



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**RATLARDA LİPOLİSAKKARİT(LPS) İLE
İNDÜKLENEN İNFLAMASYONUN KONTROLÜNDE,
METFORMİN VE FİBROBLAST GROWTH FAKTÖR 21
(FGF21)'İN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EZGİ KAR

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÖZKAN ALATAŞ**

2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**RATLARDA LİPOLİSAKKARİT(LPS) İLE
İNDÜKLENEN İNFLAMASYONUN KONTROLÜNDE,
METFORMİN VE FİBROBLAST GROWTH FAKTÖR 21
(FGF21)'İN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EZGİ KAR

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÖZKAN ALATAŞ**

Proje no: 2016-1353

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ezgi KAR'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Ratlarda Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen inflamasyonun kontrolünde, Metformin ve Fibroblast Growth Faktör 21 (FGF21)'in etkisinin incelenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih
10.05.2018

Üye : Prof. Dr. Özkan ALATAŞ

Üye : Prof. Dr. Güngör KANBAK

Üye : Doç. Dr. Halide Edip TEMEL

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.05/2018 tarih ve 1174/5777 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

Özet

Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakterilerin duvarlarında bulunan ve canlılar için oldukça toksik olan bir moleküldür. LPS canlıya nüfuz ettiği zaman endotoksemi meydana gelir ve daha ciddi seviyelere ilerlediği durumlarda septik şok oluşur. Bu çalışmada, LPS ile oluşturulan endotoksemi sonucu meydana gelen inflamasyon ve oksidatif stresin üzerine metformin ve Fibroblast Büyüme Faktör 21 (FGF21)'in etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 40 *Sprague Dawley* cinsi rat, her birinde 8 rat bulunacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Gruplar; Kontrol, LPS, LPS'den 1 saat önce metformin, LPS sonrası 1. saatte metformin ve LPS sonrası 3. saatte metformin olarak belirlendi. LPS 5 mg/kg ve Metformin 200 mg/kg hacimlerde hazırlanarak ratlara intraperitoneal yolla enjekte edildi. LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra ratlardan kan örnekleri ve karaciğer dokuları alındı. Rat serumlarında; Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST), Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α), Interlökin-10 (IL-10) ve FGF21 düzeyleri ölçüldü. Karaciğer doku örneklerinde ise Myeloperoksidaz (MPO), Malondialdehit (MDA) ve FGF21 düzeyleri tespit edildi. Karaciğer dokuları hematoksilin-eozin boyası kullanılarak histolojik olarak incelendi. Veri analizleri IBM SPSS Statistics 21 paket programları ile yapıldı. Elde edilen verilere göre, LPS'nin ratların karaciğer dokularında oksidatif stres ve inflamasyon açısından ciddi hasarlar meydana getirdiği gözlemlendi. Tedavi grupları ile karşılaştırıldığında, metforminin inflamasyon üzerine koruyucu etkisi olduğu saptandı. FGF21'in inflamasyon sonrası özellikle karaciğer dokusunda üretiminin indüklendiği ve metforminin bu etkinliği arttırmış olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Fibroblast Büyüme Faktör 21, inflamasyon, lipopolisakkarit, metformin

Summary

Lipopolysaccharide (LPS) found on the walls of gram negative bacteria is highly toxic to living organisms. Endotoxemia occurs when the LPS penetrates into the living body and septic shock occurs when progressing to higher levels. In this study, the effect of metformin and Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) on inflammation and oxidative stress occurred by LPS-induced endotoxemia was investigated. In the study, 40 *Sprague Dawley* rats were divided into 5 groups with 8 rats each. Groups were determined as Control, LPS, metformin 1 hour before LPS, metformin 1 hour after LPS and metformin 3 hours after LPS. LPS and Metformin was prepared at 5 mg/kg and 200 mg/kg volumes and injected intraperitoneally to the rats. Blood samples and liver tissues were taken from the rats 24 hours after LPS injection. In rat serum; Alanine Aminotransferase (ALT), Aspartate Aminotransferase (AST), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), Interleukin-10 (IL-10) and FGF21 levels were measured. Myeloperoxidase (MPO), Malondialdehyde (MDA) and FGF21 levels were detected in liver tissue samples. Liver tissues were examined histologically using hematoxylin-eosin stain. Data analysis was done with IBM SPSS Statistics 21 package programs. According to the obtained data, it was observed that LPS caused serious damage to the liver tissues in terms of oxidative stress and inflammation. However, when compared with the treatment groups, it was found that metformin had a protective effect on inflammation. It is thought that FGF21 is induced in the liver after inflammation and metformin may increase this activity.

