



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BUZAĞILARDA SEPSİS PATOGENEZİNDE RIPK1, RIPK2 VE RIPK3 İFADESİNİN ROLÜ

Atilla DOĞAN

BURDUR, 2020

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BUZAĞILARDA SEPSİS PATOGENEZİNDE RIPK1,
RIPK2 VE RIPK3 İFADESİNİN ROLÜ**

Atilla DOĞAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

BURDUR, 2020

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Atilla DOĞAN tarafından Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ yönetiminde hazırlanan “Buzağılarda Sepsis Patogenezinde RIPK1, RIPK2 Ve RIPK3 İfadesinin Rolü” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/04/2020

Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ (Başkan)
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR (Jüri Üyesi)
Süleyman Demirel Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ (Jüri Üyesi)
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun _____ Tarih ve _____ Sayılı Kararı ile Kabul Edilmiştir.

(İmza)
Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Buzağlarda Sepsis Patogenezinde RIPK1, RIPK2 Ve RIPK3 İfadesinin Rolü”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06 / 04 / 2020

(İmza)

Atilla DOĞAN

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Sepsis, çeşitli patojenlere karşı konakçının verdiği disregüle bağışıklık yanıtı olup, yoğun bakım ünitelerinde başlıca ölüm nedeni olması sebebi ile hem beşeri hem de veteriner hekimliğinde ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir. Sepsis tedavisinin başarılı olmasında erken teşhisin ve organ yetmezliği derecesinin önemi oldukça fazladır. Klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan geleneksel biyobelirteçler sepsisi diğer hastalıklardan ayırt etmede yetersiz kaldığından dolayı sepsisin teşhisinde yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. İlaveten, organ yetmezliğinin oluşumunda önemli rolü olan inflamasyonla ilişkili hücre ölüm yollarından nekroptozisin buzağılarda sepsis patogenezi ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı yeni doğan buzağılarda sepsis patogenezinde reseptör ile etkileşen protein kinaz1 (RIPK1), RIPK2 ve RIPK3 mRNA ifadelerinin önemini ortaya koymak ve biyobelirteç olma potansiyellerini araştırarak buzağılarda sepsis hakkında yeni ve katkı sağlayıcı bilgiler vermektir.

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ'a

Çalışmalarımnda hiçbir yardımı esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ramazan YILDIZ'a

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Orhan YAVUZ'a ve Mol. Bio. Yakuphan BAYKAN'a

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen anneme ve babam'a

Her daim yanımda olan, bu tez sürecinde de desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Hülya DOĞAN'a

0522-YL-18 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Nisan, 2020

Atilla DOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sepsis Tanımları.....	5
2.1.1. Enfeksiyon.....	5
2.1.2. Sistemik Yangınsal Cevap Sendromu (SIRS)	5
2.1.3. Sepsis.....	5
2.1.4. Septik Şok.....	6
2.2. Sepsis Tanılama.....	6
2.3. Sepsis Doku Hasarları - Hastalıkları	7
2.4. Hücre Ölüm Yolakları	7
2.4.1. Apoptozis.....	8
2.4.2. Nekroz	9
2.4.3. Nekroptozis.....	10
2.4.4. Apoptozis Ve Nekroptozis Arasındaki Ara Bağlantılar	17
2.5. Reseptörle Etkileşen Protein (RIP) Kinazları.....	19
2.5.1. RIPK1	20
2.5.2. RIPK2	21
2.5.3. RIPK3	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Örnek Temini.....	23
3.2. Aletler ve Cihazlar.....	24
3.3. Yöntem	24
3.3.1. RNA İzolasyonu	24
3.3.2. RNA Kantitasyonu	24
3.3.3. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	25
3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi	26
3.3.5. Gen Ekspresyon Analizi Real Time PCR (Eş-Zamanlı Kantitatif PCR)	27
3.3.6. İstatistiksel Analiz	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	29
4.1. Klinik Bulgular.....	29
4.2. Hemogram Bulguları.....	30
4.3. RIPK1, RIPK2 ve RIPK3 Bulguları.....	30
5. SONUÇ.....	36
6. KAYNAKLAR	38
7. EKLER.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Enfeksiyon, SIRS, Sepsis, Septik şok tanımı.....	6
Şekil 2.2. Apoptotik yollar (Weller, 2002).....	10
Şekil 2.3. RIPK3 aracılı nekroptosis mekanizmaları (Tait, 2014).....	14
Şekil 2.4. TNF nekroptosis sinyal mekanizması (Gong, 2019).....	15
Şekil 2.5. TNFR1 aracılı sinyal yolları (Liu, 2019).....	16
Şekil 2.6. RIPK ailesinin tüm üyeleri (He, 2018).....	20
Şekil 4.1. Sepsisli buzağının tedavi öncesi genel görünümü.....	29
Şekil 4.2. Sağlıklı buzağılara göre sepsis şüpheli buzağılarda azalan RIPK1 ifadesi.....	31
Şekil 4.3. Sepsis şüpheli buzağılarda azalmış RIPK3 ifadesi.....	31
Şekil 8.1. Sağlıklı örnekte GAPDH'e ait erime eğrisi.....	48
Şekil 8.2. Sağlıklı örnekte RIPK1'e ait erime eğrisi.....	48
Şekil 8.3. Sağlıklı örnekte RIPK2'e ait erime eğrisi.....	48
Şekil 8.4. Sağlıklı örnekte RIPK3'e ait erime eğrisi.....	49
Şekil 8.5. Sepsis şüpheli örnekte GAPDH'e ait erime eğrisi.....	49
Şekil 8.6. Sepsis şüpheli örnekte RIPK1'e ait erime eğrisi.....	49
Şekil 8.7. Sepsis şüpheli örnekte RIPK2'e ait erime eğrisi.....	50
Şekil 8.8. Sepsis şüpheli örnekte RIPK3'e ait erime eğrisi.....	50
Şekil 8.9. qPCR sonuçlarının %2'lik agaroz jel üzerinde gösterilmesi [Marker, GAPDH (199 bp), RIPK1 (113 bp), RIPK3 (102 bp)].....	50

ÇİZELGE DİZİNİ

Tablo 2.1. Apoptozis, nekroptozis ve nekrozda hücresel özelliklerin karşılaştırılması.....	12
Tablo 3.1. RNA Kantitasyonu ve Miktarı.....	25
Tablo 3.2. Çalışma değerleri.....	26
Tablo 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan primerlerin sekansları ve TM değerleri.....	27
Tablo 4.1. Sepsisli ve sağlıklı buzağlarda hemogram ve klinik bulgular (Mean±SEM)....	29



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	: Apoptozis indükleyici faktör
APAF1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
CARD	: Kaspaz aktivasyon ve bağlama bölgesi
CD95	: Reseptör Fas
cDNA	: Komplementer DNA
CIAP1/2	: Apoptozun hücrel inhibitorü 1
CYLD	: CYLD lizin 63 deubiquitinaz
DAMP	: Hasara bağlı moleküler model
DD	: C-terminal ölüm domaini
DISC	: Ölüme neden olan sinyal kompleksi
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dnaz	: Deoksiribonükleaz
DRP-1	: Dinamin-1 benzeri protein
FADD	: -Fas-bağlı ölüm domain
g	: Gram
Gapdh	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
IL	: interleukin
JAK-	: Janus kinases
LPS	: Lipopolisakkarit
MAMS	: Mitokondriya bağlı membranlar
MAPK	: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz
Mg	: Miligram
MI	: Mililitre
MLKL	: Psödokinaz gibi karışık kinaz alanı
mm-hg	: Mikrometre civa
MOMP	: Mitokondrial dış zar geçirgenliği
mRNA	: Mesajcı RNA
NF-KB	: Nükleer faktör kappa B
NOD1/2	: Nükleotid oligomerizasyon domani
PAMP	: Patojene bağlı moleküler model

PARP1	: NADy ADP-ribosiltransferaz 1
PGAM5	: Mitokondriyal Serin / treonin-protein fosfataz
q-PCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RHIM	: RIP homotipik etkileşim motifi
RIG	: Retinoik aside indüklenbilir gen
RIPK	: Reseptörle etkileşen protein
RNA	: Ribo Nükleik asit
RNAi	: RNA interferaz
Rnaz	: Ribonükleaz
ROC/COR	: Ros of complex proteins/C-terminal of Roc
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	: Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
STAT	: Transkripsiyon proteinlerinin sinyal transdüseri ve aktivatörü
TCR	: T Hücresi Reseptörü
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFα	: Tümör nekroz faktörü alpha
TRADD	: TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini
TRAIL	: TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TRIF	: TNF reseptörü ile ilişkili faktör 1
TRPM7	: Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı
z-VAD-FMK	: Kaspaz-8 inhibitörü
°C	: Santigrat
μL	: Mikrolitre

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Buzağılarda Sepsis Patogenezinde RIPK1, RIPK2 Ve RIPK3 İfadesinin Rolü

Atilla DOĞAN

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

Nisan, 2020

Sepsis, enfeksiyona karşı gelişen disregüle inflamatuvar yanıt olup genellikle organ disfonksiyon sendromu ile sonuçlanmakta ve ölüme neden olmaktadır. Sepsis için bugüne kadar spesifik bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Sepsisi teşhis etmek amacıyla klinik uygulamada kullanılan geleneksel biyobelirteçler sepsisi diğer hastalıklardan ayırt etmede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, sepsisli hastaları tedavi eden klinisyenleri daha iyi bilgilendirebilecek yeni biyobelirteçlere belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Hücre ölüm mekanizmaları sepsis patogenezinde özellikle immünosupresyonun gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar hücre ölüm yollarından nekroptozisin sepsis patogenezinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ise nekroptozis yolağında rol oynayan reseptör ile etkileşen protein kinaz 1 (RIPK1), RIPK2 ve RIPK3'ün sepsisli buzağılara ait kan örneklerinde mRNA seviyeleri değerlendirilerek veteriner hekimlikte sepsis patogenezindeki rolleri ve sepsis teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılma potansiyellerinin ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 1-20 gün yaş aralığında olan 20 holştayn buzağı ve kontrol grubu olarak aynı yaş aralığında olan 10 sağlıklı (holştayn) buzağı değerlendirilmiştir. Enterit enfeksiyonu şekillenen ve hastalığın ileriki aşamalarında sepsis kriterlerini sağlayan buzağılar çalışmaya dâhil edilmiş ve kan örnekleri lökosit (WBC), eritrosit (RBC), hemoglobin (Hb), hemotokrit (Ht) ve trombosit parametreleri ölçülmüştür. Arta kalan kan örneklerinden total RNA izole edilmiş, elde edilen RNA örneklerinden İScript Reverse Transkripsiyon kiti kullanımı ile cDNA sentezlenmiş ve kantitatif PCR (qPCR) yöntemi kullanılarak hedef genlerin görelî ifade seviyeleri belirlenmiştir. qPCR sonuçları RIPK1 ve RIPK3 ifadelerinin sepsisli buzağılarda kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığını gösterirken, RIPK2 ifade seviyesi düşük olduğu için örneklerde saptanamamıştır. Sonuç olarak, veteriner hekimlikte sepsisli buzağuların teşhisinde RIPK1 ve RIPK3 mRNA ifadelerinin biyobelirteç olarak kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmüş ancak daha ayrıntılı deneysel sepsis modellerinin kurulması gerekliliği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, Buzağı, Hücre Ölümü, Nekroptozis, RIPK1, RIPK3

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0522-YL-18 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M. Sc. Thesis

The Role of RIPK1, RIPK2 and RIPK3 Expression in Sepsis Pathogenesis in Calves

Atilla DOĞAN

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ

April, 2020

Sepsis, a dysregulated inflammatory response to infection, often results in organ dysfunction syndrome and causes death. There is no specific treatment for sepsis to date. Traditional biomarkers widely used in clinical practice to diagnose sepsis are insufficient to distinguish sepsis from other diseases. Therefore, there is a need to develop new biomarkers that can better inform clinicians treating patients with sepsis.

Cell death mechanisms play an important role in the pathogenesis of sepsis, especially in the development of immunosuppression. Studies in human medicine show that necroptosis, one of the cell death pathways, has an important role in the pathogenesis of sepsis. In this study, it was aimed to reveal the role and their potential use as biomarkers of mRNA levels of receptor interacting protein kinase1 (RIPK1), RIPK2 and RIPK3 which play a role in the necroptosis pathway as in blood samples of calves with sepsis in veterinary medicine.

In our study, 20 Holstein calves between 1-20 days of age and 10 healthy (Holstein) calves in the same age range as the control group were evaluated. Calves, which form the infection of enteritis and meet the sepsis criteria in the later stages of the disease were included in the study and their leukocyte (WBC), erythrocyte (RBC), haemoglobin (Hb), haematocrit (Ht) and platelet parameters were measured. Total RNA was isolated from the remaining blood samples using the nucleosol agent, cDNA was synthesized from the RNA samples obtained using the commercial kit, and relative expression levels of the target genes were determined using the quantitative PCR (qPCR) method. While qPCR results showed that RIPK1 and RIPK3 expressions significantly decreased in calves with sepsis compared to the control group, RIPK2 could not be detected in the samples because of its low expression level. As a result, it is thought that RIPK1 and RIPK3 mRNA expressions could be used as biomarkers in the diagnosis of calves with sepsis in veterinary medicine, but more detailed experimental sepsis models were required to be established.

Keywords: Sepsis, Calves, Cell Death, Necroptosis, RIPK1, RIPK3

The present M.Sc. Thesis was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Unit Under the Project number of 0522-YL-18

1. GİRİŞ

Sepsis çoğunluğu düşük ve orta gelirli ülkelerde olmak üzere, her yıl en az 19 milyon hasta kaybı ile dünyanın önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Görülme sıklığı çeşitli nedenlerle artmaktadır. Yoğun bakım hastalarında bile, uygun antibiyotikler, sıvı takviyesi yapıldığı halde hastalar hızla septik şoka girebilmekte ve bu da çoklu organ yetmezliğine ve ölüme yol açabilmektedir. Bazı hastalar erken akut enflamatuvar fazın ilk günlerinde ölür, ancak çoğunluk derin immünosupresyonun neden olduğu ikincil enfeksiyonlardan birkaç gün sonra ölür. Birçok farklı bağışıklık hücrelerinin, yangısal araçların ve pıhtılaşma faktörlerinin dahil olduğu sepsisin patofizyolojisi tam olarak anlaşılmamıştır (Singer vd., 2016).

Sepsis, doğrulanmış veya şüphelenilen enfeksiyonun bir sonucu olarak sistemik bir enflamatuvar yanıt sendromunun (SIRS) gelişmesiyle tanımlanan bir durumdur ve genellikle ölüme yol açan sistemik organ yetmezliği ile birlikte seyreder (Ok vd., 2015; Singer vd.,2016).

Yenidoğan buzağılarda kolostral transferin yetersizliğine bağlı olarak en sık görülen morbidite ve mortalite nedenleri arasında yer alan ishal sonrası görülen sepsis çiftlik hayvanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olabilir (Fecteau vd., 2009; Basoglu vd., 2014). Yeni doğan buzağılarda başlıca ölüm nedenleri; ishal, pnömoni ve sepsistir. Sepsis bunlar içersinde en yaygın olanıdır. Buzağılarda ishal ve pnömoni hastalıklarında erken tanı ve tedavinin yapılamaması durumunda ise, sepsisle ilişkili organ yetmezliği gelişmekte ve ölüme sonuçlanmaktadır. Yeni doğan buzağılarda sepsis büyük risk oluşturmaktadır. Yeni doğan buzağılarda gelişen sepsis çoğunlukla yüksek mortalite ile sonuçlanmaktadır. Çünkü yeni doğan buzağuların bağışıklık sistemi tam olarak şekillenmemiştir. Bu durumda buzağuların enfeksiyonlara karşı korunmasında kolostrum önemlidir. Kontamine ortamda doğan buzağular normal bağırsak florası gelişmeden viral patojenler enfeksiyonun oluşmasına neden olurlar. Solunum yolu (inhalasyon), uterus, göbek kordonu ve kontamine kolostrum buzağular için önemli enfeksiyon giriş yollarıdır (Constable, 2007).

İnsan hekimliğinde gelişen teknoloji, güçlü antibiyotikler ve gelişmiş yoğun bakım ünitelerine rağmen, sepsis'den ölüm oranı oldukça yüksektir (Raghavan ve Marik, 2006). Sepsis'den Amerika'da her yıl yaklaşık 200.000, Avrupa'da ise 150.000'den fazla insan ölmektedir (Angus ve Wax, 2001). Türkiye'de ise her yıl 50.000'den fazla hastada sepsis

geliştiği düşünölmekte ve ölüml oranı %16-60 arasında seyretmektedir (Baykal vd., 2001). Veteriner hekimlikte kedilerde sepsis görölme oranının %1-5 olduğu ve tedaviye alınan kedilerde hayatta kalma oranının %10-25, köpeklerde sepsis görölme oranının %6-10 ve hayatta kalma oranının %25-50 olduğu belirtilmiştir. Taylarda ise %45-55 oranında ölüml olduğu belirlenmiştir (Sanchez, 2005; Otto, 2007). Buzağılara ait sepsis ve sepsise bağlı ölüml oranları ile ilgili veriler net olarak bulunmamaktadır. Buzağılarda gözlenen sepsis ile ilgili ölümler ve tedavi giderleri önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Trefz vd., 2013).

Sepsis, patogenezi üzerine yapılan birçok çalışma ve antimikrobiyal tedavi alanındaki gelişmelere rağmen yoğun bakım ünitesinde gözlemlenen insanlarda halen mortalite oranı çok yüksek seyretmektedir (Hotchkiss vd., 2016). Bu nedenle günümüzde halen önemini korumakta ve erken dönemde tanı koyulmadığı ve septik şok geliştiği anda mortalite oranı artmaktadır. Bu nedenle yeni doğan buzağılarda çoklu organ yetmezliği gelişmeden erken müdahale edilmesi gereken bir durumdur (Sanchez, 2005). Yoğun bakım ünitelerinin olmadığı, buzağılarda sepsis çalışmalarının sınırlı sayıda olduğu veterinerlik alanında sepsis patogenezinin ortaya koyulması gereken güncel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır ve bu sonuçlar ışığında yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Şiddetli sepsisli hastalarda çoklu organ yetmezliği / disfonksiyon sendromunun patogenezi çok faktörlü bir süreçtir. Sistemik oksijen iletimi ile periferik oksijen talebi arasındaki dengesizlikten dolayı global doku hipoksisi önemli bir rol oynamaktadır. Sonuçta ortaya çıkan epitel hücrelerinin işlev bozukluğu ve ölümlü, hastaların sepsiste hayatta kalması için zararlıdır (Hassoun vd., 2001; Mainous vd., 1995).

Hücre ölümlü çok hücreli organizmalarda yaşama karmaşık bir şekilde bağlantılıdır. Hücre ölümlü, proliferasyon ve farklılaşma arasındaki denge, yaşam boyunca doku homeostazının korunması için çok önemlidir. Düzenlenmiş hücre ölümlü, gelişmekte olan organların şekillendirilmesi, epitelyal hücre yenilenmesi ve lenfosit seçimi de dâhil olmak üzere birçok fizyolojik süreç için gereklidir. Bununla birlikte, gelişimsel olarak düzenlenmeyen hücre ölümlü, stres, yaralanma veya enfeksiyonun bir işaretidir. Doku hasarı ve hastalık patogeneziyle bağlantılıdır. Enflamasyon, etkili konakçı savunması ve doku onarımı için gerekli olan enfeksiyon veya doku hasarına yanıt olarak indüklenen bağışıklık sisteminin bir reaksiyonudur. Ancak, kontrolsüz aşırı ve uzun süreli enflamatuar yanıtlar doku hasarına neden olur. Akut ve kronik enflamatuar hastalıkların patogenezinde katkıda bulunur (Pasparakis ve Vandenabeele, 2015).

