lökositler üzerindeki TLR2 ve TLR6'ya özgül olarak bağlanması, NF-κB'nin etkinleşmesi ve fosforilasyonunu başlatmaktadır. Bu durum, NF-κB p65 alt biriminin nükleusta birikmesine ve ardından proenflamatuvar sitokin genlerinin ekspresyonlarının *up*-regülasyonuna neden olmaktadır (75). Sıçanlarda zimosan uygulanmasının ardından, 18. saatte akciğer, ince bağırsak ve karaciğerde organ zedelenmesi ortaya çıkmaktadır (79). Mainous ve ark., sıçanlara düşük doz zimosan (100 mg/kg) uyguladıklarında sistemik etkiler ortaya çıkmazken, 500 mg/kg dozda uygulanması ile ortaya çıkan sistemik enflamasyonun nedeninin, sistemik organlara bakteriyel translokasyonu olduğu bildirmişlerdir (164). Farelere 100 ve 500 mg/kg dozda uygulanan zimosan, bakteriyel translokasyonda doz bağımlı artışa ve buna bağlı olarak intestinal mukozada zedelenmeye yol açmaktadır (165).

PGI₂, COX enzimi tarafından AA'dan oluşmaktadır ve adenilil siklaz etkinleşmesi ve siklik adenozin 5' monofosfat düzeylerindeki artış ile vazodilatör ve antitrombotik etkiler ortaya koymaktadır (166). COX-1 etkinleşmesi, PGI₂ ile ilgili mide ve böbrekte sitoproteksiyon, vazodilatasyon ve antitrombotik etkinlik gibi fizyolojik ve yararlı etkilerde rol oynamaktadır (167, 168). COX-2'nin ekspresyonu için fonksiyonel geçerliliğinin olduğu bulunan insan *cox2* promoter (düzenleyici)'dan elde edilen κB bölgeleri bulunmaktadır. Zimosan, *cox2* bölgelerine NF-κB'nin bağlanma etkinliğinin güçlü etkinleştiricisidir (51). Zimosanla uyarılan insan monositlerinde 4 saat sonra ölçülen COX-2 ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmiştir (169). Yapılan bir çalışmada, ICR farelere 1 g/kg zimosan uygulanmasından 4 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Bu çalışmada peritoneal eksüdatadaki PGE₂ düzeyleri ölçülmüş ve kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (170). Normal koşullar altında sağlam bir endotel varlığında, NO, kan damarlarını dilate bir durumda tutmakta ve PGI₂ ile birlikte endotelin trombojenik olmayan doğal yapısını sürdürmektedir (171). Endojen olarak üretilen NO ile ortaya çıkan kardiyovasküler etkiler, sıklıkla, PGI₂ olarak bilinen bir başka önemli vazodilatör mediyatörle ilişkili olarak gerçekleşmektedir (166, 172) NO ve PGI₂'nin vasküler etkinliği arasında bir sinerjizma bulunmaktadır. NO'nin COX-2'yi doğrudan etkinleştirme yeteneği, NO'nin saflaştırılmış rekombinant COX-2 enzim etkinliğini artırmasıyla kanıtlanmıştır (171). Zimosanın yerel olarak uygulanması da

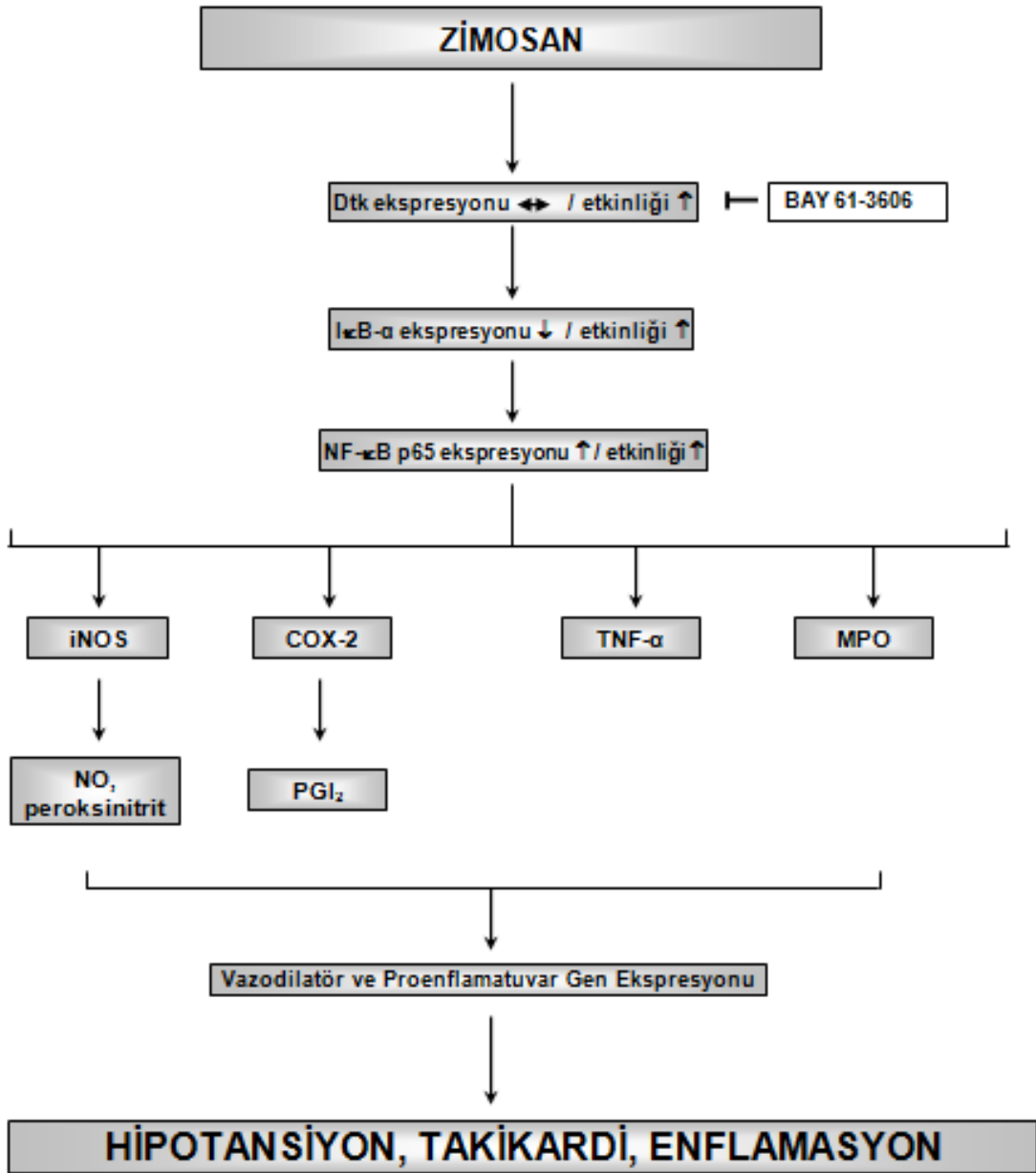
PGI₂ ve NO oluşumunda artışa neden olmaktadır. İntraplantar zimosan uygulanmasıyla oluşturulan pençe ödeminde, PGD₂, PGF_{2α} ve 6-keto-PGF_{1α} oluşumunun 1. saatten sonra artmaya başladığı ve 6. saatte en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir (173).