Keywords: Fibroblast Growth Factor 21, inflammation, lipopolysaccharide, metformin

İçindekiler

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	iv
GRAFİK DİZİNİ.....	viii
TABLO DİZİNİ.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ.....	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 İnflamasyon ve Sepsis.....	3
2.1.1 Akut İnflamasyon.....	6
2.1.2 Kronik İnflamasyon.....	8
2.1.3 İnflamatuvar Sitokinler.....	9
2.1.3.1 Proinflamatuvar Sitokinler.....	11
2.1.3.2 Antiinflamatuvar Sitokinler.....	13
2.2 Karaciğerin İnflamasyondaki Rolü	14
2.3 Lipopolisakkarit (LPS)	15
2.4 Metformin.....	16
2.5 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF21)	19

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1 Gereçler	23
3.1.1 Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi Ve Bakımı.....	23
3.1.2 Deney Gruplarının Belirlenmesi ve Deneysel İşlemler.....	23
3.1.3 Deneysel İşlemlerde Kullanılan Sarf Malzemeler.....	24
3.1.4 Deneysel İşlemlerde Kullanılan Cihazlar.....	25
3.2 Yöntemler	25
3.2.1 Cerrahi İşlemler	25
3.2.2 Karaciğer Hasarı Belirteçleri	26
3.2.3 Hücre Aktivasyonu Ve İnflamasyonun Değerlendirilmesi.....	26
3.2.4 Oksidatif Stres Hasarının Belirlenmesi.....	27
3.2.5 İnflamatuar Belirteçlerin Ölçümü	29
3.2.5.1 Tümör Nekroz faktörü - α (TNF- α) Düzeylerinin Belirlenmesi.....	29
3.2.5.2 Interlökin 10 (IL-10) Düzeylerinin Belirlenmesi.....	31
3.2.6 Fibroblast Büyüme Faktörü 21 (FGF21) Düzeyleri Ölçümü	34
3.2.7 Karaciğer Doku Homojenatlarında Protein Ölçümü.....	36
3.2.8 Karaciğer Dokularının Histolojik Olarak İncelenmesi.....	37
3.2.9 İstatistiksel Analiz	37

4. BULGULAR.....	39
4.1 Karaciğer Hasarı Belirteçleri.....	39
4.2 Hücre Aktivasyonu Ve İnflamasyonu Belirteçleri.....	41
4.3 Oksidatif Stres Hasarı Belirteci.....	42
4.4 İnflamatuar Belirteçler.....	45
4.4.1 Tümör Nekroz faktörü - α (TNF- α) Düzeyleri.....	45
4.4.2 Interlökin 10 (IL-10) Düzeyleri.....	47
4.5 Fibroblast Büyüme Faktörü 21 (FGF21) Düzeyleri.....	48
4.6 Histolojik Bulgular.....	51
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	66

Grafik Dizini

Grafik 4.1.A	Serum	AST	değerlerinin	gruplar	arasındaki	karşılaştırılması.....	40
Grafik 4.1.B	Serum	ALT	değerlerinin	gruplar	arasındaki	karşılaştırılması.....	41
Grafik 4.2	Doku	MPO	değerlerinin	gruplar	arasındaki	karşılaştırılması.....	42
Grafik 4.3	MDA kalibrasyon grafiği.....						43
Grafik 4.4	Total protein(Biüret) Standart Grafiği.....						44
Grafik 4.5	Doku	MDA	düzeylerinin	gruplar	arasındaki	karşılaştırılması.....	45
Grafik 4.6	Serum	TNF- α	düzeylerinin	gruplar	arasındaki	karşılaştırılması.....	46
Grafik 4.7	Serum	IL-10	düzeylerinin	gruplar	arasındaki	karşılaştırılması.....	48
Grafik 4.8	Serum	FGF21	düzeylerinin	gruplar	arasındaki	karşılaştırılması.....	49
Grafik 4.9	Doku	FGF21	düzeylerinin	gruplar	arasındaki	karşılaştırılması.....	50

Tablo Dizini

Tablo 2.1 Başlıca İnflamatuar Medyatörler ve Etkileri.....	9
Tablo 2.2 Bazı önemli sitokinler ve birincil etkileri.....	10
Tablo 3.1 Deney grupları ve gruplara göre uygulanan işlemler.....	24
Tablo 3.2 MPO yöntemi.....	27
Tablo 3.3 MDA yöntemi.....	28
Tablo 3.4 TNF- α ELISA kiti içerisinde yer alan ölçüm materyalleri.....	29
Tablo 3.5 IL-10 ELISA kiti içerisinde yer alan ölçüm materyalleri.....	32
Tablo 3.6 FGF21 ELISA kiti içerisinde yer alan ölçüm materyalleri.....	34
Tablo 3.7 Biüret ölçüm prosedüründeki bileşenlerin hacimleri.....	37
Tablo 4.1 Çalışma Gruplarında AST ve ALT Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması.....	39
Tablo 4.2 Çalışma Gruplarında Doku MPO Sonuçlarının İstatistiksel.....	41
Tablo 4.3 Çalışma Gruplarında Doku MDA Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması.....	43
Tablo 4.4 Çalışma Gruplarında Serum TNF- α Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması.....	45
Tablo 4.5 Çalışma Gruplarında Serum IL-10 Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması.....	47
Tablo 4.6 Çalışma Gruplarında Serum FGF21 Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.7 Çalışma Gruplarında Doku FGF21 Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması.....	49