Kerr ve arkadaşları tarafından apoptozis tanımının yapıldığı 1972 yılından itibaren uzun bir süre, programlı (düzenlenmiş) hücre ölümü apoptozis ile düzenlenmemiş ve kaza eseri oluşan nekroz olmak üzere iki hücre ölüm tipinin varlığına inanılıyordu. Ancak, zamanla elde edilen deneysel kanıtlar düzenlenmiş nekrozu tanımlamış ve apoptotik olmayan düzenlenmiş hücre ölüm mekanizmalarının varlığını desteklemiştir. Nekroptozis, parthanatoz, ferroptoz, piroptoz ve NETosis dâhil olmak üzere çeşitli düzenlenmiş nekroz türleri bildirilmiştir (Kerr vd., 1972).

TNF- α tarafından indüklenen nekroptozis oldukça düzenli bir şekilde düzenlenmiş bir işlemdir (Degterev vd., 2005). Nekroptozis morfolojik olarak nekrozla benzerdir (Galluzzi vd., 2011). RIPK1'in nekroptozis sinyal yolunda rol oynadığı bulundu. RIPK1 kinaz, TNF- α varlığında kompleks oluşumuna yol açar (Micheau ve Tschopp, 2003). Karmaşık olarak çoklu poliyubikitin RIPK1 ve sonuçta IKK yolu aktivasyonuna ve transkripsiyon faktörü olarak işlev gören NF-kappa B'nin translokasyonuna yol açar. CYLD, RIPK3 gibi enzimler, RIP Homotipik Etkileşim Motifi (RHIM) yoluyla RIPK1 ile bağlanır ve böylece fosforilasyona neden olur ve nekroptozis için çok kritik olan sitozolik kompleks 2 oluşumunu oluşturur. TNF-a ve z-VAD-FMK ile tedaviden sonra, RIPK1 ve RIPK3'ün RHIM ve kinaz alanlarının her ikisinin de nekroapoptozis için önemli olduğu bulunmuştur (Zhang vd., 2009; Cho vd., 2009). RIPK1'in RIPK3 fosforilasyonu için çok önemli olduğu ve her iki proteinin de nekrozom denilen bir kompleks oluşturduğu bulunmuştur (Cho vd., 2009; He vd., 2009). RIPK1 ve RIPK3 apoptozis için önemli değildir, ancak RIPK3 nekroptozis için zorunludur (Zhang vd., 2009). Bu kinaz yolu, apoptozisi nekroptozisten ayıran temel yoldur.

Bu mekanizmalar sepsis gibi mortalitesi yüksek hastalıklarda yer aldığından, nekroptotik hücre ölümünü düzenleyen moleküler olayların daha iyi anlaşılması hastalık tedavisi için son derece faydalı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

1980'li yılların başlarına kadar sepsis tanımı üzerinde görüş birliği sağlanamamıştır. Sepsis oluşması ve gelişmesi çok yönlü olan bir hastalıktır. Sepsis immünolojik, kardiyovasküler ve endokrin sistem üzerinde etki gösterir. Sepsisin karmaşık yapısı, bulguların çeşitliliği ve farklı klinik tabloların ortaya çıkması nedeniyle, tanıda gecikmeler sık yaşanmaktadır. Bu durum tedavi sürecini zorlaştırmaktadır (Oral., 2006).

1986'da, sepsiste çoklu organ yetmezliğine doğru gidişte gastrointestinal kanalın rolüne dikkat çekilmiş, 1990'da da sepsiste sonucu enfeksiyonun değil, konak yanıtının belirlediği ilk kez ileri sürülmüştür. 1990'ların başında terminolojide görüş birliği sağlanması için yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Sepsiste konağın pasif olmadığı, organ hasarında endojen inflamatuvar medyatörlerin rolleri, aynı inflamatuvar yanıtın non-enfeksiyöz tetiklenmelerle de ortaya çıkabildiği, enfeksiyon yok edilse bile klinik yanıtın sürebilir olduğu ortaya konmuştur (Oral., 2006).

Sepsiste iki anahtar bulgu doğuştan gelen bağışıklık tepkisini karakterize eder. İlk bulgu, sepsisin genellikle birden fazla enfeksiyondan türetilmiş mikrobiyal ürünün ve endojen tehlike sinyallerinin, birincil işi gözetim olan hücrelerdeki tamamlayıcı ve spesifik hücre yüzeyi reseptörleri ile eşzamanlı olarak tanınmasıyla başlatıldığıdır. Patojene bağlı moleküler modellerin (PAMP) veya hasara bağlı moleküler modellerin (DAMP) tamamlayıcı, Toll benzeri reseptörler, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptörler, retinoik aside indüklenebilir gen (RIG) benzeri reseptörler, mannoz bağlayıcı lektin ve çöpçü reseptörleri, diğerleri arasında, fazlalık ve tamamlayıcı aktivitelerle kompleks bir hücre içi sinyalizasyon sistemini indükler (Hotchkiss vd., 2016). Sepsis içindeki ikinci anahtar bulgu, bu çoklu sinyal yollarının aktivasyonunun sonuçta enflamasyon, uyarlanabilir bağışıklık ve hücrel metabolizmaya karışan birkaç yaygın gen sınıfının ekspresyonuna yol açmasıdır. Yani, bakteri, virüs ve mantarların birçok farklı bileşeninin yanı sıra, doku yaralanmasının, konakçı ürünlerinin tanınması, mitojenle aktive edilmiş protein kinazların (MAPK'lar) fosforilasyonuna yol açan pro-enflamatuvar ara maddelerin toplanmasına yol açar. Janus kinazlar (JAK'lar) veya transkripsiyonun sinyal transdüktörleri (STAT'lar), aktivatörleri ve nükleer faktörün (NF-κB) nükleer translokasyonu, sadece birkaçıdır. Bu ara ürünler, erken aktivasyon genlerinin ekspresyonunu başlatır. Birlikte ele alındığında, doğal bağışıklığın bu iki özelliği, yoğunluğu ve yönü PAMP'lerin ve DAMP'lerin repertuarının seviyesi ve varyasyonu ile aktive edilen sinyal yolları tarafından ince bir şekilde düzenlenebilen ortak bir tepki paterni

sağlar. Yolların bu tamamlayıcı doğası, yaygın gram negatif yada gram pozitif bakteriyel, fungal, viral enfeksiyonlara ve doku hasarı ile örtüşen erken inflamatuvar yanıtı açıklamaktadır (Hotchkiss vd., 2016).

2.1. Sepsis Tanımları

2.1.1. Enfeksiyon

Dokuda ya da vücut sıvılarının da mikroorganizmaların bulunmasına bağlı oluşan patolojik olaylardır (Levy vd., 2003).

2.1.2. Sistemik Yangınsal Cevap Sendromu (SIRS)

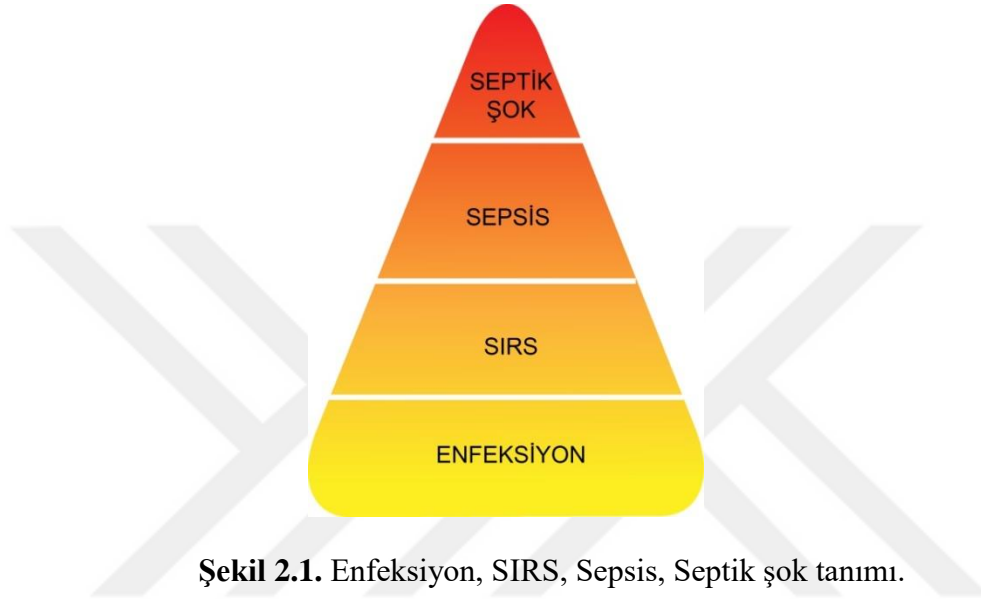
Nedenine bakılmaksızın canlılığın bağışıklık sisteminin göstermiş olduğu tepki olarak tanımlanır. Farklı uyaranlara karşı ya da tetikleyici bir olay nedeniyle aktifleşen, konakta gelişen ve zarar veren anormal sistemik bir inflamatuvar yanıtı SIRS (Sistemik yangınsal cevap sendromu) denir. Vücut sıcaklığı 38 °C' den yüksekse ya da 36 °C' den düşükse, kalp hızı 90 atım/dakikadan fazlaysa, solunum sayısı dakikada 20' den fazla ya da PaCO₂ miktarı 32 mmHg' dan düşükse, lökosit sayısı 12000 hücre /mm³' den fazla ya da 4000 hücre /mm³' den az ise veya kanda immatür formda lökosit oranı %10' un üzerinde ise; tüm bu bulgulardan en az ikisinin varlığın da SIRS tanımlanır (Fecteau vd., 2009).

2.1.3. Sepsis

Eski Yunan literatürünün de bozulma, kokuşma, çürüme anlamına gelmektedir. Canlı da bağışıklık sisteminin göstermiş olduğu anormal tepkiye ilaveten enfeksiyon varlığı veya enfeksiyon şüphesi sepsis olarak ifade edilir. Sepsis, SIRS belirtilerinden en az iki tanesine ilaveten enfeksiyonun varlığıdır (Bone vd., 1992; Roy., 2004; Fecteau vd., 2009).

2.1.4. Septik Şok

Septik şok, yeterli sıvı verilmesine rağmen kan basıncının inatçı bir şekilde düşüklüğü veya kanda laktat yükselmesiyle karakterize olup, dolaşım ve hücrel metabolizma anormalliklerinin mortaliteyi önemli ölçüde artıracak kadar derin olduğu şekil 2.1.'de görüldüğü gibi bir sepsis alt kümesi olarak tanımlanmaktadır (Singer, 2016).



2.2. Sepsis Tanılama

Sepsis veya septik şok tanısını koyan tek bir tanı testi mevcut değildir. Sepsis ve septik şok, işaretler, semptomlar, laboratuvar anormallikleri ve karakteristik patofizyolojik düzensizlikler ile tanımlanan klinik sendromlardır. Klinisyenler bu terimleri çoğu zaman kesin olmayan bir şekilde kullanırlar, bu da sepsis teriminin ne anlama geldiğini açıklarken karışıklığa katkıda bulunur. 1991 SIRS kriterleri, sıcaklık, kalp hızı ve beyaz kan hücresi sayımı parametrelerini içeren klinik uygulamalara dönüştürülmesinin hatta sepsis klinik çalışmalarında giriş kriteri olarak etkili bir şekilde kullanılmasının oldukça zor olduğu kanıtlanmıştır. SIRS kriterleri artı enfeksiyonun sepsis tanımı olarak kullanılması, 'sepsis' etiketinin yerinde veya alakasız görüldüğü komplike olmayan enfeksiyonlarla başvuran hastaların büyük bir yüzdesine uygulanabilir. Örneğin, orta kulak enfeksiyonu olan çocukların çoğunda genellikle iki veya üç SIRS kriteri (ateş, taşikardi ve lökositoz) bulunur; bunları SIRS kriterlerine göre 'septik' olarak kabul etmek, özellikle evde tedavi için oral antibiyotik reçete edildiğinde klinik bir anlam ifade etmez. Benzer şekilde,

özellikle antibiyotiklerin deneye dayalı olarak başlatıldığı çok sayıda hastada, kandaki veya vücut sıvılarındaki bakterilerin saptanması genellikle sorundur. Varsayılan sepsis vakalarının % 30 kadarında hiçbir patojen tanımlanmamıştır. Çoğu durumda, enfeksiyon kanıtı radyolojik olarak veya hematolojik ölçümlerden çıkarılır (Hotchkiss vd., 2016).

Sepsis ve septik şok tanısında yukarıda belirtilen 2015 yaklaşımı klinik gerçeklere ve kolayca elde edilebilen fizyolojik ve laboratuvar parametrelerine dayanmaktadır. Ayrıca, sepsis enfeksiyöz sürecin kendisiyle doğrudan ilişkili olmayan dokulardaki organ işlev bozukluğu ile karakterizedir. Kolayca elde edilebilen klinik ölçümler kullanılarak organ yaralanmasının hızlı bir başucu değerlendirmesi önerilmiştir. Gerçekten de, septik şokun erken kanıtı, sonuçta ortaya çıkan işlev bozukluğu olan dokuların hipoperfüzyonu ve nihayetinde enflamatuvar olayı takip eden veya yakın zamanda meydana gelen organ yetmezliği ile kendini gösterir (Hotchkiss vd., 2016)

2.3. Sepsis Doku Hasarları - Hastalıkları

Sepsis, muhtemelen bozukluğun başlangıcında genel dolaşıma salınan sitokinler ve diğer araçlardan olayı vücudun tüm organlarını etkileyebilen sistemik bir hastalıktır. Sepsisin belirtileri ve semptomları değişkendir ve etkilenen organ sistemlerine bağlıdır. Sepsiste altı tip organ disfonksiyonu baskındır: nörolojik (değişmiş zihinsel durum), pulmoner (hipoksemi ile), kardiyovasküler (şok), böbrek (oligüri ve / veya artmış kreatinin konsantrasyonu), hematolojik (azalmış trombosit sayısı) ve hepatiktir (hiperbilirubinemi) (Hotchkiss vd., 2016).

2.4. Hücre Ölüm Yolakları

Canlıların yaşam döngüsünün temel unsurları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Yaşamın sürdürülmesi, organizmada yapı ve fonksiyonun fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğalmandan çok hücre öldüğü ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücrenin çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür (Mak., 2003). Hücre ölümü, doku homeostazisini kontrol eden doğal bir olaydır. Kerr ve arkadaşları tarafından apoptozis tanımının yapıldığı 1972 yılından itibaren uzun bir süre, programlı (düzenlenmiş) hücre ölümü apoptozis ile düzenlenmemiş ve kaza eseri oluşan nekroz olmak üzere iki hücre ölüm tipinin varlığına inanılıyordu. Ancak, zamanla elde edilen deneysel kanıtlar düzenlenmiş nekrozu tanımlamış ve apoptotik

olmayan düzenlenmiş hücre ölüm mekanizmalarının varlığını desteklemiştir. Nekroptozis, parthanatoz, ferroptoz, piroptoz ve NETosis dâhil olmak üzere çeşitli düzenlenmiş nekroz türleri bildirilmiştir (Galluzzi vd., 2012).

2.4.1. Apoptozis

Apoptozis, doku fonksiyonunu ve normal fizyoloji koşulları sürdürmek için hasarlı, işlevsiz veya artık gerekli olmayan hücreler, düzenlenmiş hücre ölümü ile sürekli olarak temizlenir ve ideal olarak yeni sağlıklı hücreler ile değiştirilir (Sedger vd., 2010). Bu normal hücre ölüm süreçleri ters gittiğinde, sonuçlar felaket olabilir. Nörodejeneratif, kardiyovasküler, otoimmün ve bulaşıcı hastalıklarda dâhil olmak üzere dünya çapında ölüm ve sakatlığın önde gelen nedenlerini oluşturan hastalıkların çoğu, aşırı veya yetersiz hücre ölümünü içerir (Lu vd., 2014). Bir şekilde hızlanmış veya yavaşlamış bir apoptozis patolojiktir. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığında AIDS, Nörodejeneratif hastalıklar, İnsüline bağımlı tip diyabet, Hepatit C infeksiyonu, Miyokard enfarktüsü, Ateroskleroz gibi hastalıklara, yavaşladığında ise, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi hastalıklara neden olur. Apoptozis kendine özgü morfolojik ve biyokimyasal işlemlerin devreye soktuğu bir hücre ölümüdür. Genel olarak apoptozisin düzenlenmesinde Kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler, Mitokondri organeli rol oynar (D'Arcy, 2019). Apoptozis uyarısı alan hücrede ROS (Reaktif oksijen türleri) seviyesi artışı; sitokrom-c, apoptozis-indükleyici faktör (AIF) ve kaspazlar gibi apoptotik faktörlerin salınımlarına neden olur (Qian vd., 2012). Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alır. Bcl-2 ailesinin homodimer ya da heterodimer formu apoptoziste önemli rol oynar. Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyeleri (Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa) ve antiapoptotik üyeleri (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, A1, Nr-13) vardır. Hücrede sitoplazmada bulunan proapoptotik proteinler sitokrom-c ve AIF (Apoptozis indükleyici faktör) salınımını arttırarak hücreyi apoptozise yönlendirirler (Singh vd., 2019). Antiapoptotik proteinler mitokondri organelinin dış zarında, endoplazmik retikülümde ve çekirdek zarında bulunurlar. Por oluşumunu sağlayıp iyon geçişini düzenlerler. Özellikle hücredeki kalsiyum miktarını kontrol ederler. Ayrıca şekil 2.2'de görüldüğü gibi kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozisi inhibe ederler. P53, hücrede DNA hasarı oluştuğunda hücre siklusunu G1 fazında durdurarak, hücreye DNA tamiri için zaman veren bir transkripsiyon faktörüdür.

Hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımını artırıp Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve apoptozisi indükler (Lee vd., 2010). Kaspazlar sistein-proteaz ailesi üyelerinden olup, apoptozisin düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar (Lin vd., 2013). Apoptoziste kaspazların aktivasyonu görülür. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Kaspazlar görevlerine göre üçe ayrılır; başlangıç kaspazları (kaspaz-2,-8,-9,-10), efektör kaspazlar (kaspaz-3,-6,-7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1,-4,-5)dır (Kalimuthu ve Se-Kwon., 2013). Hücrede DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimlerin çalışmasını durdururlar. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar. Hücre bulunduğu ortamdaki uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır, büzülür, ve kromatini yoğunlaştırır. DNA'sı nukleozomlarından kesilir jel elektroforezinde tipik merdiven bant görünümü alır. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarı yapısında bulunan fosfatidil serin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olur. Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, ancak inflamasyon görülmez (Galluzzi vd., 2018).