Nitrotirozin seviyeleri, yapılan çalışmalarda enflamasyonun ve NO oluşumunun bir göstergesi olarak bilinmektedir ve nitrotirozin oluşumu için NO bulunmalıdır. Ayrıca, peroksinitrit oluşumu da dahil olmak üzere çeşitli yolların etkinleşmesi nitrotirozin oluşumuna katılmaktadır (174). Nitrotirozin, peroksinitrit aracılıklı oksidasyonun dayanıklı son ürünü olduğu için plazma veya dokudaki miktarlarının ölçümü *in vivo* NO ve süperoksit aracılıklı zedelenmenin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (15, 144). NO'ya ek olarak, süperoksit oluşumuna bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresin, zimosan ile etkinleşen PMN'ler ile inkübe edilen damarlarda endotel zedelenmesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (175, 176). Öte yandan, hücre ve doku zedelenmesine neden olan peroksinitrit (178), *in vivo* koşullarda zimosanla oluşan hipotansiyonda oluşumu artan NO'nun süperoksit radikali ile birleşmesi sonucu oluşabilmektedir (12). Aynı durumun *in vitro* koşullarda da gerçekleştiği gösterilmiştir. Örneğin, sıçan torasik aort halkaları, zimosan ile etkinleştirilen plazma (*zymosan-activated plasma*, ZAP) inkübasyonu ile uyarıldığında oluşan peroksinitrit noradrenaline karşı kasılma yanıtının azalması (vasküler hiporeaktivite) ve endotele bağımlı vazodilatör etki gösteren asetilkoline yanıtta bir azalma (endotel işlev bozukluğu) (177, 179) ile belirgin damar işlev bozukluğuna yol açtığı bildirilmiştir (19). Peroksinitritin bir başka etkisi ise DNA tek zincirinin kırılmasına neden olup, bir nükleer enzim olan PARS'yi etkinleştirmektir. PARS'nin etkinleşmesi, şiddetli bir nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) ve adozin trifosfat (ATP) tüketimine neden olmakta ve sonuç olarak geri dönüşsüz sitotoksisiteyi ve hücre ölümünü başlatmasına ek olarak *in vitro* koşullarda ekzojen peroksinitrite önemli ölçüde maruz kalan kan damarlarında vasküler hiporeaktiviteye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (19, 180-182). Gerçekten de, endotoksik ve hemorajik gibi çeşitli şok türlerinde ortak nokta olan damar düz kası kasılabilirliği ve endotele bağımlı yanıtların bozulması durumu zimosanla oluşturulan şokun da belirgin özelliğidir (183, 184). Sonuç olarak, ZAP, peroksinitrit ve PARS etkinliğinin zimosanın neden olduğu vasküler yanıtta olduğu gibi vasküler hiporeaktivitede de önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, iNOS ekspresyonundaki

artış ile birlikte nitrit ve nitrotirozin düzeylerindeki artmanın BAY 61-3606 ile önlenmesi, NO ve süperoksitin Dtk aracılıklı oluşan hipotansiyondaki katkısının önemli bir göstergesidir.

Zimosanın hücre duvarı bileşeni olduğu *S. cerevisiae* gibi mikroorganizmalar, klinikte önemli enflamatuvar hastalıklara yol açabilmektedir. Bunlar arasında pnömoni, ampiyem, karaciğer apsesi, peritonit, vajinit, özafajit ve üriner sistem enfeksiyonları bulunmaktadır. Ayrıca, astımlı, ülseratif kolitli ve diyareli hastaların serumlarında da *S. cerevisiae*'nin bulunduğu gösterilmiştir. *S. cerevisiae*'nin neden olduğu en önemli klinik sendrom fungemidir. Klinik tablosu en şiddetli olan *S. cerevisiae*'ye bağlı fungemi yalnızca immünosupresif hastalarda değil, aynı zamanda sağlıklı kişilerde de gözlenmektedir (31). Bu nedenle, zimosanın neden olduğu kan basıncındaki azalma ve eşlik eden enflamasyonun mekanizması önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz bulgulara göre, zimosan uygulanan sıçanlarda Dtk/IκB-α/NF-κB yolunun etkinleşmesi sonucu hipotansiyon, takikardi ve enflamasyon oluşmaktadır (Şekil 5.1). BAY 61-3606 ile Dtk'nin inhibisyonu, sıçanlarda zimosanın neden olduğu bu değişiklikleri geri çevirmektedir. Bununla birlikte, Dtk'nin inhibisyonu sonucunda, zimosanın çoklu organ zedelenmesinde önem taşıyan renal, kardiyak ve vasküler yapılarda Dtk aracılıklı IκB-α/NF-κB etkinliklerindeki azalma ile birlikte proenflamatuvar mediyatörlerin oluşumlarının azalması, BAY 61-3606'nın septik olmayan şokta koruyucu etkisinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu mediyatörlerin, hipotansiyon ile sonuçlanan vasküler reaktivitedeki azalma ile ilişkisi düşünüldüğünde, Dtk inhibitörü BAY 61-3606'nın, zimosan ile oluşan septik olmayan şokta hipotansiyon, takikardi ve enflamasyonu önleyici etkisinin önemi daha da artmaktadır.