Şekil Dizini

Şekil 2.1 İnflamasyon süreçleri.....	3
Şekil 2.2 Patojenlerin hücre membranında tanınması sırasında gelişen mekanizmalar.....	5
Şekil 2.3 Akut inflamasyonda meydana gelen lokal değişiklikler.....	6
Şekil 2.4 Akut inflamasyonda lökositlerin davranış mekanizması.....	8
Şekil 2.5 Gram-negatif bakterilerin iç ve dış membran yapısı ve LPS lokalizasyonu.....	15
Şekil 2.6 Metforminin yapısı.....	16
Şekil 2.7 Metforminin antiinflamatuvar mekanizması.....	18
Şekil 2.8 FGF21 tarafından FGFR1c reseptörünün aktivasyonu.....	20
Şekil 2.9 FGF21'in karaciğerdeki metabolik etkileri.....	21
Şekil 4.1 Grup 1'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....	51
Şekil 4.2 Grup 2'ye ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....	52
Şekil 4.3 Grup 2'ye ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....	53
Şekil 4.4 Grup 3'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....	54
Şekil 4.5 Grup 3'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....	54
Şekil 4.6 Grup 4'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....	55
Şekil 4.7 Grup 4'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....	56

Şekil 4.8 Grup 5'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....57

Şekil 4.9 Grup 5'e ait karaciğer dokusu örneklerinin ışık mikroskobu inceleme görüntüleri.....57



Simge ve Kısaltmalar Dizini

AGE	İleri glikasyon son ürünleri
ALT	Alanin aminotransferaz
AMPK	Adenin monofosfat aktive protein kinaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ChREBP	Karbohidrat yanıt element-bağlama proteini
COX-2	Siklooksijenaz-2
CRP	C-reaktif protein
CSIF	Sitokin sentez engelleyici faktör
DMSO	Dimetilsülfoksit
ECM	Ekstrasellüler matriks
ELISA	Enzim bağlı immün sorbent test
FGF21	Fibroblast büyüme faktörü 21
FGFR1c	Fibroblast büyüme faktör reseptörü 1c
GH	Büyüme hormonu
GLP-1	Glukagon benzeri peptit-1
HETAB	Hekzadesil trimetil amonyum bromid
HLGAG	Heparan benzeri glikozaminglikanlar
HOCl	Hipokloröz Asit
IFN	İnterferon
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL	İnterlökin
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
LBP	Lipit-A bağlayıcı protein
LPS	Lipopolisakkarit
MAC	Membran atak kompleksi
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MHC	Majör doku-uygunluk bileşeni antijen sınıfı
MPO	Myeloperoksidaz
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinükleotit (fosfat)
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
NK	Doğal katil hücreler
NLP	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domen protein benzeri- reseptör
NO	Nitrik oksit
NOD	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domen proteini
PARP-1	Poli adenin dinükleotid fosfat-riboz polimeraz-1
PECAM-1	Trombosit endotel hücresi adezyon molekülü-1
PI3K	Fosfoinositid 3-kinaz
PKA	Protein kinaz A
PPAR	Peroksizom proliferatör aktive reseptör
RNS	Reaktif azot türleri

ROS	Reaktif oksijen türleri
RPM	Dakikada devir sayısı (Revolutions per Minute)
SAPK	Stres aktive protein kinaz
STAT5	Sinyal transkripsiyon faktör 5
TBA	Tiyobarbitürik asit
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
T _H	T yardımcı hücreler
TLR	Toll benzeri reseptör
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF	Tümör nekroz faktör



1- GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamasyon fiziksel, kimyasal ve patojenlerin neden olduğu bir doku hasarına karşı hücrel ve humoral düzeyde oluşan güçlü bir fizyolojik yanıttır. İnflamasyonda amaç hasarı olduğu yerde sınırlı tutmak, hasarlayıcı etkeni ve ürünleri ortadan kaldırmak, kontrol sağlandıktan sonra hasarlı dokuların tamirini ve yenilenmesini sağlamaktır (Tuzlalı, Güllüoğlu & Çevikbaş, 2014).

İnflamasyon sırasında lokal olarak ısı artışı, ağrı, kızarıklık ve şişlik gibi belirtiler görülür. Sistemik olarak ise ateş, sedimantasyon, lökosit ve vasküler permeabilite artışı görülür. İnflamasyonun organizmada üç temel amacı vardır. Bunlar, hastalık etkenini yok etmek, yok edemiyorsa vücuttan ayrı tutmak ve hasarlı dokuları ortadan kaldırmaktır (Libby, 2007).

Lipopolisakkarit (LPS), Gram negatif bakterilerin dış zarının bir parçası olup iki majör fonksiyonu gerçekleştirmektedir. Birincisi, koruyucu role sahip olması; Gram negatif bakteriler için zorlu çevresel şartlara ve stres faktörlerine karşı bariyer görevi görmesidir. İkincisi ise, LPS Gram negatif bakterilerin aynı zamanda endotoksini olması ve memeli hücrelerde patojen olarak davranmalarını sağlamaktır (Steimle, Autenrieth, & Frick, 2016).