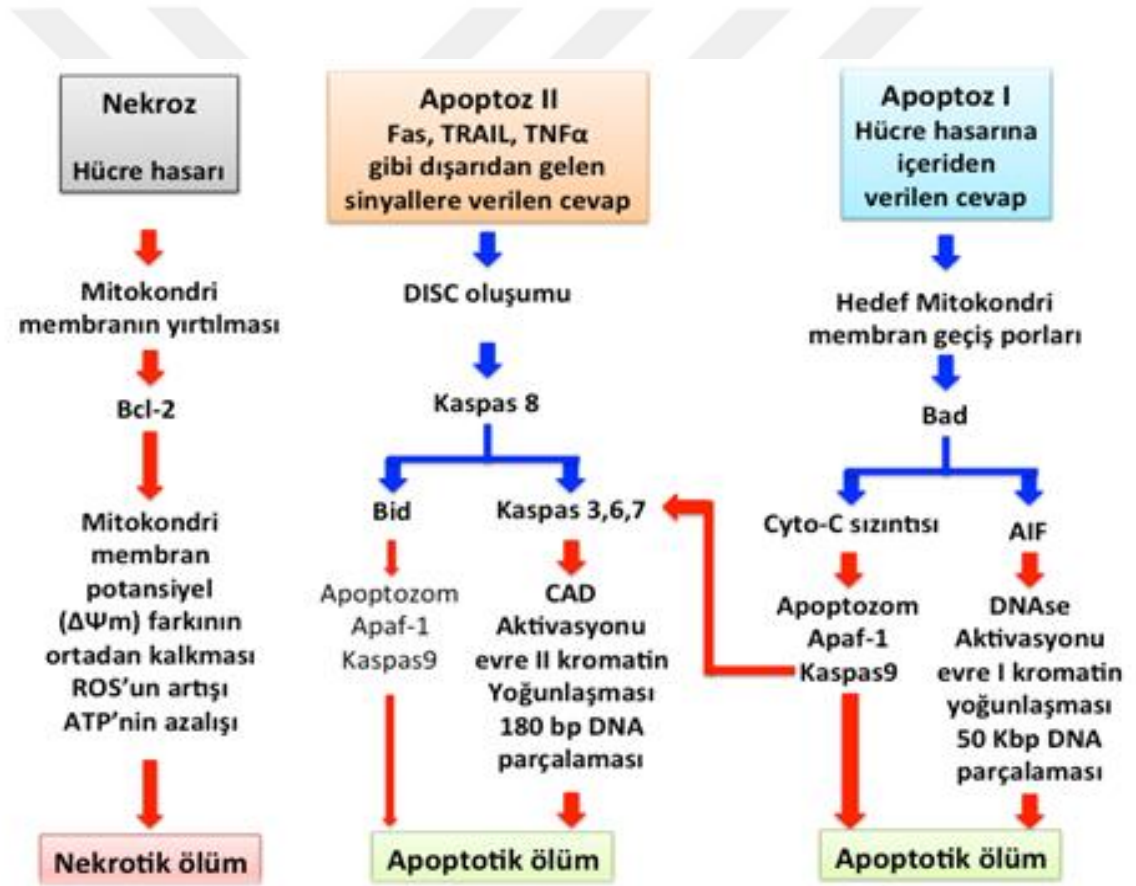
2.4.2. Nekroz

Apoptozisten farklı olarak, genellikle düzensiz ve kazara oluşan, düzenlenmemiş istenmeyen bir hücre ölümüdür (Kroemer, 2005). Çoğu zaman nekroza yanıklar, yaralanma, enfeksiyon, kanser, enfarktüs, zehirlenme gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler, bozukluklar ve hastalıklar neden olur. Tıpkı bir canlının ağır bir darbe alması, ciddi şekilde hastalanması veya çeşitli kimyasallara maruz kalması durumunda ölmesi gibi, nekroz durumunda da benzer sebeplerle hücreler ölmektedir. Nekrozun neden olduğu hücre ölümü, toplam ATP tükenmesi altında gerçekleşen ve aşırı fiziksel - kimyasal stres, ısı, ozmotik şok, mekanik stres, donma, çözülme ve yüksek hidrojen peroksit konsantrasyonları gibi dış uyaranlardan kaynaklanan, kazara, düzenlenmemiş bir olay olarak kabul edilir. Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar hücrenin iyon dengesini bozar. Çekirdek, ER, golgi ve mitokondri şişer. Organel bütünlüğü bozulur. Hücre parçalanır ve içerikleri dağılır. İnflamasyon görülür. Mitokondriyal ROS (reaktif oksijen türleri) üretimi artar. Antiapoptotik proteazlar aktive olur. ATP üretimi azalır ve kalsiyum kanalları açılır (Golstein ve Kroemer, 2007).

Nekrotik hücre ölümü, genellikle kromatin yoğunlaşması ve düzensiz DNA bozunması paterni ile birlikte hücre zarlarının genel şişmesi ile morfolojik olarak

karakterize edilir. Sitoplazmik membranlar ve membranöz organeller genişler ve artan hücresel şişme, sitoplazmik içeriği hücre dışı boşluğa salan plazma zarının parçalanmasına neden olur. Hücre içi içeriklerin salınması, komşu hücreleri etkileyen büyük hücresel hasara yol açar, bu da nekrozun neden inflamatuvar ve otoimmün reaksiyonları tetiklediğini açıklar. Nekroz süreci fagositoz yokluğunda gerçekleşir ve son aşaması hücresel zarın bütünlüğünün kaybı ile karakterizedir. Nekrotik hücrelerin içeriğinin salınması, iltihaplanmayı teşvik eden sinyaller olarak hareket eden molekülleri içerir (Vanlangenakker vd., 2008).

Düzenlenmiş hücre ölümü apoptozis ile nekroz arasındaki en önemli fark plazma membran sızıntısı ve bunun sonucu olarak etkilenen dokuda hücre içi bileşenlerin salınmasından kaynaklanan inflamasyonun indüklenmesidir (Kerr, 1971).



Şekil 2.2. Apoptotik yollar (Weller, 2002).

2.4.3. Nekroptozis

Düzenlenmiş gerçekleşen ancak morfolojik olarak nekroze benzeyen hücre ölümüdür (Green vd., 2011). Nekroptozise, apoptozisi tetikleyen birçok etken neden

olabilmektedir. Apoptozisten ayıran temel faktör kaspazların inaktive olduğu koşullarda nekroptozisin gerçekleşmesidir, yani nekroptozisin gerçekleşmesinde kaspazların rolü yoktur. Nekroptozis için gerekli proteinlerin başında protein kinaz reseptör ilişkili serine/treonin protein kinaz 3 (RIPK3) gelmektedir (Galluzzi vd., 2012).

Nekroptozis, ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği düzenlenmiş bir nekrozdur (Berghe vd., 2014). Bu nekroz formu, morfolojik olarak hücre şişmesi ve ardından plazma zarının yırtılması ile karakterize edilen patojen aracılı enfeksiyonlara karşı gerçekleşir. Fas, TNF ve TRAIL gibi reseptör etkileşiminin, ekstrinsik apoptotik yolun başlamasına yol açan kaspaz-8'in aktivasyonu ile hücre ölümüne yol açabileceği iyi bilinmektedir (Taylor vd., 2008). Çok sayıda kanıt, kaspaz-8 molekülünün inhibisyonunun, RIPK3 ve MLKL'nin aktivasyonu nedeniyle ekstrinsik apoptozisin hücre ölümünü düzenlenmiş nekrotik hücre ölümü olan nekroptozise yönlendirdiği bilinmektedir (Vercammen vd.,1998; Holler vd.,2000; Cho vd., 2009; Zhang vd., 2009; Sun vd., 1999). Bu nedenle, kaspaz-8 bağımlı apoptotik yol bloke edildiğinde alternatif bir hücre ölüm yoludur.

Nekroptozisin başlamasına Fas, TNF ve LPS gibi immün ligandlar aracılık eder. Bu da MLKL'yi fosforilasyon ile aktive eden RIPK3'ün aktivasyonuna yol açar (Sun vd., 1999). Fosforile MLKL, plazma zarının iç yüzeyine yerleşir ve hücrenin bütünlüğünü bozar (Dondelinger vd., 2014; Hildebrand vd., 2014; Vang vd., 2014). Düzenlenmiş hücre ölümü için RIPK3 ve MLKL gerekli olsa da nekroptozis RIPK3 ve MLKL'yi eksprese eden belirli doku tipleriyle sınırlıdır (Sun vd., 1999; He vd., 2009; Murphy vd., 2013). Normal koşullarda kaspaz-8 molekülü, nekroptozisi bloke ederek, RIPK1 ve CYLD'yi parçalayarak apoptozisi aktive eder (Donnell vd., 2011; Van vd., 2013; Ofengeim ve Yuane, 2013). Nekroz, nekroptozisin aksine sitokinlerin salgılanmasının artmasına ve doku hasarına yanıt olarak salınan endojen moleküllerin salgılanmasının azalmasına yol açar. Tümör nekroz faktörü (TNF), hücre tiplerinin çoğunda inflamatuvar sitokin sentezini teşvik ederek Crohn hastalığı, sedef hastalığı, bağırsak hastalığı ve romatoid artrit gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklara neden olur (Kallioli ve İvashkiv, 2016; Sedger ve McDermott, 2014). TNF stimülasyonunun birincil sonuçları olarak kemokin ve sitokin üretimini düzenler (Cullen vd., 2013). TNF aracılı yanıtın düzenlenmiş nekroza yönlendirilmesi, inflamasyonun nekroptozise kayması değildir; klasik pro-inflamatuvar yanıtın aksine daha önce sona eren sağlam inflamatuvar yanıtın nekroptozise kaymasını temsil eder. Nekroptozis için iki temel koşul vardır: Hücrelerin RIPK3 ifade etmesi ve kaspaz-8 molekülünün inhibisyonunu gerçekleşmesidir (Ofengeim ve Yuane, 2013).

Tablo 2.1. Apoptozis, nekroptozis ve nekrozda hücrel özelliklerin karşılaştırılması.

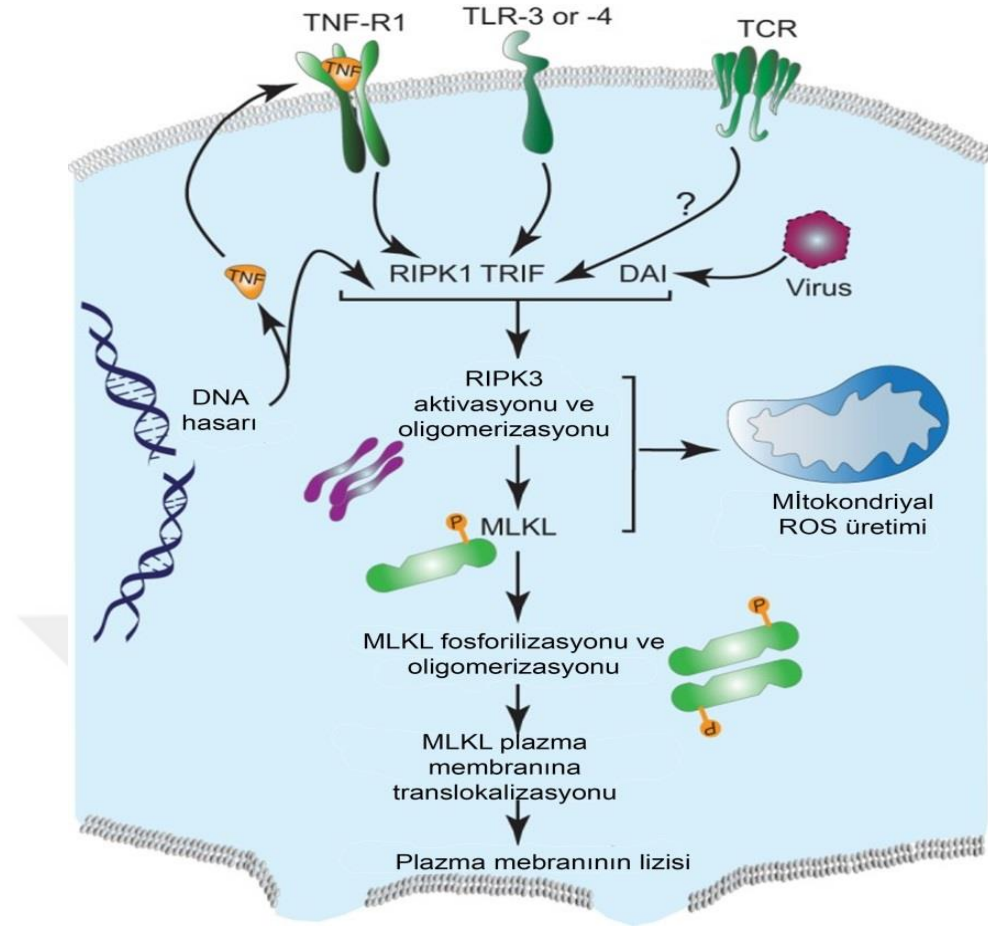
Apoptozis	Nekroptozis	Nekroz
Düzenlenmiş	Düzenlenmiş	Düzenlenmemiş
Spesifik sitokinler tarafından tetiklenir	Spesifik sitokinler tarafından tetiklenir	Çevresel stresin (aşırı fizyolojik stres ve viral veya toksin aracılı enfeksiyonlar gibi) zarar vermesi
Hücrenin büzülmesi	Hücrenin hızlı şişmesi	Hücre şişmesi
-	Organellerin şişmesi	Organellerin şişmesi
Plazma zarının bozulmaması	Plazma zarının bozulması	Plazma zarının bozulması
Apoptotik cisimlerin oluşumu	Organel dökümü	-
-	Hücrel içeriklerin serbest bırakılması	Hücrel içeriklerin serbest bırakılması
-	Pro-inflamatuar yanıt	Pro-inflamatuar yanıt

2.4.3.1 Nekroptozisin Başlatılması

En iyi karakterize nekroptozis indükleyicileri ölüm reseptörü ligandları, özellikle tümör nekroz faktörüdür (TNF). Nekroza neden olan özellikleri nedeniyle adlandırılrsa da, çoğu TNF araştırması bunun yerine pro-inflamatuar ve apoptotik işlevlerine odaklanmıştır. Uzun yıllar boyunca bazı hücre tiplerinde TNF'nin apoptotik olmayan bir hücre ölümü formunu indükleyebileceği bilinmektedir (Laster vd., 1988). TNF'nin yanı sıra Fas gibi diğer ölüm reseptör ligandlarının da kaspaz inhibisyonu koşulları altında nekroptozisi indüklediği gösterilmiştir (Matsumura vd., 2000). Son zamanlarda, nekroptozis sinyalizasyonunun anahtar moleküler bileşenleri tanımlanmıştır; bunlara RIPK1 ve RIPK3 ilişkili iki kinaz dahildir (Cho vd., 2009 ; He vd., 2009 ; Holler vd., 2000 ; Zhang vd., 2009). RIPK3, TNF'nin neden olduğu nekroptozis için temel molekül olarak tanımlanırken, RIPK1 nekroptoziste bazı durumlarda gerekli olmayabilir (Moujalled vd., 2013 ; Upton vd., 2010). Nekroptozisin yanı sıra RIPK1, hem TNF'ye bağlı nükleer faktör κ B (NF κ B) aktivasyonuna hem de apoptozise aracılık etmede köklü bir role sahiptir (Ofengeim ve Yuan, 2013).

Nekroptozisin başlatılması sırasında mevcut veriler, TNF reseptör-ligandının, adaptör proteini TRADD'nin alınması yoluyla dolaylı olarak bağlandığı basitleştirilmiş bir modeli desteklemektedir. Bu bağlanma, RIPK1 ve RIPK3 arasında bir etkileşime yol açmaktadır (Moriwaki ve Chan, 2013). RIPK1 ve RIPK3 proteinleri etkileşen protein

(RIP) homotipik etkileşim motifleri (RHIM) yoluyla reseptör ile etkileşime girer. Bu sırayla RIPK1 ve RIPK3'ün aktivasyonuna ve nekrozom adı verilen bir kompleksin oluşmasına yol açar. Nekrozom oluşumu ubikitinasyon ile yüksek oranda düzenlenir. Bu düzenleme, ubikuitin cIAP-1 ve cIAP-2 ligazları ile RIPK1 ubikuitinasyonu oluşumu gerçekleştirir. Deubikuitilaz CYLD, bu ubikuitinasyona karşı koyar ve nekrozom oluşumunu destekler (Geserick vd., 2009 ; Wang vd., 2008). Ölüm-reseptör ligandlarına ek olarak, diğer uyarılar RIPK3'e bağlı nekroptozisi şekil 2.3.'de görüldüğü gibi doğrudan (adaptörler yoluyla) veya dolaylı olarak (örneğin TNF ekspresyonu yoluyla) uyarabilir; bunlar, Toll benzeri reseptör (TLR) 3 ve TLR-4, T hücresi reseptörü (TCR) ligasyonu, DNA hasarı ve viral enfeksiyonu içerir (Ch'en vd., 2008 ; Feoktistova vd., 2011 ; He vd., 2011 ; Tenev vd., 2011). TLR'ler RHIM alanı içeren proteinler olan TRIF'lar ile köprü kurarak RIPK3 aktivasyonu sağlarlar. Fare sitomegalovirüs enfeksiyonunu takiben RIPK3 aktivasyonu ve nekroptozis için DNA bağlayıcı RHIM alanı içeren DAI proteini gereklidir (He vd., 2011 ;Upton vd., 2012). DNA hasarından sonra RIPK3 aktivasyonu ile nekroptozisi uyarabilir. RIPK3'ün aktivasyonu, ripoptozom adı verilen çoklu protein kompleksinde meydana gelir, bu kompleks RIPK1'e bağlıdır (Feoktistova vd., 2011 ; Tenev vd., 2011). Hücre ölümünün DNA hasarı ile etkileşimi TNF'ye bağımlı yada bağımsız bir şekilde ortaya çıkabilir (Biton ve Ashkenazi, 2011; Tenev vd., 2011). Benzer şekilde, TCR'nin uyardığı RIPK3 aktivasyonunun da RIPK1 gerektirdiği görülmektedir, ancak TCR'nin nekroptozisi nasıl başlattığı bilinmemektedir (Ch'en vd., 2008).

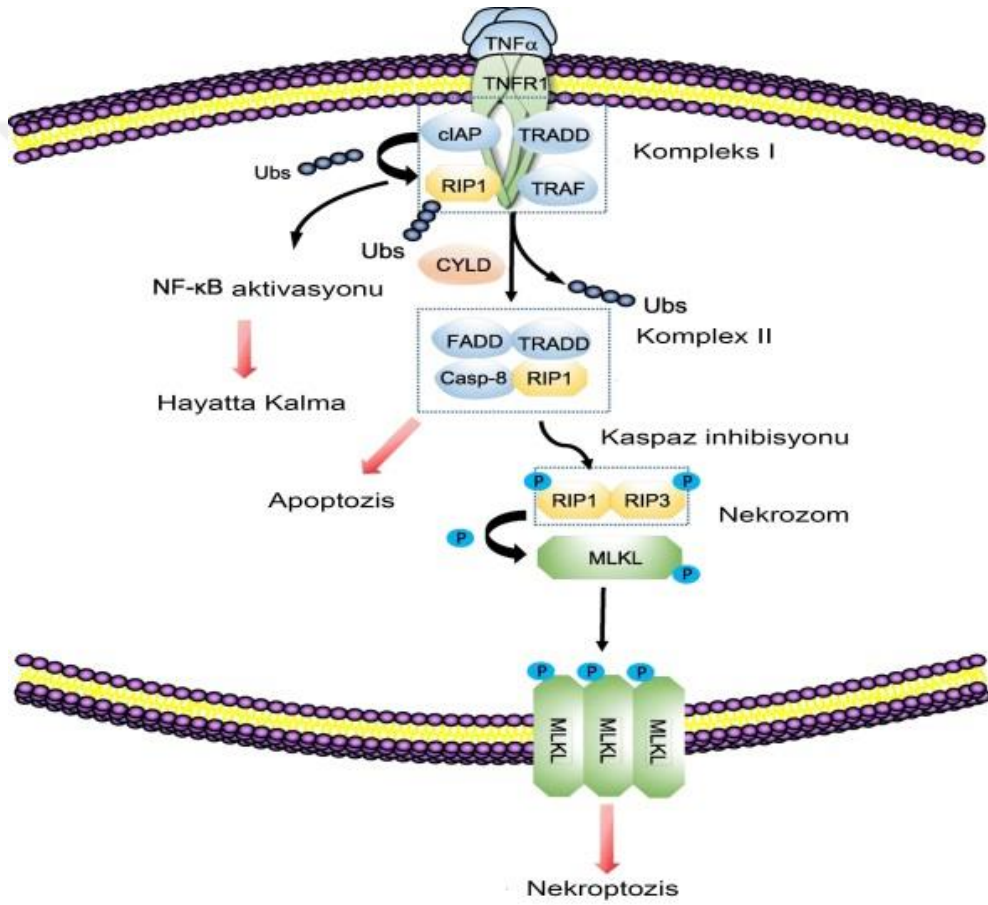


Şekil 2.3. RIPK3 aracılı nekroptozis mekanizmaları (Tait, 2014).