Şekil 5.1. Zimosan ile oluşan hipotansiyona Dtk'nin katkısı ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizma. COX-2, indüklenebilir siklooksijenaz; Dtk, dalak tirozin kinazı; IκB-α, inhibitör kappa B alfa; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; MPO, miyeloperoksidaz; NF-κB, nükleer faktör kappa B; TNF-α, tümör nekroze edici faktör alfa. (↑), arttı; (↓), azaldı; (↔), değişmedi.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Seçici bir Dtk inhibitörü olan BAY 61-3606'nın zimosanın neden olduğu hipotansiyonu önleyici etkisinin mekanizmasının Dtk'nin etkinliği sonucu, IκB-α/NF-κB ekspresyon ve etkinliğinde ortaya çıkan değişiklikler ile ilişkilendirilerek araştırıldığı bu çalışmada, BAY 61-3606'nın, zimosan ile oluşan hipotansiyonu önleyici etkisine Dtk etkinliğindeki azalmanın katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmada, Dtk/IκB-α/NF-κB aracılığı ile iNOS, COX-2 ve MPO ekspresyon ve/veya etkinliklerindeki artışın ve NO, peroksinitrit, TNF-α ve PGI₂ oluşumundaki artış ile birlikte olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızın, Dtk etkinliğindeki artışın birlikte olduğu hipotansiyon, takikardi ve enflamasyon ile belirgin başlıca renal ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki başarının artırılmasına yönelik olarak sistemik yoldan uygulanabilen Dtk inhibitörleri ile daha seçici tedaviye olanak sağlayan yeni yaklaşımlar geliştirilebilmesi açısından klinik öncesi ve klinik çalışmalara oldukça büyük bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Böylece, zimosanın konakçıda tetiklediği sinyal ileti mekanizmalarından biri olan Dtk protein ekspresyon ve etkinliğinin düzenlenmesine dayanan ve nedene yönelik olarak yapılabilecek özgül ve daha az maliyeti olan terapötik yaklaşımlara katkıda bulunabilecektir.

Bu tez kapsamında zimosanın ve kullanmış olduğumuz inhibitörün uzun dönem etkilerine bakılamamıştır, ancak ileride eksik olan mortalite çalışmalarının yapılması planlanmaktadır. Ayrıca, zimosanla kronik bir enflamasyon modeli olan ÇOY çalışılarak, Dtk inhibitörünün bu kronik enflamasyonda organlarda ortaya çıkan zedelenmeyi ne ölçüde geri çevirebileceği araştırılabilir. ÇOY'de ilk zedelenen dokulardan biri olan akciğer dokusuna ve oluşan organ zedelenmenin bir göstergesi olan IL-1 düzeylerine de daha sonra yapılacak olan çalışmalarda bakılabilir. Zimosanın neden olduğu hipotansiyon yapmış olduğumuz çalışma ile gösterilmiş olmasına karşın,

vasküler reaktivite çalışmaları yapılamamıştır. Zimosan uygulanması ile değişen vasküler reaktiviteye Dtk inhibitörünün etkisi araştırılabilir.

Ana Bilim Dalımızda AA metabolitlerinden 20-hidroksieikozatetraenoik asit (20-HETE) ve onun dayanıklı analogu *N*-(20-hidroksieikoz-5[Z],14[Z]-dienoil)glisin (5,14-HEDGE) ile çalışmaktadır. Zimosan uygulanması ile AA metabolizmasında 20-HETE düzeylerinin nasıl değiştiğine ve bu değişime 5,14-HEDGE'nin olası katkılarına ilerleyen çalışmalarda bakılabilir. Ayrıca bu modelde, zimosan uygulamasının Dtk inhibisyonunun ardından 20-HETE düzeylerinde oluşan değişimler araştırılabilir. Benzer olarak, AA yolunda rol alan bir diğer mediyatör olan TEF'in zimosanla ortaya çıkan değişikliklerde Dtk inhibitörünün etkisi bir başka araştırma konusu olabilir. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda, üzerinde çalıştığımız Dtk sinyal ileti yolunun tam olarak aydınlatılabilmesinde ilişkili reseptörlerin araştırılmasına gerek duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. **Kang-Birken SL, Dipiro JT.** Sepsis and septic shock. In: Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. Eds. *Pharmacotherapy*, 5th Ed. A.B.D:McGraw-Hill Medical Publishing, **2002**; 2029-34.
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(2):121-50.
3. **Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D.** Sepsis occurrence in acutely ill patients investigators. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*, **2006**; 34(2):344-53.
4. **Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M.** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, **2003**; 348(16):1546-54.
5. **Mercer-Jones MA, Heinzelmann M, Peyton JC, Wickel D, Cook M, Cheadle WG.** Inhibition of neutrophil migration at the site of infection increases remote organ neutrophils equestration and injury. *Shock*, **1997**; 8:193-9.
6. **van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Verschueren IC, Hendriks T, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG.** Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. *Shock*, **2010**; 34(4):407-11.
7. **Di Carlo, FJ, Fiore JV.** On the composition of zymosan. *Science*, **1958**; 127:756-7.
8. **Smits GJ, Kapteyn JC, van den Ende H, Klis FM.** Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol*, **1999**; 2:348-52.
9. **Damas J, Lagneaux D.** Dissociation between the effects of zymosan on the systemic and pulmonary vessels of the rat. *Br J Pharmacol*, **1991**; 104:559-64.