LPS, inflamatuvar sitokinlerin, serbest oksijen radikallerinin, Nitrik Oksit ve araziidonik asit metabolitleri gibi medyatörlerin ortaya çıkmasına neden olarak, inflamasyonun başlatılmasında önemli rol oynar (Er, vd., 2010).

Metformin, Tip II Diabetes Mellitus tedavisinde yaygın olarak kullanılan biguanid türevi oral hipoglisemik ilaçtır (Saisho, 2015). Metforminin, hepatik glukoneogenezi baskılayarak ve kaslardaki insülin duyarlılığını arttırarak kan glukozunu azalttığı gösterilmiştir. Ancak bu etkisinin ötesinde, metforminin anti-aging, anti-kanser ve anti-inflamatuvar etkileri de mevcuttur. Çalışmalar, metforminin anti-inflamatuvar etkisini, AMP aktive protein kinaz (AMPK)'ın Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB) üzerindeki inhibisyonu sonucu oluşturduğunu ortaya koymaktadır (Saisho, 2015). Bu inhibisyon aracılığı ile makrofajlardan Nitrik Oksit, prostaglandin E2 ve pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α üretimlerini azaltmaktadır (Hyun, vd., 2013). Bunun yanı sıra, anti-inflamatuvar sitokinler olan IL-4 ve IL-10 protein ekspresyonlarını da arttırmakta ya da korumaktadır (Hyun, vd., 2013).

Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF), geniş bir polipeptit ailesi olup, çeşitli biyolojik aktivelere sahiptir. FGF ailesi, sekans benzerliklerine, biyokimyasal işlevlerine ve evrimsel gelişimlerine göre 7 alt aileye ayrılmış 22 üyeden oluşur. Bilinen FGF ailesi üyelerinin, özellikle mitoz, doku onarımı, transformasyon ve anjiyogenez gibi olaylarda rol aldıkları gösterilmişse de,

son çalışmalar, endokrin hormon benzeri düzenleyici etkilere de sahip olduklarını ortaya koymaktadır (Presta, Chiodelli, Giacomini, Rusnati, & Ronca, 2017).

Fibroblast Büyüme Faktörleri ailesinin bir yesi olan FGF21, başlıca karaciğer, pankreas ve adipoz doku olmak üzere birçok organda eksprese edilen, önemli bir endokrin metabolik regülatördür. Özellikle lipid ve glukoz metabolizmasında düzenleyici olarak görev alan FGF21'in, serumda artması, glukoz ve trigliserid düzeylerinin azalmasına yardımcı olmaktadır (Feingold, vd., 2012).

Karaciğerde açlık ve ketojenik diyet, FGF21 salınımını arttırmakta ve yağ asidi oksidasyonunda anahtar rol oynamaktadır. FGF21 serum düzeyleri açlık, fibrat tedavisi, obezite ve Tip II Diabetes Mellitus hastalığında yükselmektedir (Cariello & Moschetta, 2014). Yapılan alışmalarda, FGF21'in akut faz reaksiyonu durumunda serumda miktarının yükseldiği ve inflamasyonda koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Feingold, vd., 2012; Singhal, vd., 2016; Yu, vd., 2016).

Metformin ve FGF21 düzeyleri arasındaki ilişki hücre kültürü çalışmaları ile gösterilmiştir. Nygaard ve ekibi tarafından yapılan hücre kültürü çalışmasında, metforminin karaciğer hepatosit hücrelerinden FGF21 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Nygaard, Vienberg, Orskov, Hansen, & Andersen, 2012).

Hui Fan ve ekibi tarafından yeni tanı konmuş Tip II Diabetes Mellitus hastaları ile yürütülen çalışmada, metformin kullanımı sonrası hastaların plazma FGF21 düzeylerinde dikkate değer bir düşüş olduğu tespit edilmiştir (Fan, vd., 2016). FGF21 düzeylerindeki düşüşün, metforminin diyabet hastalarının glukoz-lipid metabolizmalarında ve inflamasyonda meydana getirdiği iyileşme üzerinden gerçekleştiği yorumlanmıştır.

Yapılan çalışmaların büyük bir bölümü hücre kültürü ortamında yapılmış olup, *in vivo* veriler azdır.