2.4.3.2 Nekroptozisin İşleyişi

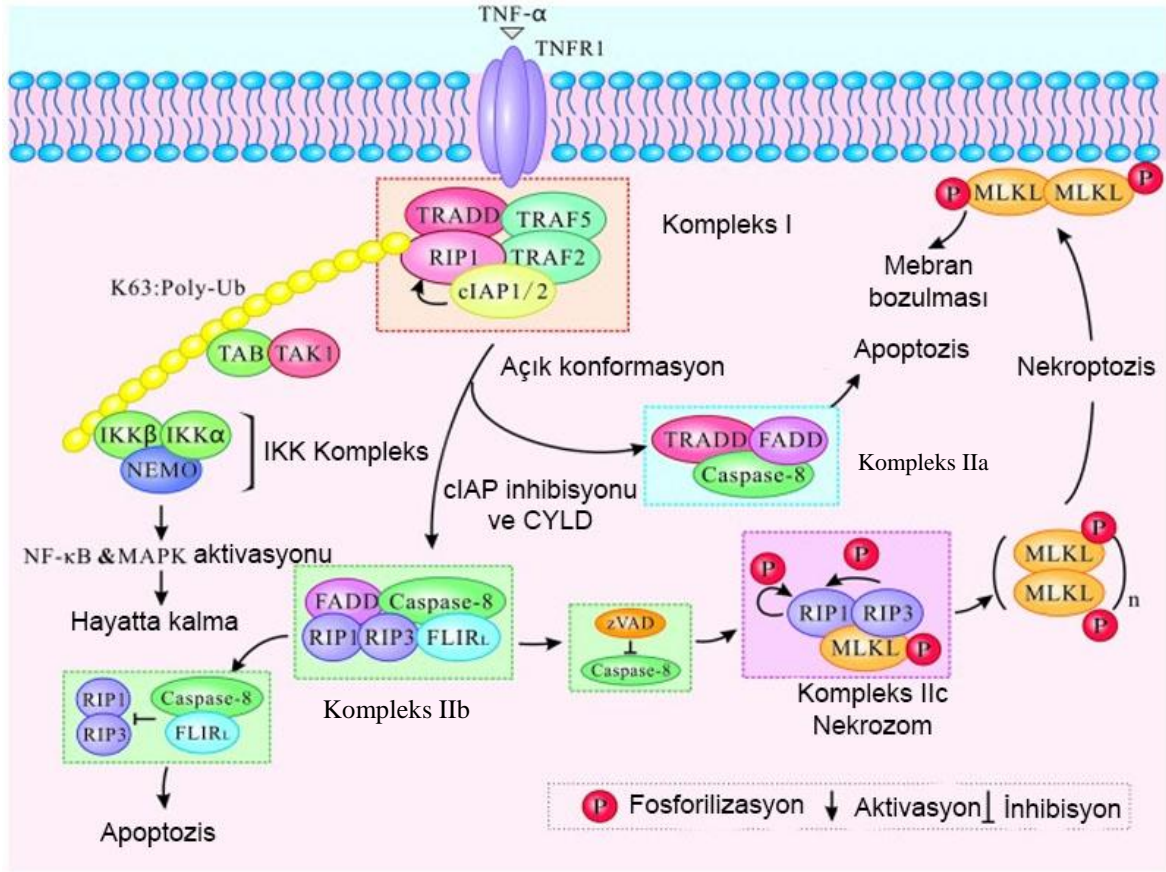
RIPK1-RIPK3 kompleksinin aktivasyonuna takiben, beta-amiloidlerin biyofiziksel benzerliklerini paylaşan büyük filamentli yapıların oluşumuna benzemektedir (Li vd., 2012). Bu amiloid yapılarının oluşumu, iki protein arasındaki RHIM-domainlerinin etkileşimlerine bağlıdır. RIPK3 aktivitesini aynı anda artırarak, bu amiloid yapıların çoğalması ile güçlü bir şekilde nekroptozise girer. Potansiyel olarak, amiloid oluşumunun derecesinin kontrol edilmesi, RIPK3'ün öldürücü işlevini, ya da inflamasyondaki öldürücü olmayan rollerine neden olabilir. TLR'ler ile uyarılarak etkileşime giren nekroptozis için amiloid yapıların oluşup oluşmadığı belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca, bu proteinli yapıların stabilitesi göz önüne alındığında, RIPK3 aktivitesinin yokluğunda bile hücrel toksisiteye katkıda bulunabilirler. Bu mekanizmanın hücre ölümünü gerçekleştiren RIPK3 kinaz aktivitesinin kontrolünde olduğu yakın zamana kadar anlaşılamamıştır. Psödokinaz karışık-soy kinaz domeni benzeri (MLKL), RIPK3'e bağlı nekroptoziste azalması ile anahtar bir faktör olarak tanımlanmıştır; bunun önemi, MLKL nakavt hücrelerde RIPK3'e

bağlı nekroptoze direnç sağladığı bulgusuyla vurgulanmaktadır (Murphy vd., 2013 ; Sun vd., 2012 ; Wu vd., 2013 ; Zhao vd., 2012). MLKL, nekrozom düzeneğini kendi başına düzenleyemez, bunun yerine RIPK3'ün RIPK3 ile oligomerizasyonu ve fosforilasyonu gereklidir. Aktif MLKL mutant hücrelerde RIPK3-eksik olduğunda bile mutant MLKL hücre ölümünü indükler, bu da, MLKL'nin nekroptozisteki anahtar RIPK3 substratı olduğunu kanıtlamaktadır (Murphy vd., 2013). Nekroptozisin nasıl işlediği tartışılmaktadır. Bazı çalışmalar, ATP tüketiminin veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasının Nekroptozis de rol aldığını bildirmiştir (Schulze vd., 1992 ; Zhang vd., 2009).



Şekil 2.4. TNF nekroptosis sinyal mekanizması (Gong, 2019).

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu nekroptotik ölüm için önemli bir göstergedir. Bu fikri destekleyerek, RIPK3 ve MLKL içeren nekrozom oluşumuna takiben, mitokondriyal olarak ilişkili endoplazmik retikulum (ER) membranlarına (MAMs) taşındığı bulunmuştur, ancak ölüm için translokasyonun gerekli olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır (Chen vd., 2013).



Şekil 2.5. TNFR1 aracılı sinyal yolları (Liu, 2019).

(TNF'nin reseptörüne bağlanmasından sonra, TNFR1 konformasyonel bir değişikliğe uğrar ve TRADD, TRAF2 / 5, RIP1 ve cIAP1 / 2'den oluşan kompleks I oluşturmak için çoklu proteinler toplar. RIP1'in cIAP1 / 2 ile K63'e bağlı ubiquitinasyonu, NF-κB yolunu ve hücre sağkalımını indükleyen TAK1 /TAB kompleksinin ve IKKα / IKKβ / NEMO kompleksinin oluşumunu ve aktivasyonunu destekler. Kompleks I'in destabilizasyonu, TRADD, FADD ve kaspaz-8 içeren kompleks IIa oluşumuyla sonuçlanır. CIAP'ler bloke edildiğinde ve RIP1 CYLD tarafından deubikutine edildiğinde, kompleks IIB oluşur. Bu RIP1, RIP3, FADD, kaspaz-8 ve FLIPL'den oluşur. Ila ve IIB'nin her ikisi de apoptozu başlatabilir. Kaspaz-8 kimyasal kaspaz inhibitörleri tarafından inhibe edildiğinde, RIP1 RIP3'e bağlanır ve molekül içi oto- ve trans-fosforilasyon ile RIP1/RIP3 oluşumu ile sonuçlanır. Daha sonra RIP3, nekrozom olarak adlandırılan kompleks IIC'yi oluşturmak için MLKL'yi toplar ve fosforile eder. Fosforile edilmiş MLKL daha sonra sitozolden plazmaya ve hücre içi zarlara geçer. MLKL'nin oligomerizasyonu, membran gözenek oluşumu ile sonuçlanır, membran parçalanması ile nekroptozise neden olur.)

İki mitokondriyal protein, mitokondriyal fosfataz olan PGAM5 ve mitokondriyal fisyon proteini olarak tanımlanmış Drp-1 nekrozom sinyallemesinin alt bileşenleri olarak önerilmiştir (Wang vd., 2012). RIPK3'e bağlı fosforilasyonun ardından, PGAM5'in kısa izoformu, Drp-1'i aktive ederek, mitokondriyal fisyon, ROS üretimine ve nekroptozise yol açar (Wang vd., 2012). Mitokondri eksikliği olan hücrelerde yapılan çalışmalarda mitokondriyal tükenmeye bağlı nekroptozisin, ROS'u önlesede TNF veya RIPK3 tarafından indüklenen nekroptozisin işleyişi üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Bu nedenle nekroptozisin işleyişinde efektör olarak mitokondri güçlü bir şekilde tartışılmaktadır (Tait vd., 2013). Mitokondriden bağımsız bir yürütme mekanizmasını destekleyen son çalışmalar, MLKL'nin plazma zarını geçirgenleştirebileceğini bulmuştur (Cai vd., 2014 ; Chen vd., 2014). RIPK3 aracılı fosforilasyonun ardından, MLKL oligomerleşerek plazma membranına yerleşir ve parçalanmasına yol açar. MLKL'nin plazma membranını nasıl geçirgenleştirdiği belirsizdir, ancak bu işlem katyon akışına izin veren katyonik kanallarla (TRPM7 gibi) fonksiyonel etkileşim gerektirebilir (Cai vd., 2014). Nekroptozis genel oluşum mekanizmasının farklı uyaranlar ve farklı hücrelerde nasıl gerçekleştiği, nekroptoziste ROS'un gerekli olup olmadığı, immün sistem reaktanları ile gerçekleşen nekroptotik ölümün ROS'tan nasıl etkilendiği, ROS'un hangi koşullarda apoptozis hangi koşullarda nekroptozisi tetiklediği hakkındaki sorular hala cevap beklemektedir (Kazama vd., 2008).

2.4.4. Apoptozis Ve Nekroptozis Arasındaki Ara Bağlantılar

Apoptozis ve nekroptozis derinden iç içedir; apoptozisi uyaran bazı uyaranlar, tipik olarak kaspaz fonksiyonu inhibe edildiğinde nekroptozisi başlatabilir. En iyi bilinen örnek, apoptozis veya nekroptozise girebilen TNF'dir. Apoptozis ve nekroptozisin ayrılması kaspaz-8 aktivitesi ile belirlenir. (Şekil 2.5. görüldüğü gibi). Ayrıca hücre ölümünün son şekli, hücre tipine, hücre mikro-ortamına ve başlangıç indükleyicilerine bağlı olmaktadır (Wang vd., 2003).

Bir apoptotik başlatıcı olan kaspaz-8, DISC oluşturmak için FADD ile etkileşime girer. Ardından homolog dimerizasyon ve proteolitik işleme tabi tutulur. Aktif kaspaz-8, daha sonra DISC'den salınır ve alt apoptotik sinyali başlatır. Bu arada kaspaz-8, RIPK1 ve RIPK3 inaktif hale getirerek nekroptozisi inhibe edebilir (He vd., 2009; Lin vd., 1999; Feng vd., 2007). Bununla birlikte, kaspaz-8'in aktivitesi, kaspaz inhibitörü ZVAD gibi farmakolojik olarak inhibe veya RNAi aracılı genetik olarak nakavt edildiğinde, RIPK1 ve

RIPK3 fosforilasyonu yoluyla aktive olur ve nekrozom oluşumu ile nekroptozisi başlatır (Vandenebeele vd., 2010; Moquin ve Chane, 2010; Holler vd., 2000).

Hücre içi ATP seviyeleri apoptozis ve nekroptozis arasındaki etkileşimde belirleyici bir role sahiptir. Yüksek ATP seviyeleri tipik olarak bir hücrenin apoptozise girmesini sağlarken, düşük ATP seviyeleri de nekroptozise yönlendirir. Bu nedenle, hücre içi ATP seviyelerinin tükenmesi, enerji gerektiren apoptotik hücre ölümünü nekrotik hücre ölümüne yönlendirir (Kono ve Rock, 2008; Shintani vd., 1999). Bununla birlikte, nekroptozis azda olsa düşük ATP seviyeleri gerektirmektedir. Çünkü ATP tükenmesi, hem apoptozisten hem de nekroptozisten morfolojik ve mekanik olarak farklı bir hücre ölüm yoluna yönlendirir (Lavrik vd., 2005). Bir hücrenin iki hücre ölümü yolu arasındaki kararında enerji merkezi rolü göz önüne alındığında mitokondri organeli önemli rol oynamaktadır. En iyi karakterize nekroptozisi indükleyen ligand olan TNF- α , mitokondriyal ATP üretimi ve ayrıca reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir (Lavrik vd., 2005). TNF- α ayrıca ATP'nin tükenmesine ve ardından nekroptozise yol açan PARP1'in aktivasyonunu indükler (Kono ve Rock, 2008). PARP1 DNA onarımı, DNA stabilitesi ve transkripsiyonel regülasyonda rol oynayan nükleer bir enzimdir. PARP1, DNA hasarı ile aktive olur (Kono ve Rock, 2008; Kerr vd., 1972). Genotoksik faktörlere maruz kalan hücrelerdeki PARP1'in inhibisyonu, azalmış DNA onarım oranlarına ve artmış ROS'a yol açar (Kirisako vd., 2000; Hanada vd., 2007). PARP1 aşırı aktivasyonu büyük miktarlarda NAD⁺ tüketerek büyük bir ATP tükenmesine neden olur (Diao vd., 2017; Cheng vd., 2017). Bu nedenle PARP1, hücredeki ATP seviyelerini düzenleyerek apoptozis ve nekroptozis arasında moleküler bir geçiş işlevi görür.

Bcl-2 ailesi üyeleri, dış mitokondriyal membranın bütünlüğünü belirleyen karmaşık etkileşimlerle apoptozisin mitokondriyal yolunu düzenler (Chipuk vd., 2010; Green ve Evan, 2002). Daha önce de belirtildiği gibi bu yol, mitokondriyal intermembran boşluğundaki çözünür proteinlerin (örn., Sitokrom c) sitozole yayılmasına izin veren MOMP tarafından başlatılır. Sitokrom c Apoptotik Proteaz Aktifleştirici Faktör 1'in (APAF1) apoptozom olarak adlandırılan bir kaspaz aktivasyon kompleksine oligomerleşmesine neden olur. Bu başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonunu uyarır, daha sonra apoptotik fenotipi ortaya çıkarmak için çeşitli substratları parçalayan kaspaz 3-7'yi aktive eder (Riedl ve Salvesen, 2007).

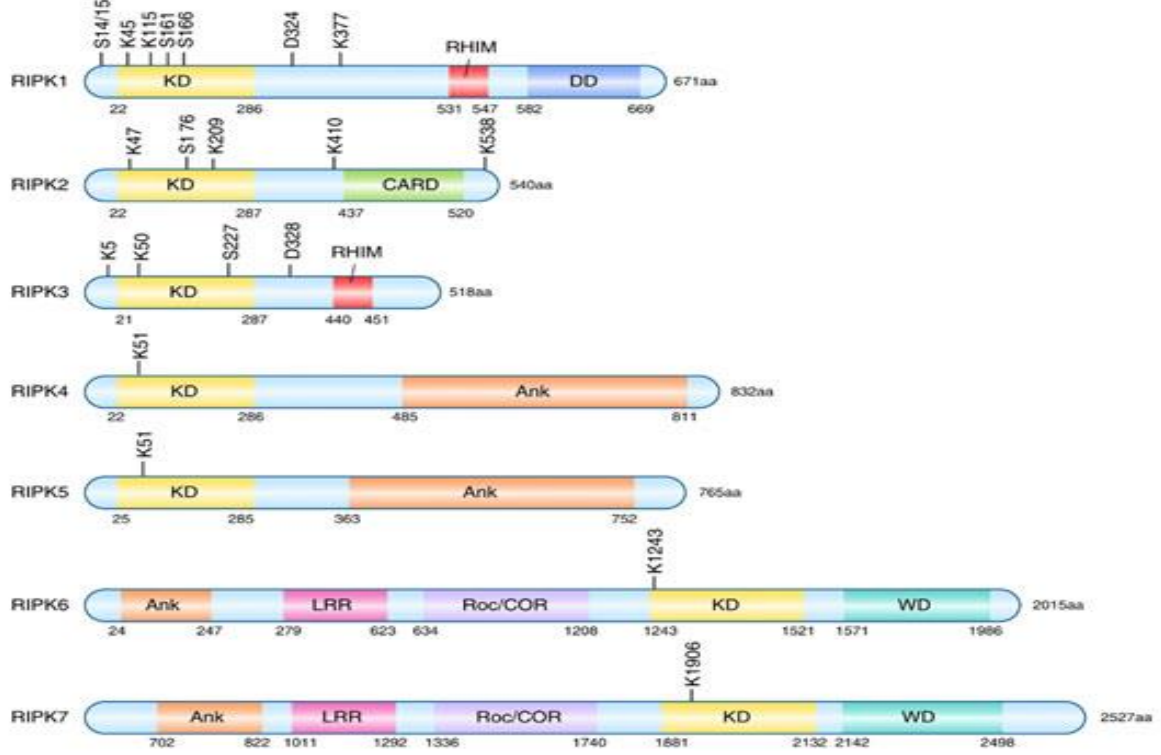
Bcl-2 ailesi üyeleri apoptozis de iyi bilinen rollere sahipken, nekroptozise katılımları henüz yeni ortaya çıkmaya başlamıştır. Bcl-2'nin düzenlenmiş nekrotik hücre

ölümündeki rolü ile ilgili çalışmalar, pankreasta insülin üreten β hücrelerinin aşamalı olarak yok edilmesinden kaynaklanan kronik bir otoimmün hastalık olan insüline bağımlı diabetes mellitus modelleri üzerinde yapılan çalışmalardan gelmiştir (Bach, 1994). β hücrelerinin çeşitli uyarılara cevap olarak apoptozis ile öldüğü açıkça gösterilmiştir ve Bcl-2'nin aşırı ifadesi ile ölümlerinin önlenebileceği açıkça gösterilmiştir (Delaney vd., 1997; Rabinovich vd., 1999). Bununla birlikte, düzenlenmiş nekrozun, aktif makrofajlar dokuya çekildiği zaman, hastalığın erken evrelerinde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Sıçanlarda insülin üreten β hücre hattı kullanılarak, yapılan çalışmada, bu hücrelerin çeşitli sitokinlerle indüklenmesi hem apoptozisin hem de nekroptozisin Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu ile önlenebileceğini göstermiştir (Salden, 2000). Ayrıca, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, nöronal ve nöronal olmayan hücrelerin düzenlenmiş nekrotik ölümünü önlemek için de yeterli olduğu bulunmuştur (Kane vd., 1995; Shimizu vd., 1995).