10. **Volman T JH, Hendriks T, Goris RJA.** Zymosan-induced generalized inflammation: "experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. *Shock*, **2005**; 23(4):291-7.
11. **Mondello S, Galuppo M, Mazzon E, Italiano D, Mondello P, Aloisi C, Cuzzocrea S.** Glutamine treatment attenuates the development of organ injury induced by zymosan administration in mice. *Eur J Pharmacol*, **2011**; 658(1):28-40.
12. **Cuzzocrea S, Filippelli A, Zingarelli B, Falciani M, Caputi AP, Rossi F.** Role of nitric oxide in a nonseptic shock model induced by zymosan in the rat. *Shock*, **1997**; 7(5):351-7.
13. **Cuez T, Korkmaz B, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Falck J, Malik KU, Tunctan B.** A synthetic analogue 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(5):378-88.
14. **Korkmaz B, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Cuez T, Demiryurek TA, Tunctan B.** Activation of MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway associated with peroxynitrite formation contributes to hypotension and vascular hyporeactivity in endotoxemic rats. *Nitric Oxide: Biol. Chem*, **2011**; 24(3):160-72.
15. **Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Patel NS, Genovese T, Muià C, Crisafulli C, Caputi AP, Thiemermann C,** Erythropoietin reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice. *Crit Care Med*, **2006**; 34(4):1168-77.
16. **Genovese T, Di Paola R, Catalano P, Li JH, Xu W, Massuda E, Caputi AP, Zhang J, Cuzzocrea S.** Treatment with a novel poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor reduces development of septic shock-like syndrome induced by zymosan in mice. *Crit Care Med*, **2004**; 32(6):1365-74.
17. **Galuppo M, Di Paola R, Mazzon E, Genovese T, Crisafulli C, Paterniti I, Cuzzocrea E, Bramanti P, Kapoor A, Thiemermann C, Cuzzocrea S.** Role of PPAR- δ in the development of zymosan-induced multiple organ failure: an experiment mice study. *Journal of Inflammation*, **2010**; 7:12
18. **Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Patel NS, Genovese T, Muià C, Crisafulli C, Caputi AP, Thiemermann C.** Erythropoietin reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice. *Crit Care Med*, **2006**; 34(4):1168-77.

19. **Cuzzocrea S, Zingarelli B, Sautebin L, Rizzo A, Crisafulli C, Campo GM, Costantino G, Calapai G, Nava F, Di Rosa M, Caputi AP.** Multiple organ failure following zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. *Shock*, **1997**; 8(4):268-75.
20. **Thomas NJ, Carcillo JA, Herzer WA, Mi Z, Jackson EK.** Chronic type IV phosphodiesterase inhibition protects glomerular filtration rate and renal and mesenteric blood flow in a zymosan-induced model of multiple organ dysfunction syndrome treated with norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther*, **2001**; 296(1):168-74.
21. **Rinaldi B, Cuzzocrea S, Donniacuo M, Capuano A, Di Palma D, Imperatore F, Mazzon E, Di Paola R, Sodano L, Rossi F.** Hyperbaric oxygen therapy reduces the toll-like receptor signaling pathway in multiple organ failures. *Intensive Care Med*, **2011**; 37(7):1110-9.
22. **Kayaalp O.** Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 12. Baskı, Pelikan Yayıncılık Ltd. Şti., **2009**; (2) 990-2.
23. **Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, Nagai K, Yamada T, Nakamura S, Yamamura H.** Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem*, **1991**; 266(24):15790-6.
24. **Coopman PJ, Mueller SC.** The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression. *Cancer Lett*, **2006**; 241(2):159-73.
25. **Riccaboni M, Bianchi I, Petrillo P.** Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs. *Drug Discov Today*, **2010**; 15(13-14):517-30.
26. **Yamamoto N, Takeshita K, Shichijo M, Kokubo T, Sato M, Nakashima K, Ishimori M, Nagai H, Li YF, Yura T, Bacon KB.** The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*, **2003**; 306(3):1174-81.
27. **Reid DM, Gow NA, Brown GD.** Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol*, **2009**; 21(1):30-7.
28. **Cerra FB.** Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support. *Surgery*, **1987**; 101(1):1-14.

29. **Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G.** Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma*. **1983**; 23(9):775-87.
30. **Mizuno M, Ito Y, Hepburn N, Mizuno T, Noda Y, Yuzawa Y, Harris CL, Morgan BP, Matsuo S.** Zymosan, but not lipopolysaccharide, triggers severe and progressive peritoneal injury accompanied by complement activation in a rat peritonitis model. *J Immunol*, **2009**; 183(2):1403-12.
31. **Muñoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Pérez MJ, Sánchez-Somolinos M, Rincón C, Hortal J, Peláez T.** *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis*, **2005**; 40(11):1625-34.
32. **Shayevitz JR, Miller C, Johnson KJ, Rodriguez JL.** Multiple organ dysfunction syndrome: end organ and systemic inflammatory response in a mouse model of nonseptic origin. *Shock*, **1995**; 4(6):389-96.
33. **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.
34. **Wiersinga WJ.** Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Curr Opin Crit Care*, **2011**; 17(5):480-6.
35. **Robertson CM, Coopersmith CM.** The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect*, **2006**; 8:1382-9.
36. **Ashbaugh DG, Petty TL.** Sepsis complicating the acute respiratory distress syndrome. *Surg Gynecol Obstet*, **1972**; 135:865-8.
37. **Goris RJ, Boekholtz WK, van Bebber IP, Nuytinck JK, Schillings PH.** Multiple-organ failure and sepsis without bacteria. *An experimental model. Arch Surg*, **1986**; 121(8):897-901.
38. **Meyer S, Gottschling S, Baghai A, Wurm D, Gortner L.** Arginine-vasopressin in catecholamine-refractory septic versus non-septic shock in extremely low birth weight infants with acute renal injury. *Crit Care*, **2006**; 10(3):R71.
39. **Remichkova M, Yordanov M, Dimitrova P.** Etoposide attenuates zymosan-induced shock in mice. *Inflammation*, **2008**; 31(1):57-64.
40. **Al Mohajer M, Darouiche RO.** Sepsis syndrome, bloodstream infections, and device-related infections. *Med Clin North Am*, **2012**; 96(6):1203-23.