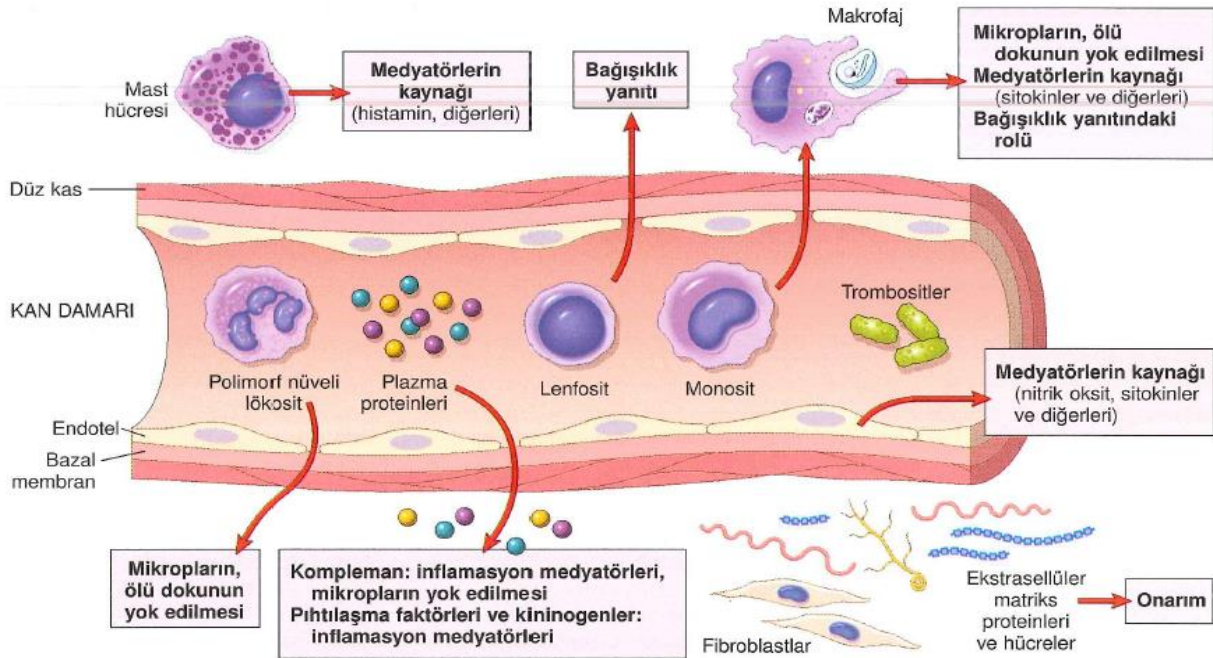
Bu tez çalışmasındaki amacımız, erkek ratlara uygulanacak olan LPS ile inflamasyon modelinde, metforminin inflamasyon üzerindeki olası koruyucu veya tedavi edici etkilerini, biyokimyasal belirteçler ve histolojik incelemeler ile araştırmak olmuştur. FGF21'in inflamasyondaki düzeyleri, rolü ve metforminin FGF21 zerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1 İnflamasyon ve Sepsis

Canlı organizmaların yaşamlarını sürdürebilmek için enfeksiyon etkenleri gibi organizma dışı istilacıları ve hasarlı dokuları uzaklaştırmaya ihtiyacı vardır. Bu fonksiyonlar, *inflamasyon* adı verilen, karmaşık bir organizma yanıtı aracılığı ile gerçekleştirilir. İnflamasyon genel olarak; konak hücrenin, kan damarlarının, proteinlerin ve diğer medyatörlerin, hücre hasarını başlatan nedeni ve bu neden yüzünden nekroza uğrayan hücre ve dokuların ortadan kaldırmaya çalıştığı ve onarım sürecini başlattığı, koruyucu bir yanıt olarak tanımlanmaktadır (Tuzlalı, 2014).

Galen ve Celsus, inflamasyonun dış belirtilerini periferik vazodilatasyon (rubor), ateş (calor), ağrı (dolor), artmış kılcal geçirgenlik (tumor) ve organ işlev bozukluğu (functio laesa) olarak tanımlamıştır (Vincent, Opal, Marshall, & Tracey, 2013). Temel düzeyde, enfeksiyon veya doku yaralanmasıyla tetiklenen akut inflamatuvar cevap, kan bileşenlerinin (plazma ve lökositler) koordineli olarak enfeksiyon veya yaralanma bölgesine migrasyonunu içerir. (Majno, G., & Joris, I., 2004). İnflamatuvar yanıt kısaca; 1) Zararlı etkenin tespit edilmesi, 2) lökositlerin inflamatuvar yanıtın oluşacağı yere toplanması, 3) tespit edilen zararlı etkenin ortadan kaldırılması, 4) oluşan yanıtın düzenlenmesi ve denetlenmesi, 5) hasarlı bölgenin onarımı ve son olarak 6) fonksiyon kaybının giderilmesi aşamalarını içermektedir (Tuzlalı, 2014).