2.5. Reseptörle Etkileşen Protein (RIP) Kinazları

Reseptörle etkileşen protein (RIP) kinazları, nispeten korunmuş bir kinaz alanı olan ancak farklı olmayan bölgelere sahip bir grup serin/treonin protein kinazdır. Farklı RIP ailesi üyelerinde ölüm, kaspaz aktivasyonu ve bağlama bölgesi (CARD) alanları gibi farklı alan yapısı bulunmuştur. Bu alanların her RIP kinazının spesifik fonksiyonunun belirlenmesinde sorumlu olması gerekir. RIP kinazların doğuştan gelen bağışıklıkta olanlar da dâhil olmak üzere farklı biyolojik süreçlere katıldığı bilinmektedir (He ve Wang., 2018).

RIP kinaz ailesinin, homolog bir serin-treonin kinaz alanını paylaşan yedi üyesi vardır. (Şekil 2.6.) Ailenin 'kurucu üyesi' RIPK1, başlangıçta ölüm reseptörü CD95'in DD'si ile etkileşime giren bir ölüm alanı (DD) içeren protein olarak tanımlanmıştır. RIPK1, bir amino terminal kinaz alanı, bir karboksi terminal DD ve bir RIP homotipik etkileşim motifi (RHIM) içeren bir köprüleme ara alanı (ID) taşır. RIPK2, bir karboksi terminal kaspaz aktivasyon alanı (CARD) ve RHIM içermeyen bir bölge içerir. RIPK3, bir RHIM'i barındıran ancak DD içermeyen bir karboksi terminal bölgesine sahiptir. RIPK4 ve RIPK5 bir ID ve karboksi terminal ankirin alanları içerirken, RIPK6 ve RIPK7 lösün açısından zengin tekrarlar, ankirin tekrarları ve ROC alanlarına sahiptir (He ve Wang., 2018).



Şekil 2.6. RIPK ailesinin tüm üyeleri (He, 2018).

2.5.1. RIPK1

RIP kinaz ailesinin ilk üyesi olan RIPK1, ilk olarak 1995'te reseptör Fas'ın (CD95) ölüm alanı ile etkileşime girdiği C-terminal ölüm alanı ile yeni bir protein kinaz olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, 'reseptör-etkileşen protein' olarak belirlenmiştir (He ve Wang., 2018).

RIPK1'in farklı yolları başlatan sinyal komplekslerine alınabildiği bir C-terminal ölüm alanı içerir. RIPK1'in ölüm alanının, tümör-nekroz faktörü (TNF) reseptörü 1 (TNF-R1), TNF ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand reseptörü1/2 ve TNF-reseptörü ile ilişkili apoptozis gibi birkaç ölüm reseptörüne bağlandığı gösterilmiştir. (Şekil 2.4.) Ölüm reseptörleri TNF-R1, Fas ve TNF ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand reseptörü, birçok hücre sisteminde apoptozise aracılık eder. Bu reseptörler ligandlarına bağlandığında, enflamatuvar bir yanıtı veya hücre ölümüne yol açan sinyal yollarını polimerize eder ve başlatırlar. TNF- α 'nın reseptörü TNF-R1'e bağlanması, iki ardışık sinyal kompleksinin oluşumunu indükler, RIPK1 her iki kompleksin bir bileşenidir (Liu vd., 2019).

Başlangıçta plazma membrana bağlı kompleks (kompleks I), TNF-R1, TRADD, RIPK1, TRAF2 ve apoptozis 1'in hücresel inhibitörü (cIAP1) 'den oluşur. (Şekil 2.5.) Bu,

nükleer faktör-kappa B'nin (NF- κ B) hızlı aktivasyonunu indükler. Sonuç olarak, NF- κ B, TRAF1, TRAF2, cIAP1, cIAP2 ve özellikle hücrel FADD benzeri IL-1 β -dönüştürücü enzim inhibitör proteini, kuvvetli bir ölüm reseptörü kaynaklı apoptozis inhibitörü de dahil olmak üzere birkaç anti-apoptotik proteinin ekspresyonunu teşvik eder (Liu vd., 2019).

RIPK1'in fosforilasyon ve ubikuitinasyon gibi modifikasyonu, RIPK1'in prosurvival ve ölüme neden olan sinyal yollarındaki fonksiyonunu belirler. TNF stimülasyonu üzerine RIPK1 otofosforilatlanır ve ubikuitine edilir. RIPK1'in ubikuitinasyonu, ubikuitinin hem Lys48 hem de Lys63'üne bağlanarak meydana gelebilir. Ubikuitinasyon cIAP1 ve cIAP2 tarafından RIPK1'in Lys63'e bağlı poliubikuitinasyonu, prosurvival proteinlerin ekspresyonunu destekleyen MAPK ve NF- κ B'nin TNF ile indüklenen aktivasyonunu başlatır (Zhang vd., 2010).

2.5.2. RIPK2

RIPK2, RIP benzeri etkileşimli kaspaz benzeri apoptozis düzenleyici protein kinaz veya CARD içeren IL-1 P dönüştürücü enzim ilişkili kinaz olarak da adlandırılır. İlk olarak üç bağımsız grup tarafından NF- κ B aktivasyonu ve apoptozis de rol oynayan yeni bir RIP benzeri kinaz olarak tanımlanmıştır. RIPK2, bir N-terminal kinaz alanı ve bir C-terminal CARD alanı ile karakterize edilir (He ve Wang., 2018).

Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domenini içeren protein 1 (NOD1) ve NOD2 (sırasıyla CARD-4 ve CARD-15 olarak da adlandırılır), NOD benzeri reseptör protein ailesinden gelen doğal bağışıklık sisteminin iki bileşenidir ve patojenlerin varlığını algılamaya katılır. Peptidoglikanlardan türetilen spesifik bakteriyel peptitler tarafından aktivasyonu üzerine, NOD1 ve NOD2, NF- κ B aktivasyonunu indüklemek ve doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini düzenlemek için CARD-CARD etkileşimi yoluyla kinaz RIPK2 ile etkileşime girer. RIPK2'nin kinaz aktivitesi protein stabilitesi için kritik öneme sahiptir ve bu nedenle NOD1 ve NOD2 aracılı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin korunmasında merkezi bir rol oynar. RIPK2 ile etkileşime giren birçok molekülün NF- κ B sinyal yolunun düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca, RIPK2'nin protein seviyesinin belirli stimülasyon üzerine indüklenebilir olduğunu gösteren kanıtlar sağlanmıştır. Örneğin, enflamatuar sitokinler, TNF- α , IL-1 β ve interferon-p'ye yanıt olarak, RIPK2 transkripsiyonu ve translasyonundaki artış endotelial hücrelerde tespit edilebilir (Heim vd., 2019; Zhang vd., 2010).

2.5.3. RIPK3

RIPK3, tarif edilecek üçüncü RIP kinaz ailesi üyesidir. RIPK3, diğer RIP kinazlarındakine benzer bir N-terminal kinaz alanından, bir RHIM alanından ve bilinen tüm protein alanlarından farklı olan benzersiz bir C-terminal alanından oluşur. RIPK3'ün aşırı ekspresyonu, bazı hücre hatlarında apoptozis ve NF-KB aktivasyonunu indükleyebilir (Liu vd., 2019).

Son zamanlarda, RIPK1'e benzer şekilde, TNF tedavisi ile tetiklenen kaspazdan bağımsız nekrotik hücre ölümü için RIPK3'ün gerekli olduğu bulundu. Mikroarray analizi ile RIPK3'ün TNF stimülasyonu üzerine apoptozise giren A hücrelerinde (bir NIH-3T3 hücre çizgisi) eksprese edilmediğini, bununla birlikte nekroz geçiren N hücrelerinde (başka bir NIH-3T3 hücre çizgisi) TNF ile muamele edilmiştir. A hücrelerinin apoptotik hücre ölümü, kaspaz inhibitörü zVAD tarafından korunurken, N hücrelerinin nekrotik hücre ölümü engellenmez, daha çok zVAD tarafından arttırılır. N hücrelerinde RIPK3'ün küçük saç tokası RNA yıkımı, zVAD varlığında nekrozu önler. Ayrıca L929 fibroblastlarında TNF ile indüklenen nekroz ve TNF- / lipopolisakkarit ile uyarılan primer peritoneal makrofajlarda zVAD ile indüklenen nekroz için RIPK3'ün de gerekli olduğunu keşfedilmiştir (He ve Wang., 2018; Liu vd., 2019).

RIPK-3'ün kaspazdan bağımsız nekrozdaki temel rolü; Cho ve meslektaşları tarafından RIPK1 ve RIPK3'ün TNF tedavisine yanıt olarak, virüs enfeksiyonu sırasında hücrenel düzenlenmiş nekroz için gerekli 10 kinaz arasında olduğunu tespit ettiler. Kinaz RIPK3, nekroza spesifik RIPK1 fosforilasyonunu düzenler. RIPK1 ve RIPK3'ün fosforilasyonu, pronekrotik kompleks içindeki etkileşimlerini stabilize edebilir, pronekrotik kinaz aktivitesini aktive edebilir ve nihayetinde nekrotik hücre ölümüne yol açan aşağı akım reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini tetikleyebilir (Zhang vd., 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Örnek Temini

Çalışmamızın yapılabilmesi için gerekli olan etik kurul onayı Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından 16/12/2018 tarihinde alınmıştır. Bu çalışmaya Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Büyükbaş Hayvan kliniğine getirilen yaşları 1-20 gün arasında değişen 10 sağlıklı (kontrol grubu) ve 20 sepsis şüpheli (deneme grubu) holştayn buzağı dâhil edilmiştir.

Kliniğe getirilen ishalleri buzağuların anemnez, cinsiyet, kaç günlük olduğu, kaç gündür ishal olduğu gibi kayıt bilgileri alındı. Buzağuların rutin klinik muayeneleri yapıldı ve klinik bulgulara göre sepsis şüphesi olan buzağular çalışmaya dâhil edildi.

SIRS kriterleri;

- Vücut ısısı $> 39^{\circ}\text{C}$ veya $< 36^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı < 100 veya > 160 vuru/dakika
- Solunum sayısı > 45 /dakika veya $\text{PCO}_2 > 50$ mmHg.
- Total Lökosit sayısı $> 12.000/\text{mm}^3$ veya $< 4.000/\text{mm}^3$ veya band nötrofil $> \%10$

Emme refleksi azlığı yada yokluğu, etrafa ilgi yoksunluğu, desteksiz ayağa kalkamama/lateral yatış ve halsizlik bulunan buzağularda beraberinde yukarıdaki belirtilerden en az iki ve daha fazla bulgunun olması (SIRS)+yangı veya yangı şüphesinin bulunması (Sepsis) olarak tanımlanmıştır (Fecteau vd., 1997; Başoğlu vd., 2014; Singer vd. 2016; Aygun ve Yıldız, 2018).

Kan örneklerinin alınması: Deneme ve kontrol gruplarından hemogram örnekleri için kan örnekleri tedavi öncesi vena jugularisten alındı. Hemogram ölçümü için etilendiamintetraastik asit (K3EDTA)'lı tüp ve serum için aktivatör jelli tüp kullanıldı. Hemogram ölçümü 15-30 dakika içinde yapıldı. Kalan örnekler moleküler analizleri yapılabilmeye kadar -80°C 'de saklandı.

Hemogram: K3EDTA'lı venöz kan örneğinden lökosit (WBC), granülosit, eritrosit (RBC), hematokrit (HCT) ve trombosit (PLT) gibi parametreler Abacus Junior Vet (Diatron MI Ltd. Macaristan) cihazında ölçüldü.

3.2. Aletler ve Cihazlar

İzole edilen RNA numunelerinden cDNA sentezi için NYX Teknik Apollo ATC 201 marka PCR cihazı, gen ifadesinin belirlenmesinde ise LightCycler-II 480, Roche Real Time PCR kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi çalışmaları sırasında Bio-Rad yatay elektroforez sistemi, agaroz jellerin görüntülenmesinde ise Fusion Pulse (Vilber Lourmat) cihazı kullanıldı.

3.3. Yöntem

3.3.1. RNA İzolasyonu

- Total RNA izolasyonu NucleoZOL reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi.
- Hücreden RNA izolasyonu için hasta ve sağlıklı buzağılardan alınmış kan örneklerinden 200 µl steril eppendorf tüpüne konuldu.
- Üzerine 500 µl NucleoZOL ve 200 µl RNaz/DNaz içermeyen su ilave edildi.
- Tüpler 15 saniye kuvvetlice çalkalandı.
- Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- Tüpler 12000 g de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatanttan 500 µl yeni eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Tüpe aktarılan süpernatantın üzerine 500 µl İzopropanol ilave edildi.
- Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- Tüpler 12000 g de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatanttan atıldı ve % 75 lik Etanol den 500 µl eklendi.
- Tüpler 8000 g de 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatanttan atıldı ve pellet kurumaya bırakıldı.
- Kuruduktan sonra tüplere 15 µl DNaz /RNaz içermeyen su ilave edildi.

3.3.2. RNA Kantitasyonu

Elde edilen RNA'nın miktar ve saflığının saptanabilmesi için Epoch mikropilaka spektrofotometre okuyucusu Take3 plakası ile kullanıldı.

Yöntem aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- Çözülmüş RNA örneğinden 2 µl alınıp, 0,2ml'lik steril eppendorf tüp içinde son hacim 4 µl olacak şekilde DNaz/RNaz içermeyen su ile tamamlandı.
- Spektrofotometrede OD260 ve OD280 değerleri ölçüldü.
- OD260 ve OD280 değerlerinin oranı hesaplanarak RNA'nın saflığı belirlendi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. RNA Kantitasyonu ve Miktarı.

	Örnek	260/280	ng/µl
Sağlıklı Kontrol Grubu	Sağlıklı-1	1,316	147,189
	Sağlıklı-2	1,422	285,996
	Sağlıklı-3	1,301	106,578
	Sağlıklı-4	1,363	321,143
	Sağlıklı-5	1,458	653,496
	Sağlıklı-6	1,358	220,730
	Sağlıklı-7	1,302	179,436
	Sağlıklı-8	1,308	123,275
	Sağlıklı-9	1,333	110,188
	Sağlıklı-10	1,415	600,745
Sepsis Şüpheli Deneme Grubu	Sepsis Şüpheli-1	1,658	808,394
	Sepsis Şüpheli-2	1,461	423,435
	Sepsis Şüpheli-3	1,344	152,311
	Sepsis Şüpheli-4	1,344	403,147
	Sepsis Şüpheli-5	1,340	233,095
	Sepsis Şüpheli-6	1,414	582,477
	Sepsis Şüpheli-7	1,412	553,617
	Sepsis Şüpheli-8	1,654	1169,763
	Sepsis Şüpheli-9	1,360	527,209
	Sepsis Şüpheli-10	1,723	1185,658
	Sepsis Şüpheli-11	1,733	1070,478
	Sepsis Şüpheli-12	1,322	353,980
	Sepsis Şüpheli-13	1,333	326,211
	Sepsis Şüpheli-14	1,310	298,333
	Sepsis Şüpheli-15	1,304	362,725
	Sepsis Şüpheli-16	1,404	534,701
	Sepsis Şüpheli-17	1,521	1193,773
	Sepsis Şüpheli-18	1,330	257,250
	Sepsis Şüpheli-19	1,311	301,943
	Sepsis Şüpheli-20	1,504	793,454

3.3.3. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR reaksiyonları için NYX Teknik Apollo ATC 201 cihazı kullanıldı ve RT-PCR reaksiyonu üretici firma tarafından sağlanan İScript Reverse Transkripsiyon kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

- 3 µl İScript RT Supermix
- RNA (2µg total RNA)*
- Su (değişken)*
- Toplam hacim 15 µl

* Reaksiyondaki RNA ve su miktarları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışma değerleri.

	Örnek	RNA (µl)	Su (µl)	İScript (µl)
	Sağlıklı Kontrol Grubu	Sağlıklı-1	6,79	5,21
Sağlıklı-2		3,50	8,50	3
Sağlıklı-3		9,38	2,62	3
Sağlıklı-4		3,11	8,89	3
Sağlıklı-5		1,53	10,47	3
Sağlıklı-6		4,53	7,47	3
Sağlıklı-7		5,57	6,43	3
Sağlıklı-8		8,11	3,89	3
Sağlıklı-9		9,08	2,92	3
Sağlıklı-10		1,66	10,34	3
Sepsis Şüpheli Deneme Grubu	Sepsis Şüpheli-1	1,24	10,76	3
	Sepsis Şüpheli -2	2,36	9,64	3
	Sepsis Şüpheli -3	6,57	5,43	3
	Sepsis Şüpheli -4	2,48	9,52	3
	Sepsis Şüpheli -5	4,29	7,71	3
	Sepsis Şüpheli -6	1,72	10,28	3
	Sepsis Şüpheli -7	1,81	10,19	3
	Sepsis Şüpheli -8	0,85	11,15	3
	Sepsis Şüpheli -9	1,90	10,10	3
	Sepsis Şüpheli -10	0,84	11,16	3
	Sepsis Şüpheli -11	0,93	11,07	3
	Sepsis Şüpheli -12	2,83	9,17	3
	Sepsis Şüpheli -13	3,07	8,93	3
	Sepsis Şüpheli -14	3,35	8,65	3
	Sepsis Şüpheli -15	2,76	9,24	3
	Sepsis Şüpheli -16	1,87	10,13	3
	Sepsis Şüpheli -17	0,84	11,16	3
	Sepsis Şüpheli -18	3,89	8,11	3
	Sepsis Şüpheli -19	3,31	8,69	3
	Sepsis Şüpheli -20	1,26	10,74	3

3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

- RNA izolasyonu ve RT-PCR reaksiyonları sonrasında elde edilen ürünler için %2 (2 g agaroz+100 ml 1xTAE) agaroz jel hazırlandı.
- Agaroz, TAE içerisinde çözüldükten sonra kaynatıldı ve üzerine konsantrasyonu 10 mg/ml olan SafeView™ Classic 5 µl eklendi.
- Agaroz jel, jel yatağı içerisine döküldü ve yükleme kuyucuklarını oluşturmak için jelin üzerine tarak yerleştirildi.
- Soğuma işleminden sonra tarak çıkarılarak, elektroforez tankının içine yerleştirildi ve tank jel kuyucukları kaplanıncaya kadar 1xTAE ile dolduruldu.

- 2,5 µl örnek ve 0,5 µl yükleme tamponu ile kuyucuklara yüklendi.
- Jel elektroforez tankı, güç kaynağına bağlandı ve 90 V'de 30 dk boyunca yürütüldü. RT-PCR sonuçlarını görüntülemek için Fusion Pulse (Vilber Lourmat) cihazı kullanıldı.