41. **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.
42. **Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Crisafulli C, Genovese T, Muià C, Abdelrahman M, Esposito E, Thiernemann C.** Glycogen synthase kinase 3beta inhibition reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice. *Shock*, **2007**; 27(1):97-107.
43. **Brown GD.** Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, **2006**; 6(1):33-43.
44. **Underhill, D.M., and A. Ozinsky.** Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol*, **2002**; 20:825-52.
45. **Young SH, Wolfarth MG, Roberts JR, Kashon ML, Antonini JM.** Adjuvant effect of zymosan after pulmonary treatment in a mouse ovalbumin allergy model. *Exp Lung Res*, **2013**; 39(1):48-57.
46. **Underhill DM, Ozinsky A.** Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, **2002**; 14(1):103-10.
47. **Underhill DM.** Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res*, **2003**; 9(3):176-80.
48. **Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A.** The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, **1999**; 401(6755):811-5.
49. **Takeda, K., Akira, S.** TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, **2004**; 16(1):3-9.
50. Erişim: <http://www.invivogen.com/review-dectin1>. Erişim tarihi: 02.08. 2013.

51. **Alvarez Y, Valera I, Municio C, Hugo E, Padrón F, Blanco L, Rodríguez M, Fernández N, Crespo MS.** Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *Mediators Inflamm*, **2010**; pii: 201929.

52. **Marie C, Muret J, Fitting C, Payen D, Cavaillon JM.** Interleukin-1 receptor antagonist production during infectious and noninfectious systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, **2000**; 28(7):2277-82.

53. **Kim PK, Deutschman CS.** Inflammatory responses and mediators. *Surg Clin North Am*, **2000**; 80:885-894.

54. **Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D.** Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis*, **2003**; 35(9):535-44.

55. **Lush CW, Kviety PR.** Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation*, **2000**; 7:83-101.

56. **Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group.** Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, **2001**; 344(10):699-709.

57. **Levitz SM.** Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect*, **2004**; 6(15):1351-5.

58. **Calderone RA, Braun PC.** Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*, **1991**; 55(1):1-20.

59. **Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC.** The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J*, **1973**; 135(1):19-30.

60. **Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvicková J.** Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology*, **1999**; 42(1-3):61-74.

61. **Tzianabos AO.** Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev*, **2000**; 13(4):523-33.

62. **Young SH, Ostroff GR, Zeidler-Erdely PC, Roberts JR, Antonini JM, Castranova V.** A comparison of the pulmonary inflammatory potential of different components of yeast cell wall. *J Toxicol Environ Health A*, **2007**; 70(13):1116-24.

63. **Wan GH, Li CS, Guo SP, Rylander R, Lin RH.** An airborne mold-derived product, beta-1,3-D-glucan, potentiates airway allergic responses. *Eur J Immunol*, **1999**; 29(8):2491-7.

64. **Ormstad H, Groeng EC, Løvik M, Hetland G.** The fungal cell wall component beta-1,3-glucan has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. *J Toxicol Environ Health A*, **2000**; 61(1):55-67.

65. **Instanes C, Ormstad H, Rydjord B, Wiker HG, Hetland G.** Mould extracts increase the allergic response to ovalbumin in mice. *Clin Exp Allergy*, **2004**; 34(10):1634-41.

66. **Benacerraf B, Sebestyen MM.** Effect of bacterial endotoxins on the reticuloendothelial system. *Fed Proc*, **1957**; 16(3):860-7.

67. **Riggi SJ, Di Luzio NR.** Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. *Am J Physiol*, **1961**; 200:297-300.

68. **Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G.** Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma*, **1983**; 23(9):775-87.

69. **Qin HY, Wu JC, Tong XD, Sung JJ, Xu HX, Bian ZX.** Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol*, **2011**; 46(2):164-74.

70. **Young SH, Robinson VA, Barger M, Porter DW, Frazer DG, Castranova V.** Acute inflammation and recovery in rats after intratracheal instillation of a 1->3-beta-glucan (zymosan A). *J Toxicol Environ Health A*, **2001**; 64(4):311-25.

71. **Young SH, Roberts JR, Antonini JM.** Pulmonary exposure to 1->3-beta-glucan alters adaptive immune responses in rats. *Inhal Toxicol*, **2006**; 18(11):865-74.

72. **Young SH, Antonini JM, Roberts JR.** Single pre-exposure to a high dose of zymosan enhances lung defense mechanisms and accelerates the pulmonary clearance of a bacterial pathogen in rats. *Exp Lung Res*, **2008**; 34(9):559-78.

73. **Young SH, Antonini JM, Roberts JR.** Preexposure to repeated low doses of zymosan increases the susceptibility to pulmonary infection in rats. *Exp Lung Res*, **2009**; 35(7):570-90.