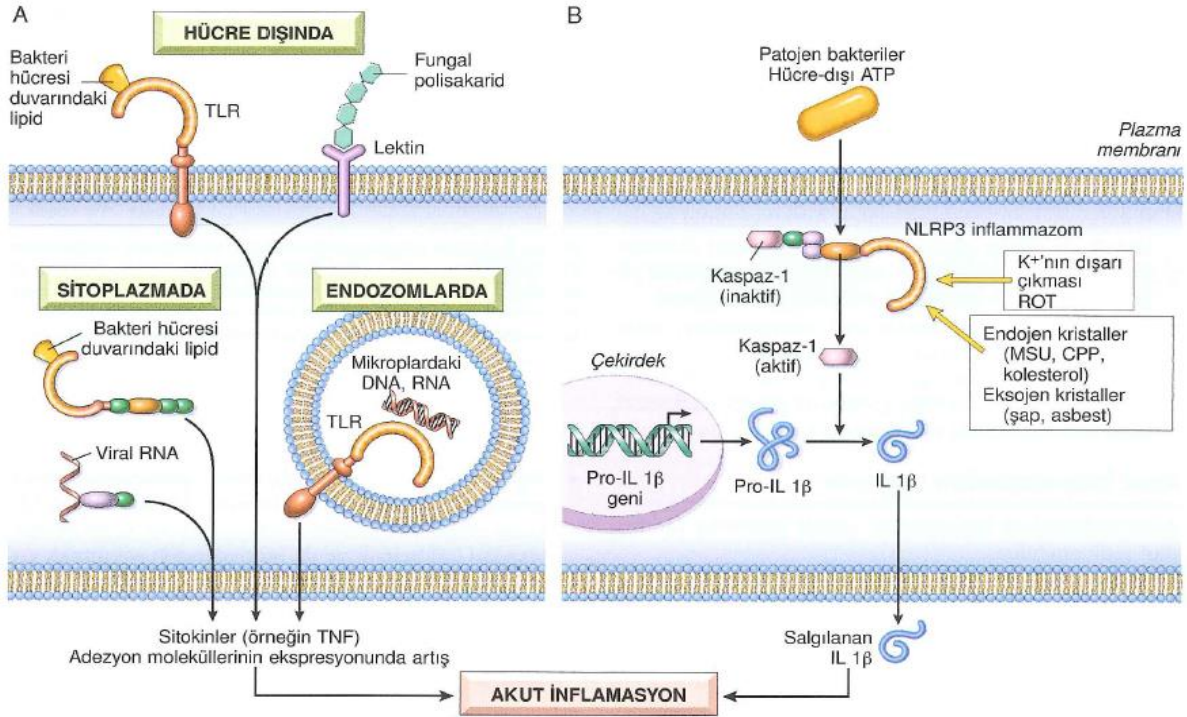
Şekil 2.1 İnflamasyon süreçleri (Tuzlalı, 2014)

İnflamasyonun majör tetikleyicisi, patojen mikroplar olmakla beraber, mekanik travma, iskemi, mineraller, kristaller, kimyasallar ve antijenler de dahil olmak üzere steril uyaranlar da inflamasyonu tetiklemektedir. Bu tür inflamasyonlar steril inflamasyon olarak adlandırılabilir. Bu steril uyarıların büyük bir kısmı, zararlı, tahriş edici veya antijenik olarak kategorize edilebilir (Rock, Latz, Ontiveros, & Kono, 2010). İnflamasyonun çeşitli tetikleyicileri, enfeksiyöz veya steril olsun, aşağı yukarı aynı vasküler ve hücrel mekanizmalara yol açar.

Bir enfeksiyona bağlı olarak gelişen sistemik inflamatuvar yanıt *sepsis* olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyon; normalde steril olan bir doku, sıvı veya vücut kavitesinin potansiyel olarak patojenik mikroorganizmalar tarafından invazyonu olarak tanımlanmaktadır (Levy, vd., 2003). Sepsis; sistemik inflamasyon, koagülasyon ve bozulmuş fibrinolizin meydana geldiği bir tablodur. Sepsis fizyopatolojisinde, patojenler ve inflamatuvar yanıt yer almaktadır (Stearns-Kurosawa, Osuchowski, Valentine, Kurosawa, & Remick, 2011).

Sepsisin gelişmesi için mikroorganizmanın kendisinin direk konakçıyı enfekte etmesi zorunlu değildir. Patojene ait herhangi bir sinyal ürünü veya ürettiği toksinlerin lokal ya da sistemik yayılması da sepsisi başlatabilir. Sepsis en sık Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin toksinlerine bağlı olarak gelişir. Az olmakla beraber virüsler, mantarlar ve protozoalara ikincil olarak da gelişebilir. Gram negatif bakterilerin daha sık etken olmaları nedeniyle, özellikle sepsis patogenezi ile yapılan çalışmalarda, Gram negatif bakteri toksinleri kullanılmaktadır (Bosmann & Ward, 2013).