3.3.5. Gen Ekspresyon Analizi Real Time PCR (Eş-Zamanlı Kantitatif PCR)

Sağlıklı ve sepsis şüpheli holştayn buzağı kan örneklerinden izole edilen RNA'ların RIPK1, RIPK2 ve RIPK3 ifadelerinin eş-zamanlı kantitatif PCR (LightCycler-II 480, Roche, Mannheim, Almanya) yapıldı.

PCR Reaksiyon koşulları;

- 1.Basamak 95C°'de 10dk
- 2.Basamak 95C°'de 10sn
- 3.Basamak 60C°'de 15sn olmak üzere toplam 45 döngü
- 4.Basamak 72C°'de 10sn

Halinde eş zamanlı qPCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

Real Time PCR yapılırken SYBR Green master karışımı (Jena Biotechnology, Jena, Almanya) ve aşağıdaki listede yer alan GAPDH, RIPK1, RIPK2, RIPK3 genlerin primerleri (Tablo 3.3.) ile daha önceden elde ettiğimiz cDNA'lar karıştırılarak reaksiyon kuruldu. 96 well plate'lere kurulan reaksiyonlar 480 nm dalga boyunda okutularak ilgili genlerin çoğalmaları takip edildi ve sonrasında çıkan Cp sonuçları doğrultusunda analizleri yapıldı.

Tablo 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan primerlerin sekansları ve Tm değerleri.

Oligo Name	BAZ DİZİSİ 5'-3'	Tm (°C)
RIPK1-F	5' ATTCCATTACCTCCTTGCC 3'	57
RIPK1-R	5' GAACTCATTCCACCAATCTCCA 3'	58
RIPK2-F	5' CAGTGAATCACAGTCGGAACAG 3'	60
RIPK2-R	5' AAGCACAAGTATTTCTGGGTAAGG 3'	59
RIPK3-F	5' CCGAATAAACACCAAGAAAGCC 3'	58
RIPK3-R	5' TCAGAAAGGAACTCCTTCACCA 3'	58
GAPDH-F	5' GGTCACCAGGGCTGCTTTTA 3'	59
GAPDH-R	5' AGGATCTCGCTCCTGGAAGA 3'	59

3.3.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde Graphpad Prism 6 for Windows® paket programı kullanılmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sırasında bir parametre açısından iki grup arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde bağımsız örneklem (unpaired) t-test kullanılmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Klinik Bulgular

Sepsis buzağılarda yaygın olarak emme refleksinde azalma, depresyon, bilinç çevresine ilgi yoksunluğu, ayağa kalkmada güçsüzlük, hipotermi veya hipertermi, kapiller dolun zamanında uzama, abdominal solunum, mukoz membranlarda hiperemi ya da solgunluk gözlemlendi (Şekil 4.1). Deneme ve kontrol grubu buzağılarına ait klinik bulgulardan vücut ısısı, solunum ve nabız sayısı Tablo 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Sepsisli buzağının tedavi öncesi genel görünümü.

Tablo 4.1. Sepsisli ve sağlıklı buzağılarda hemogram ve klinik bulgular (Mean±SEM).

Parametreler	Kontrol (n:10)	Hasta (n:20)	p değeri
WBC ($10^9/l$)	8,18±0,49	21,2±3,79	0,003
GRA ($10^9/L$)	3,65±0,49	13,5±3,34	0,008
RBC ($10^{12/l}$)	8,74±0,73	10,2±2,38	0,552
HCT (%)	27,9±2,21	29,3±1,84	0,626
PLT ($10^9/l$)	572±121	670±76,2	0,504
Derece (°C)	38,9±0,09	37,3±0,29	0,00
Solunum (dakika)	36,3±0,73	45,6±4,08	0,04
Nabız (dakika)	118±2,72	105±6,20	0,06

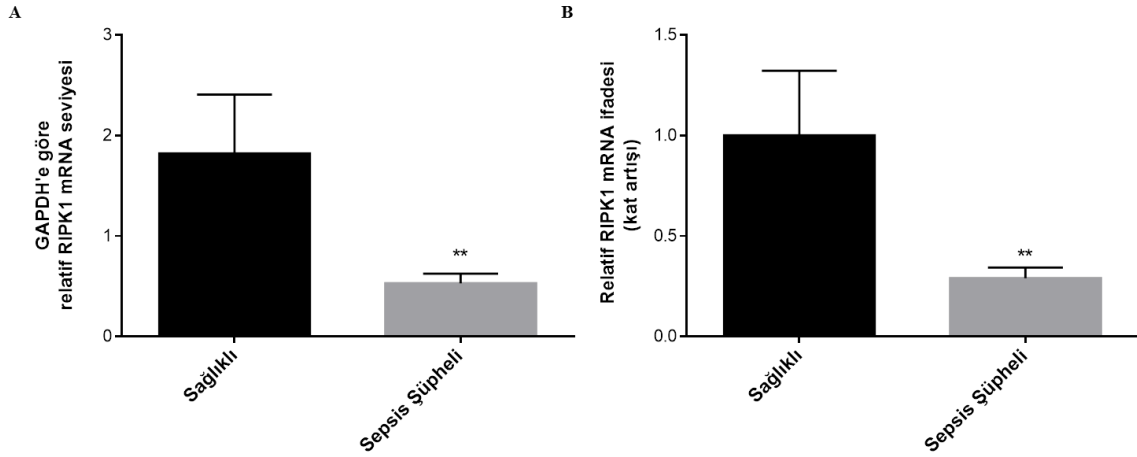
Cinsiyet (erkek/dişi)	6 erkek, 4 dişi	7 erkek, 13 dişi	
----------------------------------	-----------------	------------------	--

4.2. Hemogram Bulguları

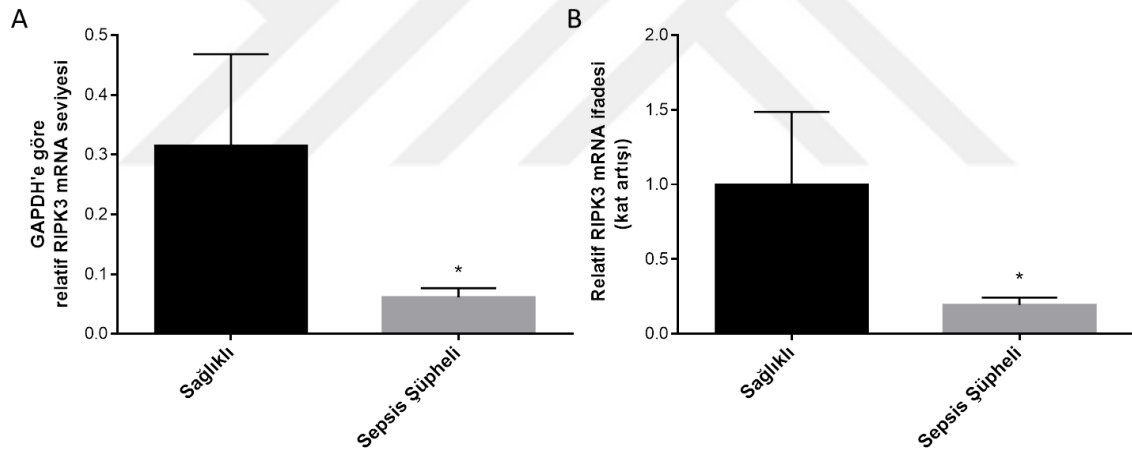
Sepsisli buzağuların tedavi öncesi hematolojik değişimleri Tablo 4.1.'de verilmiştir. Kontrol ile deneme grubunun hematolojik parametreleri değerlendirildiğinde lökosit (WBC) ($p<0,01$), granülosit ($p\leq 0,01$) değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunurken, eritrosit (RBC), hematokrit (HCT) ve platelet (PLT) değerleri arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark olmadığı görüldü (Tablo 4.1). Sepsisli buzağılardan 2 buzağıda lökopeni, 18 buzağıda ise lökositosis tespit edildi.

4.3. RIPK1, RIPK2 ve RIPK3 Bulguları

Bu tez çalışmasında sağlıklı ve sepsis şüpheli holştayn buzağılardan alınan kan örneklerinden izole edilen RNA'lar kullanılarak RIPK1, RIPK2 ve RIPK3 mRNA seviyeleri araştırılmıştır. Kontrol grubu $n=10$ sağlıklı ve deneme grubu $n=20$ sepsis şüpheli hasta üzerinden analizlere tabi tutulmuştur. GAPDH, mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesinde internal kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmada deneme ve kontrol gruplarında görece RIPK1 ve RIPK3 mRNA ifade seviyelerinin gruplara göre farklı düzeylerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2-3). Deneme grubu RIPK1 ve RIPK3 mRNA ifade seviyeleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. RIPK2 deneme ve kontrol grupları arasında mRNA ifade seviyeleri belirlenememiştir (grafik verilmemiştir). Aşağıda bu hastalara ait qPCR analiz sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.2. Sağlıklı buzağılara göre sepsis şüpheli buzağılarda azalan RIPK1 ifadesi. **A.** RIPK1 mRNA ifadesi, eş zamanlı bir şekilde RIPK1 ve GAPDH (internal reaksiyon kontrol)'i saptayan qPCR ile incelendi. **B.** RIPK1 mRNA ifadesinin kat artışı şeklinde grafiğe dökülmesi. Sağlıklı, n=10; Sepsis şüpheli, n=20. Bağımsız örneklem t-testi, hata çubukları standart hata (\pm SEM). ** $p < 0.01$ ($p = 0.0054$).



Şekil 4.3. Sepsis şüpheli buzağılarda azalmış RIPK3 ifadesi. **A.** RIPK3 mRNA ifadesi, eş zamanlı bir şekilde RIPK3 ve GAPDH (internal reaksiyon kontrol)'i saptayan qPCR ile incelendi. Sağlıklı buzağılara göre sepsis şüpheli buzağılarda RIPK3 ifadesinin azaldığı saptandı **B.** RIPK3 mRNA ifadesinin kat artışı şeklinde grafiğe dökülmesi. Sağlıklı, n=10; Sepsis şüpheli, n=20. Bağımsız örneklem t-testi, hata çubukları standart hata (\pm SEM). * $p < 0.05$ ($p = 0.0267$).

Bilgimiz dâhilinde, bu çalışma sepsis şüpheli buzağuların kanlarında nekroptozis hücre ölümü yolağında rol oynayan reseptör ile etkileşen protein kinaz 1 (RIPK1), RIPK2 ve RIPK3 mRNA ifadelerini araştıran literatürdeki ilk çalışmadır. Kantitatif eş zamanlı

PCR (qPCR) yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar sağlıklı buzağılara göre sepsis şüpheli buzağuların kanlarında RIPK1 ve RIPK3 mRNA ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir. RIPK2 mRNA ifadesi ise kan örneklerinde qPCR ile tespit edilememesi nedeniyle değerlendirilememiştir.

Sepsisin fizyopatolojisi karmaşık ve çok faktöre bağlıdır. Enfeksiyon hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar süreci tetikler. Bunun sonucunda vücut dış etkenlerden arındırılırken doku hasarı ve organ yetmezliği gelişebilir (Angus ve van der Poll 2013, Russell 2006). Genel bakışta pro-inflamatuvar süreç enfeksiyöz ajan tarafından tetiklenir ve patojenin eliminasyonuna eşlik eder, ancak anti-inflamatuvar süreç dokuların iyileşmesi için konak tarafından aktif hale gelir. Bu mekanizmaların dengesiz olması, vücutta aşırı doku hasarına (pro-inflamatuvar) veya immünosupresyona ve sekonder enfeksiyonlara (anti-inflamatuvar) predispoze haline gelmeye neden olabilmektedir. Bu olaylara organın tepkisi konakçının (morbidite ve immunosupresyon) ve patojenin (virülans ve organizma miktarı) özelliklerine bağlıdır (Angus ve van der Poll 2013).

Sepsis, istilacı patojenlere karşı konakçının verdiği anormal bir bağışıklık yanıt olup, yoğun çabalara rağmen yüksek morbidite ve mortalite oranı göstermesi nedeni ile hem beşeri hem de veteriner hekimliğinde kritik bir sorun olmaya devam etmektedir (Raghavan ve Marik 2006; Ok vd., 2015; Singer vd., 2016). Sepsis ve ishal, kolostral transferin başarısızlığına bağlı olarak yenidoğan buzağılarda genellikle en sık görülen morbidite ve mortalite nedenleridir. Sepsis, çiftlik hayvanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olabilir (Fecteau ve ark. 1997; Basoglu ve ark. 2014). Sepsisin patolojisi karmaşık ve çok faktöre bağlıdır. Enfeksiyon hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar süreci tetikler. Bunun sonucunda hem vücut dış etkenlere karşı kendini savunur hem de doku hasarı ve organ yetmezliği gelişebilir (Russell 2006). İnsanlarda bile, genellikle akut enfeksiyonun en şiddetli tezahürü olan sepsis, çoklu organ yetmezliğine neden olabilir ve vakaların % 30-50'sinde ölüme neden olabilir. Bu nedenle, sepsisli hastalarda (Engel vd., 2007; Angus ve Van der Poll 2013) sağ-kalım şansını arttırmak için gereken kesin teşhise dayalı tedavinin başlatılması için erken tanı önemini korumaktadır (Levy vd., 2012; Nachimuthu ve Haug 2012; Prucha 2015). Çoklu organ yetmezliği (MODS) insanlarda travma, neoplazi veya sistemik yangısal cevap sendromu gibi vakalarda da gelişebildiği gibi sepsis ve septik şokta daha yüksek oranda görülmektedir (deMontmollin ve Annane 2011). Köpeklerde travmaya bağlı gelişen MODS'un insidansı %4 iken, sepsiste yaklaşık %50'dir. Sepsis ve septik şokta gelişen MODS'un muhtemel gelişme nedeni için bir kaç mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar hücre veya doku hipoksisi, mitokondriyal

disfonksiyon, doku apoptozisin uyarılması, gastrointestinal sistemden mikroorganizmaların veya bileşiklerinin translokasyonu, bağışıklık sisteminin düzensizliği olarak bildirilmiştir. MODS muhtemelen belirtilen bu faktörlerin ve henüz tanımlanamayan diğerlerinin karmaşık bir kombinasyonundan kaynaklansa da, ortaya çıkan genel kanı, bağışıklık sistemi düzensizliğinin ve sonrasında ise mitokondriyal disfonksiyonun belirgin yollar olabileceğini düşündürmektedir (Mizock 2009, Osterbur vd., 2014). Mitokondriyal ATP seviyeleri apoptozis ve nekroptozis arasındaki etkileşimde belirleyici bir role sahiptir. Yüksek ATP seviyeleri tipik olarak bir hücrenin apoptozise girmesini sağlarken, düşük ATP seviyelerinde nekroptozise yönelir. Bu nedenle, hücre içi ATP seviyelerinin tükenmesi, enerji gerektiren apoptotik hücre ölümünü nekroptotik hücre ölümüne yönlendirir (Kono ve Rock, 2008; Shintani vd., 1999). Bununla birlikte, nekroptozis az da olsa düşük ATP seviyeleri gerektirmektedir. Çünkü ATP tükenmesi, hem apoptozisten hem de nekroptozisten morfolojik ve mekanik olarak farklı bir hücre ölüm yoluna yönlendirir (Lavrik vd., 2005). Bir hücrenin iki hücre ölümü yolu arasındaki kararında enerji merkezi rolü göz önüne alındığında mitokondri organeli önemli rol oynamaktadır. Sepsisin başlangıcı hiperinflamasyon evresidir. Bu dönemde TNF, IL-1b, IL-6 ve IL8 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine yol açan doğuştan gelen bağışıklık sistemi aşırı aktiftir. Hiperinflamasyon evreyi daha uzun süren bir immünosupresyon evre takip etmektedir (Cao vd., 2019). En iyi karakterize nekroptozis indükleyicileri ölüm reseptörü ligandları, özellikle tümör nekroz faktörüdür (TNF). Nekroza neden olan özellikleri nedeniyle adlandırılrsa da, çoğu TNF araştırması bunun yerine pro-inflamatuvar ve apoptotik işlevlerine odaklanmıştır. Uzun yıllar boyunca bazı hücre tiplerinde TNF'nin apoptotik olmayan bir hücre ölümü formunu indükleyebileceği bilinmektedir (Laster vd., 1988). Son zamanlarda, nekroptozis sinyalizasyonunun anahtar moleküler bileşenleri tanımlanmıştır; bunlar RIPK1 ve RIPK3 ilişkili iki kinaz ve psödokinaz karışık-soy kinaz domeni benzeri (MLKL) dâhildir (Cho vd., 2009; He vd., 2009; Holler vd., 2000; Zhang vd., 2009). RIPK3, TNF'nin neden olduğu nekroptozis için temel molekül olarak tanımlanırken, RIPK1 nekroptoziste bazı durumlarda gerekli olmayabilir (Moujalled vd., 2013; Upton vd., 2010). Nekroptozisin yanı sıra RIPK1, hem TNF'ye bağlı nükleer faktör κ B (NF κ B) aktivasyonuna hem de apoptozise aracılık etmede köklü bir role sahiptir (Ofengeim ve Yuan, 2013).

Yapılan bu tez çalışmasında, RIPK1 ve RIPK3 mRNA seviyeleri sağlıklı buzağılara (kontrol grubu) göre sepsis şüpheli buzağılarda (deneme grubu) daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.2-3). Duprez ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada TNF'in neden olduğu sistemik

inflatuar yanıt sendromunu (SIRS) önlemede RIPK1 ve RIPK3 inhibisyonunun önemli olduğu vurgulanmıştır (Duprez vd., 2011). Yüz yirmi dört sepsis tanısı konulan insanlarda yapılan bir çalışmada RIPK1 ve RIPK3 seviyelerini CRP, prokalsitonin ve WBC gibi geleneksel sepsis biyobelirteçleri ve sepsis klinik skorlaması (SOFA) ile korelasyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada hastalar üç gruba ayrılmıştır: sepsisli 43 hasta (% 34.68), ciddi sepsisli 39 hasta (% 31.45) ve septik şoklu 42 hasta (% 33.87). Şiddetli sepsis ve septik şok gruplarındaki RIPK3 düzeyleri farklı zaman dilimlerinde sepsis grubundaki düzeylerden belirgin derecede yüksek ($p < 0.05$) bulunmuştur (Wang vd., 2017). Belirtilen çalışmadaki (Wang vd., 2017) RIPK3 seviyesinin çalışmamızdaki sonuçların aksine yüksek olmasını sepsisin farklı evrelerindeki değişimlerle ilişkilendirmekteyiz. Şiddetli sepsis ve septik şokta sepsise göre yüksek seyir göstermesi (Wang et al. 2017) sepsisin şiddeti ile doğru orantılı olarak nekroptozisin arttığını gösterebilir, bu çalışmada sağlıklı grupla karşılaştırma yapılmadığı için sepsisin başlangıç aşamasında RIPK3 seviyesinin geçici bir düşüş gösterip göstermediğini bilmemekteyiz. Bizim çalışmamızı destekler bir kanıt ise TNF'nin neden olduğu sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) bir fare modelinde inflamasyon ve nekroptoz arasındaki ilişki araştırılmıştır (Kaiser vd., 2013). Kaspaz-3, kaspaz-7 veya kaspaz-1 kaybının bu modelde koruyucu olmadığı ancak RIPK3 eksikliğinin ölümcül SIRS ve azaltılmış dolaşımdaki DAMP'lara karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Bu durum vakalarımızın sepsisin başlangıç aşamasında olabileceğini ve RIPK3 seviyesinin geçici bir düşüş gösterebileceğini ancak ilerki aşamalarda nekroptozis ve apoptozis gelişimine bağlı olarak MODS bulguları oluşacağı ve bu süreçlerde RIPK3 seviyesinin yüksek olabileceği düşünülmektedir. Oldukça güncel bir çalışmada, polimikrobiyal sepsiste doku hasarını artırmak için RIPK3'ün piroptoziste görevli ölümcül gesdarmin D (GSDMD) ile işbirliği yaptığını ortaya koymuştur (Chen vd., 2020). Kısaca bu çalışma hem nekroptoz hem de piroptozun sepsisle bağlantı ve delinme (CLP) ile indüklenen sepsis ve çok organlı disfonksiyon ile ilişkili olduğunu, bu moleküllerin aktivitesini inhibe eden ajanların kullanımının ise septik şok ve çoklu organ hasarına karşı koruma sağlayabileceği bildirilmiştir (Chen vd., 2020).