74. **Vicente AM, Guillén MI, Habib A, Alcaraz MJ.** Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther*, **2003**; 307(3):1030-7.
75. **Wypasek E, Natorka J, Mazur AI, Kolaczowska E.** Toll-like receptors expression and NF- κ B activation in peritoneal leukocytes in morphine-mediated impairment of zymosan-induced peritonitis in swiss mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **2012**; 60(5):373-82.
76. **Battle J, Ha T, Li C, Della Beffa V, Rice P, Kalbfleisch J, Browder W, Williams D.** Ligand binding to the (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan receptor stimulates NF κ B activation, *but not apoptosis* in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**; 249(2):499-504.
77. **Suzuki T, Ohno N, Chiba N, Miura NN, Adachi Y, Yadomae T.** Immunopharmacological activity of the purified insoluble glucan, zymocel, in mice. *J Pharm Pharmacol*, **1996**; 48(12):1243-8.
78. **Ohno N, Miura NN, Chiba N, Adachi Y, Yadomae T.** Comparison of the immunopharmacological activities of triple and single-helical schizophyllan in mice. *Biol Pharm Bull*, **1995**; 18(9):1242-7.
79. **Cuzzocrea S, Zingarelli B, Sautebin L, Rizzo A, Crisafulli C, Campo GM, Costantino G, Calapai G, Nava F, Di Rosa M, Caputi AP.** Multiple organ failure following zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. *Shock*, **1997**; 8(4):268-75.
80. **Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Sottile A, Teti D, Caputi AP.** Protective effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibition on multiple organ failure after zymosan-induced peritonitis in the rat. *Crit Care Med*, **1999**; 27(8):1517-23.
81. **Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP.** Peroxynitrate-mediated DNA strand breakage activates poly(ADP-ribose) synthetase and causes cellular energy depletion in a nonseptic shock model induced by zymosan in the rat. *Shock*, **1998**; 9(5):336-40.
82. **Qiu ZH, de Carvalho MS, Leslie CC.** Regulation of phospholipase A2 activation by phosphorylation in mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem*, **1993**; 268(32):24506-13.
83. **Qiu ZH, Leslie CC.** Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A2. *J Biol Chem*, **1994**; 269(30):19480-7.

84. Qiu ZH, Gijón MA, de Carvalho MS, Spencer DM, Leslie CC. The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J Biol Chem*, **1998**; 273(14):8203-11.
85. Doherty NS, Poubelle P, Borgeat P, Beaver TH, Westrich GL, Schrader NL. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin. *Prostaglandins*, **1985**; 30(5):769-89.
86. Lundy SR, Dowling RL, Stevens TM, Kerr JS, Mackin WM, Gans KR. Kinetics of phospholipase A2, arachidonic acid, and eicosanoid appearance in mouse zymosan peritonitis. *J Immunol*, **1990**; 144(7):2671-7.
87. Humes JL, Sadowski S, Galavage M, Goldenberg M, Subers E, Bonney RJ, Kuehl FA JR. Evidence for two sources of arachidonic acid for oxidative metabolism by mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem*, **1982**; 257(4):1591-4.
88. Wightman PD, Dahlgren ME, Davies P, Bonney RJ. The selective release of phospholipase A2 by resident mouse peritoneal macrophages. *Biochem J*, **1981**; 200(2):441-4.
89. Bruton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman and Gilman, Tedavinin Farmakolojik Temeli, **2009** Nobel Tip Kitapevleri, 1366.
90. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*, **2010**; 10(6):387-402.
91. Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, **2005**; 315(3):971-9.
92. Cheng H, Force T. Why do kinase inhibitors cause cardiotoxicity and what can be done about it? *Prog Cardiovasc Dis*, **2010**; 53(2):114-20.
93. Waldburger JM, Firestein GS. Garden of therapeutic delights: new targets in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, **2009**; 11(1):206.
94. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*. **2002**; 38(5):3-10.

95. **Heldin CH.** Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, **1995**; 80(2):213-23.
96. **Arteaga CL, Johnson DH.** Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa). *Curr Opin Oncol*, **2001**; 13(6):491-8.
97. **Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A.** ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, **1992**; 71(4):649-62.
98. **Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H.** Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem*, **2001**; 130(2):177-86.
99. **Bradshaw JM.** The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches. *Cell Signal*, **2010**; 22(8):1175-84.
100. **Pamuk ON, Tsokos GC.** Spleen tyrosine kinase inhibition in the treatment of autoimmune, allergic and autoinflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*, **2010**; 12(6):222.
101. **Kurosaki T, Hikida M.** Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol Rev*, **2009**; 228(1):132-48.
102. **Tohyama Y, Yamamura H.** Protein tyrosine kinase, syk: a key player in phagocytic cells. *J Biochem*, **2009**; 145(3):267-73.
103. **Zarbock A, Ley K.** Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. *Arch Biochem Biophys*, **2011**; 510(2):112-9.
104. **Yanagi S, Inatome R, Takano T, Yamamura H.** Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**; 288(3):495-8.
105. **Geahlen RL.** Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta*, **2009**; 1793(7):1115-27.
106. **Kulathu Y, Grothe G, Reth M.** Autoinhibition and adapter function of Syk. *Immunol Rev*, **2009**; 232(1):286-99.

- 107. Qin S, Kurosaki T, Yamamura H.** Differential regulation of oxidative and osmotic stress induced Syk activation by both autophosphorylation and SH2 domains. *Biochemistry*, **1998**; 37(16):5481-6.
- 108. Uckun FM, Qazi S.** Spleen tyrosine kinase as a molecular target for treatment of leukemias and lymphomas. *Expert Rev Anticancer Ther*, **2010**; 10(9):1407-18.
- 109. Flück M, Zürcher G, Andres AC, Ziemiecki A.** Molecular characterization of the murine syk protein tyrosine kinase cDNA, transcripts and protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **1995**; 213(1):273-81.
- 110. Tohyama Y, Yamamura H.** Complement-mediated phagocytosis--the role of Syk. *IUBMB Life*, **2006**; 58(5-6):304-8.
- 111. Malemud CJ.** The discovery of novel experimental therapies for inflammatory arthritis. *Mediators Inflamm*, **2009**; 2009:698-769.
- 112. Hammaker D, Firestein GS.** "Go upstream, young man": lessons learned from the p38 saga. *Ann Rheum Dis*, **2010**; 69(1):i77-82.
- 113. Hirasawa N, Scharenberg A, Yamamura H, Beaven MA, Kinet JP.** A requirement for Syk in the activation of the microtubule-associated protein kinase/phospholipase A2 pathway by Fc epsilon R1 is not shared by a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, **1995**; 270(18):10960-7.
- 114. Chan AC, van Oers NS, Tran A, Turka L, Law CL, Ryan JC, Clark EA, Weiss A.** Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol*, **1994**; 152(10):4758-66.
- 115. Takata M, Sabe H, Hata A, Inazu T, Homma Y, Nukada T, Yamamura H, Kurosaki T.** Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J*, **1994**; 13(6):1341-9.
- 116. Ulanova M, Duta F, Puttagunta L, Schreiber AD, Befus AD.** Spleen tyrosine kinase (Syk) as a novel target for allergic asthma and rhinitis. *Expert Opin Ther Targets*, **2005**; 9(5):901-21.