Sepsiste inflamatuvar yanıt, özellikle, Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) ve NOD (nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon-domen protein)-benzeri reseptörler (NLR'ler) gibi doğal bağışıklık sistemindeki reseptörlerin, mikrobik enfeksiyonlar (özellikle bakteriyel enfeksiyonlar) tarafından tetiklenmesi ile ortaya çıkmaktadır (Barton, 2008). Enfeksiyonu tanıyan reseptörler, makrofajlar ve mast hücrelerini harekete geçirir ve bunların aracılık ettiği, kemokinler, sitokinler, vazoaktif aminler, eikozanoidler ve proteolitik kaskat mekanizmasını içeren çeşitli inflamatuvar medyatörlerin üretilmesine yol açar. Bu medyatörlerin ana ve en önemli etkisi, inflamatuvar bir eksudatı lokal olarak ortaya çıkarmaktır: Normalde kan damarlarıyla sınırlandırılan plazma proteinleri ve lökositler (esasen nötrofiller), postkapiller venüller vasıtasıyla, bölgedeki ekstravasküler enfekte ya da hasarlı dokulara erişebilmektedir. (Medzhitov, 2008)



Şekil 2.2 Patojenlerin hücre membranında tanınması sırasında gelişen mekanizmalar (Tuzlalı, 2014)

Hastalıklı doku bölgesine ulaştıklarında, nötrofiller ya patojenlerle doğrudan temas yoluyla ya da dokuda bulunan hücreler tarafından salgılanan sitokinlerin etkileri ile aktive olurlar. Nötrofiller, istilacı maddeleri, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türlerini (RNS), proteinaz 3, kateşin G ve elastazı içeren toksik içerikli granüllerini serbest bırakarak öldürmeye çalışırlar. Bu son derece güçlü moleküller mikrobiyal ve konakçı hedefleri arasında ayırım yapamaz, dolayısı ile konakçı dokularda meydana gelecek hasar kaçınılmazdır (Nathan, 2002).

İnflamasyonun; diyabet, bazı kanserler, ateroskleroz, osteoporoz, sarkoidoz ve tüberküloz gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde rol aldığı günümüzde bilinmektedir. İnflamasyonun koordineli olarak çalışan ortak etki mekanizmaları, canlı organizmada meydana gelen zararın etkilerini hafifletirken, açığa çıkan toksik moleküller, farklı dokularda doku hasarı ve oksidatif stres meydana gelmesine neden olabilir. Tüm bu biyolojik cevabın gelişmesi doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri tarafından düzenlenen birçok inflamatuvar medyatör ile kontrol edilmektedir (Libby, 2007).

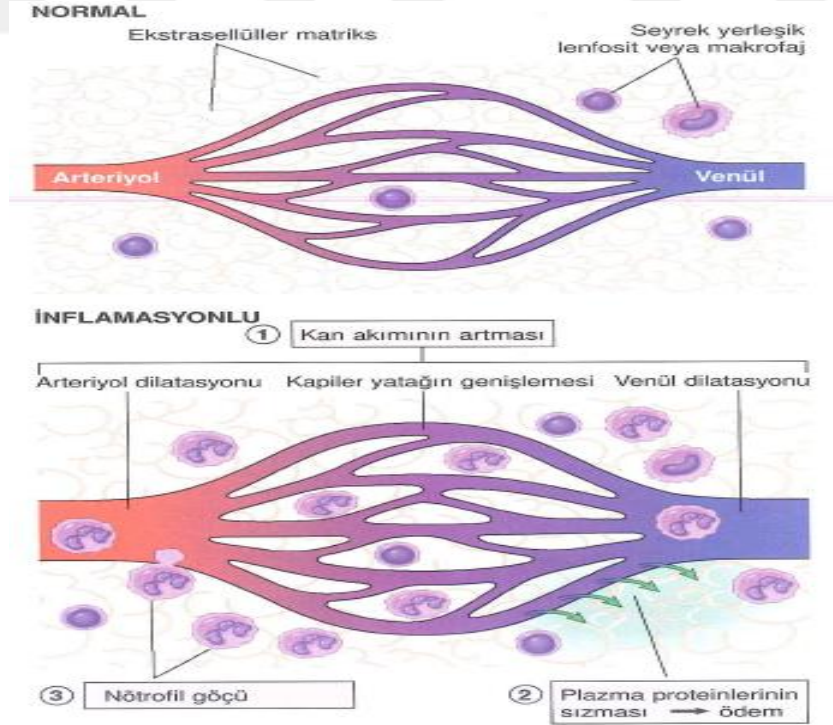
İnflamasyon için yapılan en iyi ve geçerli sınıflama, sürenin göz önüne alınarak yapıldığı sınıflamadır. Buna göre inflamasyon akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır (Tuzlalı, 2014).

2.1.1 Akut İnflamasyon

Lökosit ve plazma proteinlerinin, hızla inflamasyon bölgesinde toplanması akut inflamasyon sürecini başlatır (Tuzlalı, 2014).

Akut inflamasyon başlıca 2 bileşen içerir:

1. Vasküler Olaylar: Damarlarda meydana gelen vazodilatasyon, inflamasyon bölgesine kan akımının artmasını sağlarken, damar duvarındaki geçirgenlik artışı plazma proteinlerinin kan dolaşımından uzaklaşmalarına sebep olur. Endotel hücrelerinin aktiflenmesi ile birlikte, lökositler damar duvarlarından geçerek inflamasyon bölgesine göç ederler ve adezyon özellikleri artar. Vazodilatasyon ve kan akımı artışının meydana gelmesi, intravasküler hidrostatik basıncın artmasına sebep olur. Bu durum kapillerlerden sıvı filtrasyonunun artması ile sonuçlanır. Toplanan sıvı başlangıçta transuda özellikli olsa da, damar duvarı geçirgenliği arttığından ve bölgeye hücreler toplanmaya başladığından protein içerikli eksuda sıvıya dönüşür. Sonuçta intravasküler ozmotik basınç azalır ve interstisyel ozmotik basınç artarak ödeme neden olur (Kuralay & Çavdar, 2006; Ryan & Majno, 1977; Tuzlalı, 2014).