Çalışmamızda qPCR ile belirlenen relatif RIPK1 ve RIPK3 mRNA seviyelerine benzer miktarda östrojen döngüsü boyunca sıgır korpus luteum dokusunda rastlanılmıştır (Hojo vd., 2016). Bu çalışma RIPK1 ve RIPK3 mRNA seviyelerinin sıgırlarda araştırıldığı tek çalışma olması açısından önem arz etmektedir.

RIPK2, hücre içi nükleotid bağlanması ve oligomerizasyon domaini (NOD) aracılı NF- κ B aktivasyonu ve sitokin üretimi ile immün yanıtın oluşmasında önemli rol

oynamaktadır (Nachbur vd., 2014; He vd., 2017). NOD reseptörleri, bakteriyel peptitoglikanları içeren antijenleri tanımakta ve NF- κ B ve MAP kinazları aktive ederek pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini tetikleyerek bağışıklık tepkilerini başlatmaktadır (Jun vd., 2013). Günümüzde, bakteriyel kökenli sepsis oluşumunda RIPK2'nin potansiyel rolünü araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bakteriyel enfeksiyona karşı gelişen immün yanıtın oluşmasında rolü olan RIPK2'nin bizim çalışmamızda mRNA ifade seviyesi deneme grubunun çoğunda ve kontrol grubunun bir kısmında belirlenememiştir. Bunun nedeni, RIPK2'nin geç siklusta gelmesi ve bireyler arasındaki farklılıklardan dolayı olabileceği düşünülmüştür.

Sunulan bu çalışmada buzağılarda sepsisin patogenezinde RIPK1 ve RIPK3'ün rolü olduğu tespit edildi. Sepsisli buzağılarda RIPK1 ve RIPK3 sepsisin tanısında kullanılabilme potansiyeli olduğu ancak üç sepsis hasta (sepsis, ciddi sepsis ve septik şok) grubunun tedavi süreçlerindeki RIPK1 ve RIPK3 değişimlerinin sağlıklı buzağılarla karşılaştırılması yapılan çalışmaların gerekli olduğu görüldü. Ayrıca bu biyobelirteçler gelecekteki çalışmalarda mortalite ve prognostik indikatör olarak kullanılabilmesine dair umut vaat etmektedir.

5. SONUÇ

- Düzenlenmiş nekrotik hücre ölümü olan nekroptozisin moleküler mekanizmasında yer alan RIPK1 ve RIPK3'ün gen ifadesi analizleri GAPDH kontrol kullanılarak karşılaştırılmıştır.
- Gen ifadesi düzeyinde 3 tekrarlı olarak yapılan qPCR sonuçlarından elde edilen ortalama değerlere göre, kontrol gruplarından elde edilen değerlerin karşılaştırılması yapılmış olup, kontrol ve deneme grubu arasında anlamlı bir değişiklik olduğu görülmüştür. RIPK1 ve RIPK3 gen ifadesinin deneme grubunun, kontrol grubuna göre ifade seviyeleri büyük oranda azalmıştır. RIPK2 gen ifadesi deneme ve kontrol gruplarında tesbit edilememiştir.
- Elde edilen sonuçlar doğrultusunda buzağılarda sepsisin patogenezinde RIPK1 ve RIPK3'ün rolü olduğu tespit edilmiştir.
- RIPK1 ve RIPK3 seviyelerinin sepsisin sınıflandırılmasında kullanılan diğer biyobelirteçler ile beraber değerlendirildiğinde sepsisin patogenezi hakkında daha net bulgulara ulaşılabileceği öngörülmüştür.
- Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre; sepsisli buzağılar da RIPK1 ve RIPK3'ün diagnostik amaç ile kullanılabilirliği anlaşılmıştır.
- İleride yapılacak olan çalışmalar ile RIPK1 ve RIPK3'ün sepsisli buzağılarda mortalite ve prognostik indikatör olarak kullanılabilirliği kanısına varılmıştır.
- RIPK1 ve RIPK3'ün prognostik ve mortalite indikatör olarak kullanılabilirliğinin daha net ortaya koyulması için vaka sayısının daha fazla olduğu ve tedavi sürecinin daha ayrıntılı olarak gözlemlenebildiği çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır.
- Çalışmada sepsis gelişen buzağuların tümünde, klinik ve hematolojik bakımdan belirgin anormalliklerin olduğu tespit edildi. Sepsisli buzağular için klinik ve hematolojik parametrelerin değerlendirmesinin önem arz ettiği görülmüştür.
- Lökosit (WBC) değerinin tanı koyma aşamasında önemli bir parametre olduğu anlaşılmıştır.
- Yapılan bu çalışma, veteriner hekimlik alanında RIPK1 ve RIPK3'ün değerlendirildiği ilk araştırma olması ve sepsisli buzağılarda daha önce benzer bir çalışmaya rastlanılmamış olması nedeni ile literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
- Bu çalışmanın temel kısıtlamaları, bireysel farklılıklar, sepsis şüpheli buzağuların kliniğe hastalığın farklı aşamalarında getirilmesi, ekonomik nedenler dolayısı ile tedavi

sürecinde farklı zamanlarda hayvanların gözlemlenerek hayatta kalım takibinin yapılamaması, vaka sayısını arttırarak sepsis, ciddi sepsis ve septik şok olarak gruplandırılmaması ve sepsis tanısında kullanılan CRP ve prokalsitonin gibi geleneksel biyobelirteçlerle beraber değerlendirilememesidir.



6. KAYNAKLAR

- Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermon, G., Carcillo, J., and Pinsky, M.R., 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, 29(7), 1303–1310.
- Angus, D.C., Van der, Poll. T., 2013. Severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine*, 369, 840-51.
- Aydoğdu, U., Coşkun, A., Yıldız, R., Güzelbekteş, H., şen, İ., 2018. Changes of hematological parameters and serum iron levels in calves with systemic infamatory response syndrome. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 34, 56-59
- Aygun, O., Yildiz, R., 2018. Evaluation of thrombomodulin and pentraxin-3 as diagnostic biomarkers in calves with sepsis. *Veterinari Medicina* 63, 313–20.
- BachInsulin, J.F., 1994. Dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Reviews*, 15, 516-542.
- Basoğlu, A., Baspınar, N., Tenori, L., Hu, X., Yildiz, R., 2014. NMR Based Metabolomics Evaluation in Neonatal Calves with Acute Diarrhea and Suspected Sepsis: A New Approach for Biomarkers. *Metabolomics*, (Open Access).4, 2.
- Baykal, Y., Erikçi, S., Azal, Ö., Karaayvaz, M., Zeybek, N., 2001. şok ve tedavisi. *Ayın Kitabı, GATA*
- Bellamy, C.O.C., Malcomson, R.D.G., Harrison, D.J., Wyllie, A.H., 1995. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminar in Cancer Biology*, 6, 3-16.
- Berger, S.B., Bertin, J., Gough, P.J., 2016. Life after death: RIP1 and RIP3 move beyond necroptosis. *Cell Death Discov*, 2, 16056.
- Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P., 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Molecular of Cell Biology*, 15, 135–147.
- Biton, S., Ashkenazi, A., 2011. NEMO and RIPK1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF- α feedforward signaling. *Cell*, 145, 92–103.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J., 1992. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*, 101(6), 1644-1655.
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.G., Liu, Z.G., 2014. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature Cell Biology*, 16, 55–65.

- Canning, P., Ruan, Q., Schwerd, T., 2015. Inflammatory Signaling by NOD-RIPK2 Is Inhibited by Clinically Relevant Type II Kinase Inhibitors. *Chemistry & Biology*, 22(9), 1174–1184.
- Chen, H., Li, Y., Wu, J., 2020. RIPK3 collaborates with GSDMD to drive tissue injury in lethal polymicrobial sepsis. *Cell Death Differ.*(Baskıda)
- Chen, I.L., Beisner, D.R., Degtarev, A., Lynch, C., Yuan, J., Hoffmann, A., Hedrick, S.M., 2008. Antigen-mediated T cell expansion regulated by parallel pathways of death. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 105, 17463–17468.
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W.T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., 2014. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Research*, 24, 105–121.
- Cheng, X., 2017. Pacer mediates the function of class III PI3K and HOPS complexes in autophagosome maturation by engaging Stx17. *Molecular Cell*, 65, 1029–1043.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R., 2010. The BCL-2 family Reunion. *Molecular Cell*, 37, 299-310.
- Cho, Y., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., Chan, F.K., 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIPK1-RIPK3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137, 1112–23.
- Choi, M.E., Price, D.R., Ryter, S.W., Choi, A.M.K., 2019. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *Journal of Clinical Investigation*. 4, 15.
- Constable, P.D., 2007. General Medicine. *Veterinary Medicine Ed Radostits OM, 10th ed. Salinders, USA*, 51-58.
- Cullen, S.P., Henry, C.M., Kearney, C.J., Logue, S.E., Feoktistova, M., Tynan, G.A., et al., 2013. Fas/CD95-induced chemokines can serve as find-me signals for apoptotic cells. *Molecular Cell*, 49, 1034–48.
- D’Arcy, M.S., 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43, 582-592.
- Degtarev, A., Huang, Z., Boyce, M., 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1, 112–119.
- Delaney, C.A., Cunningham, J.M., Green, M.H., Green I.C., 1997. Nitric oxide rather than superoxide or peroxynitrite inhibits insulin secretion and causes DNA damage in HIT-T15 cells *Adv. Exp. Medicine. Biology*, 426, 335-339.
- DeMontmollin, E., Annane, D., 2011. Year in review 2010: Critical Care - multiple organ dysfunction and sepsis. *Critical Care*, 15, 236.

- Diao, J., Li, L., Lai, Y., Zhong, Q., 2017. In vitro reconstitution of autophagosome–lysosome fusion. *Methods Enzymol*, 587, 365–376.
- Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., Roelandt, R., Goncalves, A., Bruggeman, I., 2014. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Reports*, 7, 971–81.
- Donnell, M.A., Perez-Jimenez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., Xavier, R., 2011. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nature Cell Biology*, 13, 1437–42.
- Duprez, L., Takahashi, N., Van Hauwermeiren, F., 2011. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity*, 35(6), 908–918.
- Ellis, R.E., Yuan, J. and Horvitz, H.R., 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biology*. 7, 663-698.
- Fecteau, G., Pare, J., Van Metre, D.C., Smith, B.P., Holmberg, C.A., Guterbock, W., Jang, S., 1997. Use of a clinical sepsis score for predicting bacteremia in neonatal dairy calves on a calf rearing farm. *The Canadian Veterinary Journal*, 38, 101–104.
- Fecteau, G., Smith, B.P., George, L.W., 2009. Septicemia and meningitis in the newborn calf. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 25(1), 195-208.
- Feng, S., 2007. Cleavage of RIPK3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal*, 19, 2056–2067.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Häcker, G., Leverkus, M., 2011. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIPK1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Molecular Cell*, 43, 449–463.
- Galluzzi, L., 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 25, 486–541.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 19(1), 107–120.
- Geserick, P., Hupe, M., Moulin, M., Wong, W.W., Feoktistova, M., Kellert, B., Gollnick, H., Silke, J., Leverkus, M., 2009. Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIPK1 kinase recruitment. *J. Cell Biology*, 187, 1037–1054.
- Golstein, P., Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32, 37-43.
- Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., 2019. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, 18, 100.

- Green, D.R., Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., Salvesen, G.S., 2011. RIPK dependent necrosis and its regulation by caspases: a mystery in five acts. *Molecular Cell*, 44, 9-16.
- Green, D.R., Evan, G.I., 2002. A matter of life and death, *Cancer Cell*, 1, 19-30
- Hassoun, H.T., Kone, B.C., Mercer, D.W., Moody, F.G., Weisbrodt, N.W., Moore, F.A., 2001. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock*, 15, 1-10.
- Hanada, T., 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biology and chemistry*, 282, 37298–37302.
- He, S., Liang, Y., Shao, F., Wang, X., 2011. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 20054–20059.
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., Wang, X., 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell*, 137, 1100–11.
- He, S., Wang, X., 2018. RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nature Immunology*, 19, 912–922.
- He, X., Da Ros, S., Nelson, J., 2017. Identification of Potent and Selective RIPK2 Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *ACS Med Chem Lett.* 8(10), 1048–1053.
- Heim, V.J., Stafford, C.A., Nachbur, U., 2019. NOD Signaling and Cell Death. *Front Cell Developmental Biology*, 7, 208.
- Hildebrand, J.M., Tanzer, M.C., Lucet, I.S., Young, S.N., Spall, S.K., Sharma, P., 2014. Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 15072–7.
- Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J. L., Schneider P., Seed B., Tschopp, J., 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*. 1, 489–495.
- Hotchkiss, R., Moldawer, L., Opal, S., 2016. Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16045.
- Hojo, T., Siemieniuch, M., Lukasik, K., 2016. Programmed necrosis - a new mechanism of steroidogenic luteal cell death and elimination during luteolysis in cows. *Scientific reports*, 6, 38211.
- Jun, J.C., Cominelli, F., Abbott, D.W., 2013. RIP2 activity in inflammatory disease and implications for novel therapeutics. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(5), 927–932.

- Kaiser, W.J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J.W., Gough, P.J., Sehon, C.A., Marquis, R.W., Bertin, J., Mocarski, E.S.J., 2013. TRIF, RIP3 ve MLKL yoluyla otoyol benzeri reseptör 3 aracılı nekroz. *Journal of Biological Chemistry*, 288(43), 31.268-79.
- Kalimuthu, S., Se-Kwon, K., 2013. Cell survival and apoptosis signaling as therapeutic target for cancer: marine bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2334–2354.
- Kalliolias, G.D., Ivashkiv, L.B., 2016. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology*, 12, 49–62.
- Kane, D.J., Ord, T., Anton, R., Bredesen, D.E., 1995. Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death *Journal of Neuroscience Research*, 40, 269-275.
- Kazama, H., Ricci, J. E., Herndon, J. M., Hoppe, G., Green, D.R., Ferguson, T.A., 2008. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity*, 29, 21–32.
- Kerr, J.F., 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *The Journal of Pathology*, 105, 13–20.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239–257.
- Kirisako, T., 2000. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology*, 151, 263–276.
- Kono, H., Rock, K.L., 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, 8, 279–289.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 12(2), 1463–1467.
- Laster, S.M., Wood, J.G., Gooding, L.R., 1988. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *Journal Immunology*, 141, 2629–2634
- Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H., 2005. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*, 118, 265–267.
- Lee, J.H., Jeong, Y.J., Lee, S.W., Kim, D., Oh, S.J., Lim, H.S., Oh, H.K., Kim, S.H., Kim, W.J., Jung, J.Y., 2010. EGCG induces apoptosis in human laryngeal epidermoid carcinoma Hep2 cells via mitochondria with the release of apoptosis-inducing factor and endonuclease *G. Cancer Letters*, 290, 68–75.
- Levy, M.M., Fink, M.P., 2003. Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L., Ramsay, G., 2001. SCCM/ESICM/ATS/SIS

- International Sepsis Definitions Conference, *Critical Care Medicine*, 31(4), 1250-1256.
- Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., 2012. The RIPK1/RIPK3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*, 150, 339–350.
- Lin, Q., Fu, F., Shen, L., Zhu, B., 2013. Pentraxin 3 in the assessment of ventilator-associated pneumonia: an early marker of severity. *Heart Lung*; 42, 139-45.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., Liu, Z., 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes*, 13, 2514–2526.
- Liu, Y., Liu, T., Lei, T., 2019. RIPK1/RIPK3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(3), 771–786.
- Lu, T., 2014. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer’s disease. *Nature*, 507, 448–454.
- Mainous, M.R., Ertel, W., Chaudry, I.H., Deitch, E.A., 1995. The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock*, 4, 193-199.
- Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kawahara, A., Uchiyama, Y., Nagata, S., 2000. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *Journal. Cell Biology*, 151, 1247–1256
- Micheau, O., Tschopp, J., 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181-90
- Mizock, B.A., 2009. The multiple organ dysfunction syndrome. *Disease-A-Month*, 55, 476–526
- Moquin, D., Chan, F.K., 2010. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem. Sci*, 35, 434–441.
- Moriwaki, K., Chan, F.K., 2013. RIPK3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes & Development*, 27, 1640–1649.
- Moujalled, D.M., Cook, W.D., Okamoto, T., Murphy, J., Lawlor, K.E., Vince, J.E., Vaux, D.L., 2013. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Discovery*, 4, 465.
- Murphy, J.M., Czabotar, P.E., Hildebrand, J.M., Lucet, I.S., Zhang, J.G., Alvarez-Diaz, S., 2013. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39, 443–53.
- Nachbur, U., Stafford, C., Bankovacki, A., 2015. A RIPK2 inhibitor delays NOD signalling events yet prevents inflammatory cytokine production. *Nat Commun*, 6, 6442.

- Ofengeim, D., Yuan, J., 2013. Regulation of RIPK1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 727–36.
- Ok, M., Er, C., Yıldız, R., Çöl, R., Aydoğdu, U., Şen, İ., Güzelbekteş, H., 2015. Evaluation of acute phase proteins, some cytokines and hemostatic parameters in dogs with sepsis *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21, 761-766.
- Oliva-Martin, M.J., Sanchez-Abarca, L.I., Rodhe, J., 2016. Caspase-8 inhibition represses initial human monocyte activation in septic shock model. *Oncotarget*, 7(25), 37456–37470.
- Oral, U., 2006. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, *Türkiye Klinikleri Journal of Surgical Medical Sciences*, 2 (32), 1-4.
- Osterbur, K., Mann, F.A., Kuroki, K., DeClue, A., 2014. Multiple organ dysfunction syndrome in humans and animals, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(4), 1141–1151.
- Otto, C.M., Rieser, T.M., Brooks, M.B., Russell, M.W., 2000. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *JAVMA*, 217(10), 1500-1509.
- Pasparakis, M., Vandenabeele, P., 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517, 311–320.
- Qian, Y., Guan, T., Huang, M., Cao, L., Li, Y., Cheng, H., Jin, H., Yu, D., 2012. Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF-kB activation in a cerebral ischemia mouse model. *Neurochemistry International*, 60, 759–767.
- Rabinovich, G.A., Riera, C.M., Iribarren P., 1999. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor protects dendritic cells from liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate-induced apoptosis through a Bcl-2-mediated pathway *European Journal of Immunology*, 29, 563-570.
- Raghavan, M., Marik, P.E., 2006. Management of sepsis during the early “golden hours”. *The Journal of Emergency Medicine*, 31(2), 185–199.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 405-413.
- Roy, M.F., 2004. Sepsis in adults and foals. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20(1), 41–61.
- Russel J, 2006. Management of sepsis. *The New England Journal of Medicine*, 355, 1699-713.
- Saldeen, J., 2000. Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology*, 141(6), 2003–2010.