117. Cox D, Greenberg S. Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol*, **2001**; 13(6):339-45.
118. Lee JH, Kim YM, Kim NW, Kim JW, Her E, Kim BK, Kim JH, Ryu SH, Park JW, Seo DW, Han JW, Beaven MA, Choi WS. Phospholipase D2 acts as an essential adaptor protein in the activation of Syk in antigen-stimulated mast cells. *Blood*, **2006**; 108(3):956-64.
119. Kytтарыс VC, Tsokos GC. Syk kinase as a treatment target for therapy in autoimmune diseases. *Clin Immunol*, **2007**; 124(3):235-7.
120. Wong BR, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES. Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, **2004**; 13(7):743-62.
121. Xie HZ, Li LL, Ren JX, Zou J, Yang L, Wei YQ, Yang SY. Pharmacophore modeling study based on known spleen tyrosine kinase inhibitors together with virtual screening for identifying novel inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, **2009**; 19(7):1944-9.
122. Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig TE, Habermann TM, Kutok JL, Shipp MA. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **2008**; 111(4):2230-7.
123. Cha HS, Boyle DL, Inoue T, Schoot R, Tak PP, Pine P, Firestein GS. A novel spleen tyrosine kinase inhibitor blocks c-Jun N-terminal kinase-mediated gene expression in synoviocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **2006**; 317(2):571-8.
124. Pine PR, Chang B, Schoettler N, Banquerigo ML, Wang S, Lau A, Zhao F, Grossbard EB, Payan DG, Brahn E. Inflammation and bone erosion are suppressed in models of rheumatoid arthritis following treatment with a novel Syk inhibitor. *Clin Immunol*, **2007**; 124(3):244-57.
125. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lovell S, Sun T, Park G, Argade A, Jurcevic S, Pine P, Singh R, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, **2006**; 319(3):998-1008.
126. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, **2010**; 363(14):1303-12.
127. Guyer B, Shimamoto S, Bradhurst A, Grossbard E, Dreskin S, Nelson HS. The effect of a novel inhibitor of mast cell activation on mediators, symptoms and nasal patency in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, **2004**; 113:S28-9.

- 128. Meltzer EO, Berkowitz RB, Grossbard EB.** An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J Allergy Clin Immunol*, **2005**; 115:791–6.
- 129. Thakkar K, Geahlen RL, Cushman M.** Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of polyhydroxylated stilbene analogues of piceatannol. *J Med Chem*, **1993**; 36(20):2950-5.
- 130. Ashikawa K, Majumdar S, Banerjee S, Bharti AC, Shishodia S, Aggarwal BB.** Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB-mediated gene expression through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation. *J Immunol*, **2002**; 169(11):6490-7.
- 131. Yamamoto N, Takeshita K, Shichijo M, Kokubo T, Sato M, Nakashima K, Ishimori M, Nagai H, Li YF, Yura T, Bacon KB.** The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*, **2003**; 306(3):1174-81.
- 132. 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.
- 133. 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: Biol Chem*, **2006**; 14(1):51-7.
- 134. 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(7):248-54.
- 135. Tunctan B, Uludag O, Altug S, Abacioglu N.** Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Pharmacol Res*, **1998**; 38(5):405-11.
- 136. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, **1982**; 126(1):131-8.
- 137. Golowich SP, Kaplan SD.** Methods in enzymology. *Academic Press New York NY*, **1955**, Volume II pp 769-782.).
- 138. 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(3):186-94.

- 139. Wilson CM.** Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol*, **1983**; 91:236-47.
- 140. 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(2):341-7.
- 141. Di Paola R, Mazzon E, Muià C, Crisafulli C, Genovese T, Di Bella P, Esposito E, Menegazzi M, Meli R, Suzuki H, Cuzzocrea S.** Green tea polyphenol extract attenuates zymosan-induced non-septic shock in mice. *Shock*, **2006**; 26(4):402-9.
- 142. Steib CJ, Gerbes AL, Bystron M, Op den Winkel M, Härtl J, Roggel F, Prüfer T, Göke B, Bilzer M.** Kupffer cell activation in normal and fibrotic livers increases portal pressure via thromboxane A(2). *J Hepatol*, **2007**; 47(2):228-38.
- 143. Steib CJ, Hennenberg M, Beiting F, Hartmann AC, Bystron M, De Toni EN, Gerbes AL.** Amiloride reduces portal hypertension in rat liver cirrhosis. *Gut*, **2010**; 59(6):827-36.
- 144. Szabó C, Dawson VL.** Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci*, **1998**; 19(7):287-98.
- 145. Raud J.** Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute mast cell-dependent inflammation. *Br J Pharmacol*, **1990**; 99(3):449-54.
- 146. Weissmann G.** Leukocytes as secretory organs of inflammation. *Hosp Pract*, **1978**; 13(9):53-62.
- 147. Feuerstein G, Rabinovici R, Leor J, Winkler JD, Vonhof S.** Platelet-activating factor and cardiac diseases: therapeutic potential for PAF inhibitors. *J Lipid Mediat Cell Signal*, **1997**; 15(3):255-84.
- 148. Sun XM, Hsueh W, Torre-Amione G.** Effects of in vivo 'priming' on endotoxin-induced hypotension and tissue injury. The role of PAF and tumor necrosis factor. *Am J Pathol*, **1990**; 136(4):949-56.
- 149. Vila E, Salaices M.** Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2005**; 288(3):H1016-21.
- 150. Dunser MW, Wenzel V, Mayr AJ, Hasibeder WR.** Management of vasodilatory shock: defining the role of arginine vasopressin. *Drugs*, **2003**; 63(3):237-56.