- Sanchez, L.C., 2005. Equine neonatal sepsis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, Aug, 21, 273-93.
- Sedger, L.M., McDermott, M.F., 2014. TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. *Cytokine Growth Factor*, 25, 453–72.
- Sedger, L. M., 2010. Extreme lymphoproliferative disease and fatal autoimmune thrombocytopenia in FasL and TRAIL double-deficient mice. *Blood*, 115, 3258–3268.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., Tsujimoto, Y., 1995. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL *Nature*, 374, 811-813.
- Shintani, T., 1999. Apg10p, a novel protein conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *The EMBO Journal*, 18, 5234–5241.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801–810.
- Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K., 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 175–193.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., 2012. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIPK3 kinase. *Cell*, 148, 213–227.
- Sun, X., Lee, J., Navas, T., Baldwin, D.T., Stewart, T.A., Dixit, V.M., 1999. RIPK3, a novel apoptosis-inducing kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 16871–5.
- Tait, S.W., Oberst, A., Quarato, G., Milasta, S., Haller, M., Wang, R., Karvela, M., Ichim, G., Yatim, N., Albert, M.L., 2013. Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell Reports*, 5, 878–885
- Tait, S.W., Ichim, G., Green, D.R., 2014. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science*, 127(10), 2135–2144.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 231–41.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., 2011. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Molecular Cell*, 43, 432–448.
- Trefz, F.M., Lorch, A., Feist, M., Sauter-Louis, C., Lorenz, I., 2013. The Prevalence and Clinical Relevance of Hyperkalaemia in Calves with Neonatal Diarrhoea. *Journal of Veterinary Science*, 195(3), 350-356.

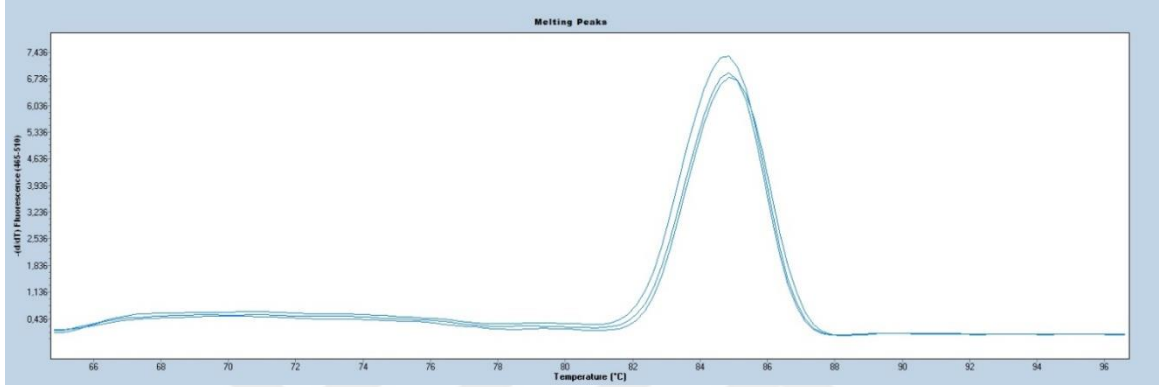
- Upton, J.W., Kaiser, W.J., Mocarski, E.S., 2010. Virus inhibition of RIPK3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe*, 7, 302–313.
- Upton, J.W., Kaiser, W.J., Mocarski, E.S., 2012. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIPK3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host & Microbe*, 11, 290–297.
- Van, R.B.J., Ehrnhoefer, D.E., Hayden, M.R., Salvesen, G.S., 2013. Intrinsic cleavage of receptor-interacting protein kinase-1 by caspase-6. *Cell Death Differ*, 20, 86–96.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T.V., Kroemer, G., 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 700–714.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D.V., Festjens, N., Vandenabeele, P., 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current Molecular Medicine*, 8, 207–220.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine*, 187, 1477–85.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.F., 2014. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIPK3, 54, 133–46.
- Wang, L., Du, F., Wang, X., 2008. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 133, 693–703.
- Wang, X., 2003. Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 29184–29191.
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., Wang, X., 2012. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 148, 228–243.
- Wu, J., Huang, Z., Ren, J., Zhang, Z., He, P., Li, Y., Ma, J., Chen, W., Zhang, Y., Zhou, X., 2013. Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis. *Cell Reserch*, 23, 994–1006.
- Xia, X., Lei, L., Wang, S., 2020. Necroptosis and its role in infectious diseases. *Apoptosis*.
- Zhang, D., Lin, J., Han, J., 2010. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Molecular Immunology*, 4, 243–249.
- Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., Han, J. 2009. RIPK3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, 325, 332–336.

Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., Liu, Z.G., 2012. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, 109, 5322–5327.

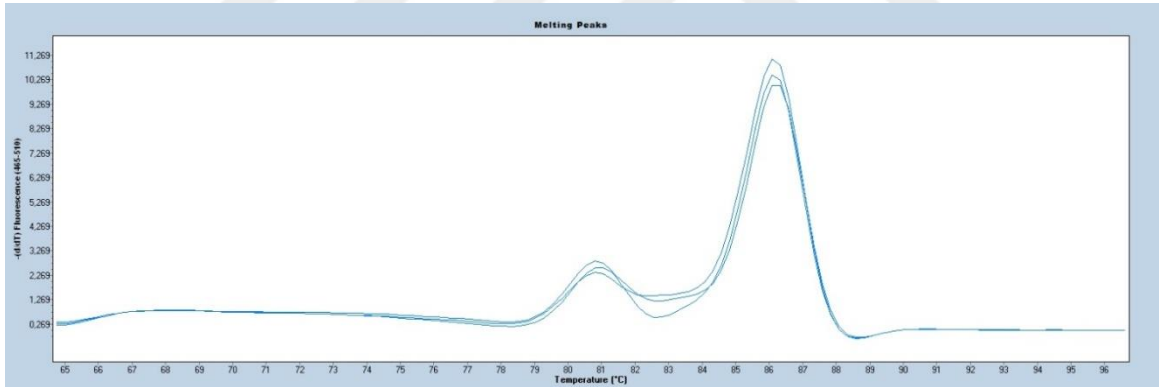


7. EKLER

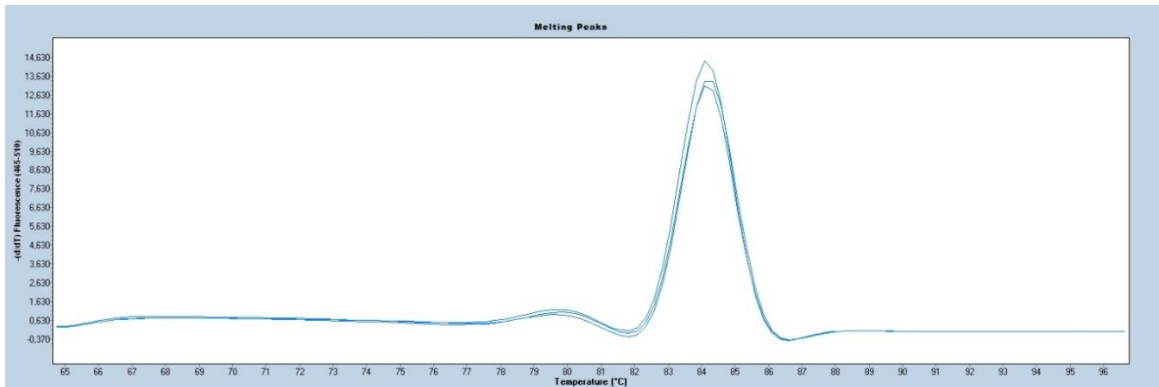
Aşağıda sağlıklı ve sepsis şüpheli buzağılara ait örneklerde SYBR Green floresans boyası ve GAPDH internal kontrolüne ve RIPK1, RIPK2 ve RIPK3'e özgü primerlerin kullanımı ile gerçekleşen qPCR işlemlerinde elde edilen erime eğrilerinin (melt curve) temsili görüntüleri verilmiştir.



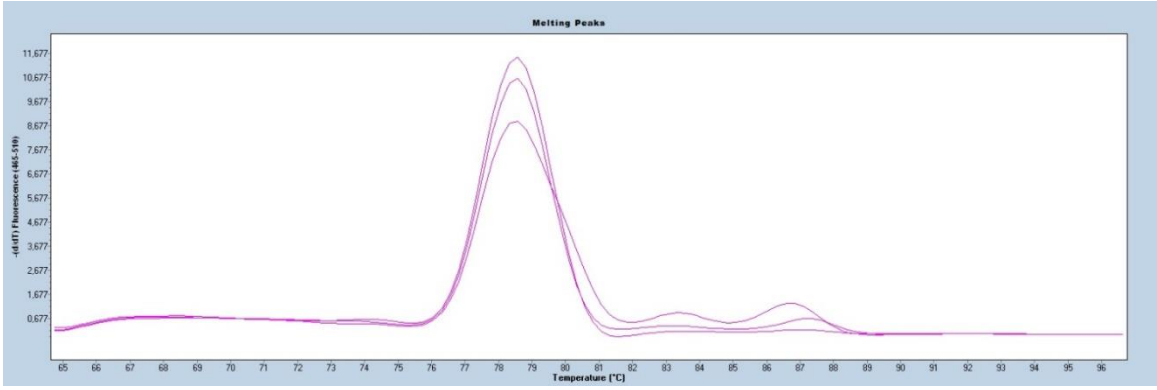
Şekil 7.1. Sağlıklı örnekte GAPDH'e ait erime eğrisi.



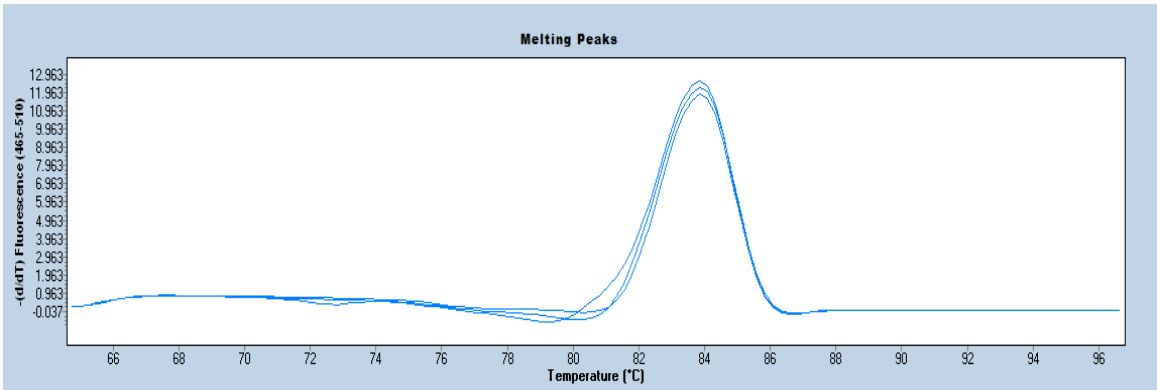
Şekil 7.2. Sağlıklı örnekte RIPK1'e ait erime eğrisi.



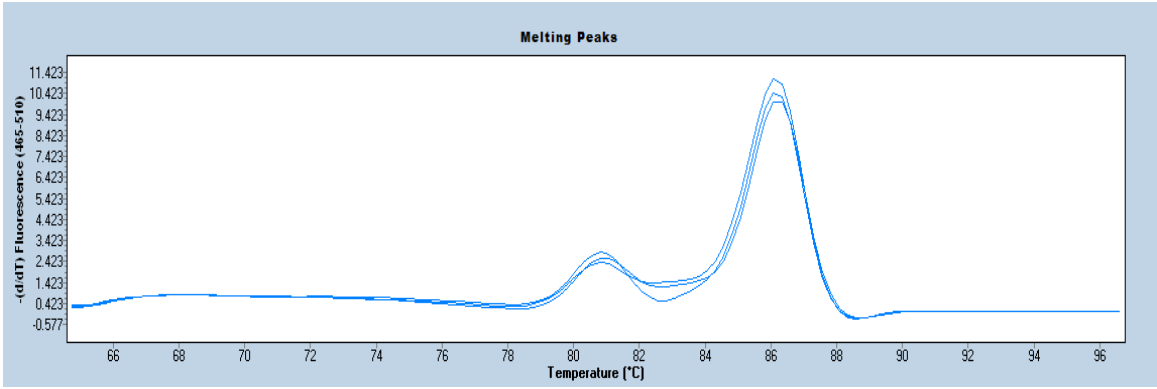
Şekil 7.3. Sağlıklı örnekte RIPK2'e ait erime eğrisi.



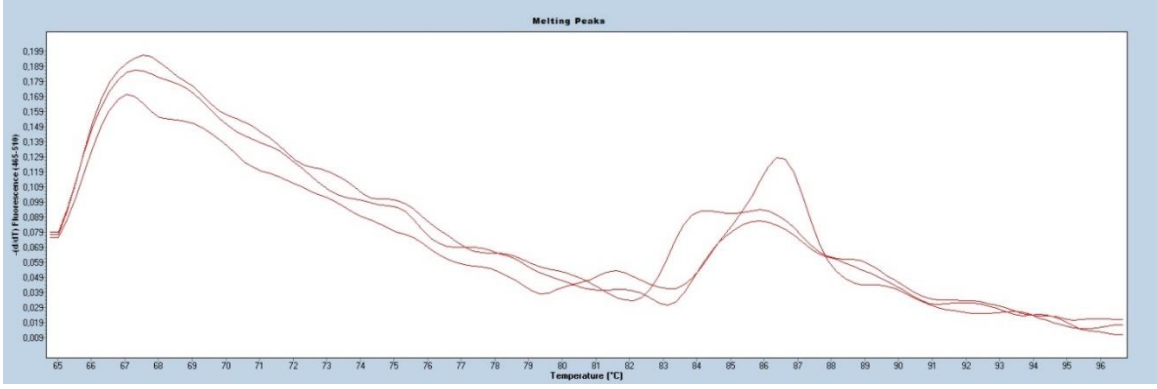
Şekil 7.4. Sağlıklı örnekte RIPK3'e ait erime eğrisi.



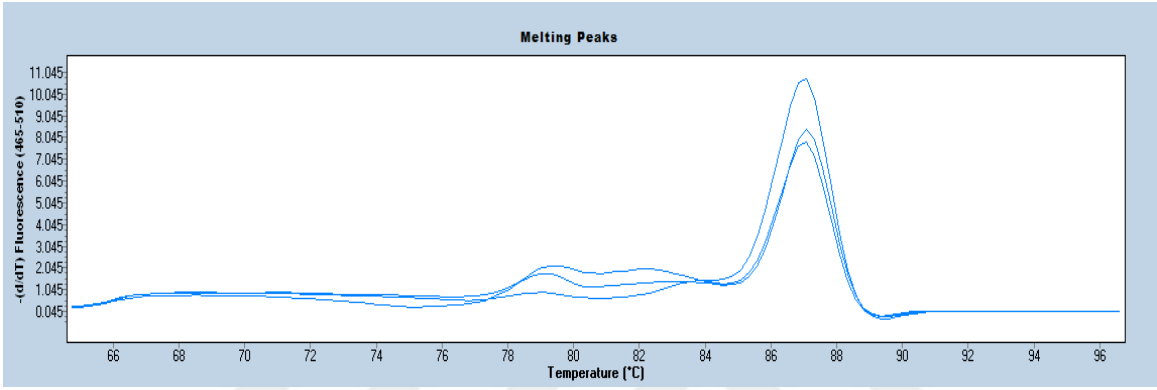
Şekil 7.5. Sepsis şüpheli örnekte GAPDH'e ait erime eğrisi.



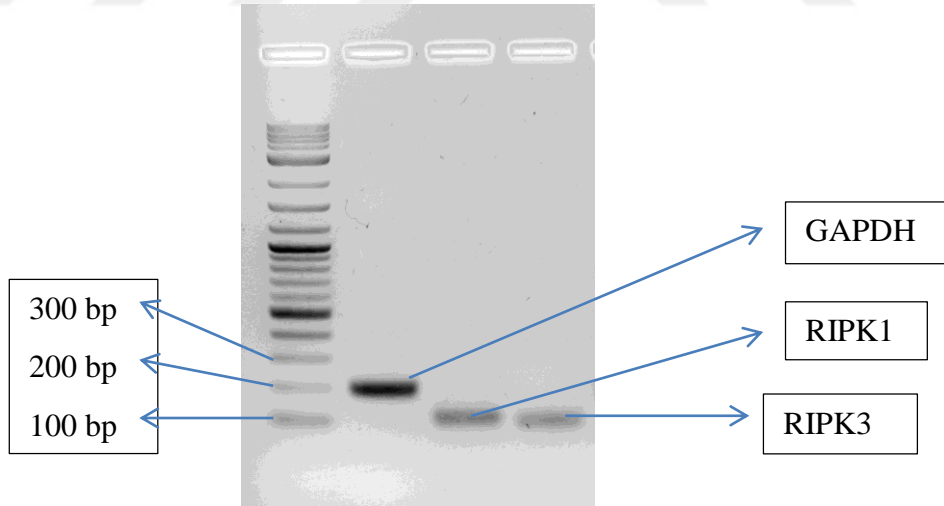
Şekil 7.6. Sepsis şüpheli örnekte RIPK1'e ait erime eğrisi.



Şekil 7.7. Sepsis şüpheli örnekte RIPK2'ye ait erime eğrisi.



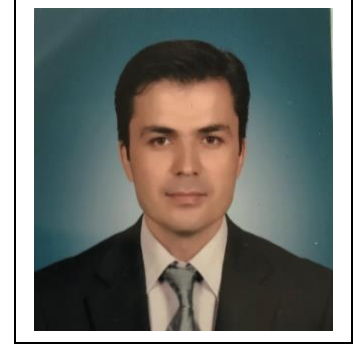
Şekil 7.8. Sepsis şüpheli örnekte RIPK3'ye ait erime eğrisi.



Şekil 7.9. qPCR sonuçlarının %2'lik agaroz jel üzerinde gösterilmesi [Marker, GAPDH (199 bp), RIPK1 (113 bp), RIPK3 (102 bp)].

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Atilla DOĞAN
Doğum Yeri ve Yılı :Burdur/13.01.1978



<u>Eğitim Durumu</u>	<u>Yıl</u>
Lise : Burdur Lisesi	1992-1995
Lisans : Gazi Üniversitesi Biyoloji öğretmenliği	1996-2000
Yüksek Lisans : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2016-

<u>Çalıştığı Kurum / Kurumlar</u>	<u>Yıl</u>
1- Ağrı/Hamur Soğanlıtepe İlköğretim Okulu	2000-2005
2- Ağrı/Merkez Öğretmenler Lisesi	2005-2006
3- Isparta/Yalvaç Anadolu İmam Hatip Lisesi	2006-2009
4- Isparta/Gelendost Anadolu Lisesi	2009-2010
5- Burdur/Bucak Adem Tolunay Fen Lisesi	2010-2013
6- Burdur/Merkez Ercan Akın Fen Lisesi	2013-

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