- 151. Bernardin F, Herring BL, Peddada L, Delwart EL.** Primary infection of a male plasma donor with divergent HIV variants from the same source followed by rapid fluctuations in their relative frequency and viral recombination. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **2003**; 19(11):1009-15.
- 152. Bernardin C.** Stationary nonequilibrium properties for a heat conduction model. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **2008**; 78(2 Pt 1):021134.
- 153. Bowie A, O'Neill LA.** Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol*, **2000**; 59(1):13-23.
- 154. Di Paola R, Galuppo M, Mazzone E, Paterniti I, Bramanti P, Cuzzocrea S.** PD98059, a specific MAP kinase inhibitor, attenuates multiple organ dysfunction syndrome/failure (MODS) induced by zymosan in mice. *Pharmacol Res*, **2010**; 61(2):175-87.
- 155. Albenis BC, Mattson MP.** Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*, **2000**; 35(2):151-9.
- 156. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM.** Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, **2003**; 197(9):1107-17.
- 157. Baeuerle PA, Henkel T.** Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **1994**; 12:141-79.
- 158. Tesse A, Martínez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, Mitolo-Chieppa D, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R.** Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2005**; 25(12):2522-7.
- 159. Ruetten H, Thiemermann C.** Combination immunotherapy which neutralises the effects of TNF alpha and IL-1 beta attenuates the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *J Physiol Pharmacol*, **1997**; 48(4):605-21.
- 160. Bi L, Gojestani S, Wu W, Hsu YM, Zhu J, Ariizumi K, Lin X.** CARD9 mediates dectin-2-induced I kappa B alpha kinase ubiquitination leading to activation of NF-kappaB in response to stimulation by the hyphal form of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **2010**; 285(34):25969-77.
- 161. Tegeder I, Niederberger E, Schmidt R, Kunz S, Gühring H, Ritzeler O, Michaelis M, Geisslinger G.** Specific Inhibition of I kappa B kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J Neurosci*, **2004**; 24(7):1637-45.
- 162. Hassa PO, Hottiger MO.** The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci*, **2002**; 59(9):1534-53.

- 163. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ.** How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol*, **2003**; 74(4):479-85.
- 164. Mainous MR, Tso P, Berg RD, Deitch EA.** Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg*, **1991**; 126(1):33-7
- 165. Deitch EA, Kemper AC, Specian RD, Berg RD.** A study of the relationship among survival, gut-origin sepsis, and bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *J Trauma*, **1992**; 32(2):141-7.
- 166. Vane JR, Botting RM.** The mode of action of anti-inflammatory drugs. *Postgrad Med J*, **1990**; 66(4):S2-17.
- 167. DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta*, **1991**; 1083(2):121-34.
- 168. Seibert K, Masferrer JL.** Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*. **1994**;4(1):17-23.
- 169. Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, Brambilla M, Caiani A, Tremoli E, Colli S.** Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med*, **2004**; 37(2):156-65.
- 170. Huang YL, Kou JP, Ma L, Song JX, Yu BY.** Possible mechanism of the anti-inflammatory activity of ruscogenin: role of intercellular adhesion molecule-1 and nuclear factor-kappaB. *J Pharmacol Sci*, **2008**; 108(2):198-205.
- 171. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D.** Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev*, **2005**; 57(2):217-52.
- 172. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG.** Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol*, **1996**; 118(4):829-38.
- 173. Linke B, Schreiber Y, Zhang DD, Pierre S, Coste O, Henke M, Suo J, Fuchs J, Angioni C, Ferreiros-Bouzas N, Geisslinger G, Scholich K.** Analysis of sphingolipid and prostaglandin

synthesis during zymosan-induced inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2012**; 99(1-2):15-23.

- 174. Di Paola R, Mazzon E, Muià C, Crisafulli C, Genovese T, Di Bella P, Esposito E, Menegazzi M, Meli R, Suzuki H, Cuzzocrea S.** Protective effect of *Hypericum perforatum* in zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *Nitric Oxide*, **2007**; 16(1):118-30.
- 175. Mehta JL, Lawson DL, Nicolini FA, Ross MH, Player DW.** Effects of activated polymorphonuclear leukocytes on vascular smooth muscle tone. *Am J Physiol*, **1991**; 261(2 Pt 2):H327-34.
- 176. Murohara T, Kugiyama K, Sugiyama S, Ohgushi M, Yasue H.** Activated human polymorphonuclear leukocytes elicit endothelium-dependent contraction in isolated pig coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, **1993**; 21(5):760-6.
- 177. Villa LM, Salas E, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S.** Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**; 91(26):12383-7.
- 178. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS.** Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, **1992**; 298(2):446-51.
- 179. Elliott SJ.** Peroxynitrite modulates receptor-activated Ca²⁺ signaling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol*, **1996**; 270(6 Pt 1):L954-61.
- 180. Szabó C.** DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*, **1996**; 21(6):855-69.
- 181. Szabó C.** The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*, **1996**; 6(2):79-88.
- 182. Zingarelli B, O'Connor M, Wong H, Salzman AL, Szabó C.** Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, **1996**; 156(1):350-8.

183. Szabó C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz*, **1995**; 3(1):2-32.

184. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Szabó A, Salzman AL, Caputi AP, Szabó C. Beneficial effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Br J Pharmacol*, **1997**; 121(6):1065-74.

ÖZ GEÇMİŞ

Demet ÜNSAL, 06/08/1987 tarihinde Bozdoğan-Aydın'da doğmuştur. İlköğretimini Yazıkent Mürşide Akçay İlköğretim Okulu ve Bozdoğan Merkez İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini Mersin Dumlupınar Lisesinde tamamlamıştır. 2010 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun olmuştur. Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalında 2010-2011 Eğitim-Öğretim Yılı Güz Dönemi'nde Yüksek Lisans Programı'na başlamıştır. 26/09/2011 tarihinden itibaren Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir. İngilizce bilmektedir.