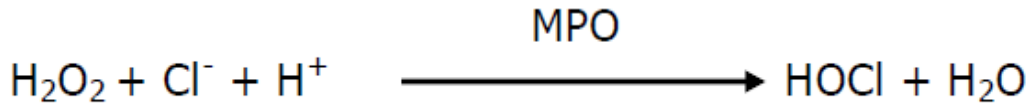
Şekil 2.3 Akut inflamasyonda meydana gelen lokal değişiklikler (Tuzlalı, 2014)

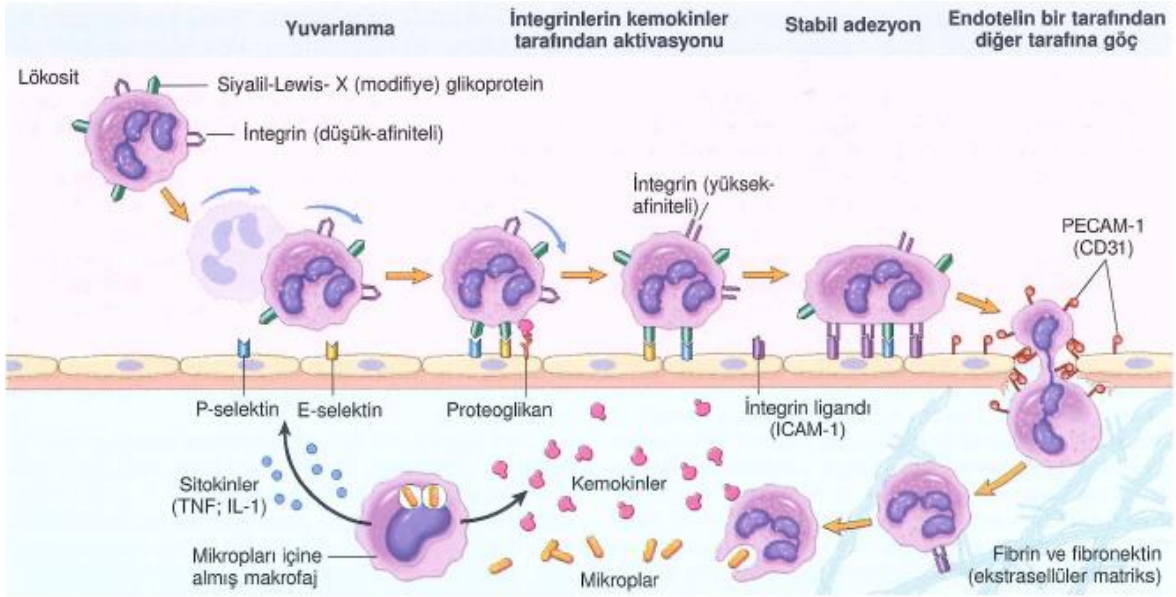
2. Hücresel olaylar: Vasküler değişikliklerin meydana gelmesi sonrası lökositler, damar dışına çıkarak enfeksiyonlu ya da hasarlı dokuların yer aldığı inflamasyonlu bölgede toplanırlar. Akut inflamasyonun oluşmasında rol alan başlıca lökositler, nötrofillerdir (Tuzlalı, 2014).

Bu hücrelerin inflamasyon bölgesinde toplanmaları çok aşamalı süreçleri içermektedir. Süreç sırasıyla şu aşamaları içerir:

- a. Endotel adezyon molekülleri olan selektinler aracılığı ile nötrofiller öncelikle endotel yüzeyine gevşekçe yaklaşır ve yuvarlanırlar (migrasyon ve yuvarlanma).
- b. İkinci aşamada yine endotel adezyon molekülleri olan integrinler sayesinde endotele sıkıca tutunma (adezyon) işlemi gerçekleşir.
- c. Üçüncü aşamada nötrofiller endotel hücreleri arasındaki boşluklardan damar dışına göç ederler (transmigrasyon). Burada CD31 (trombosit endotel hücre adezyon molekülü-1/PECAM-1) adezyon molekülü görev alır.
- d. Endotel dışına göç eden nötrofiller, zararlı etkenleri fagositoz yolu ile ortadan kaldırmaya çalışırlar. Fagositoz işlemi 3 aşamada gerçekleşir; aktif nötrofil öncelikle zararlı etkeni tanır ve üzerine bağlar, zararlı etken nötrofil içerisine alınarak fagosit vakuolü içerisine hapsedilir ve myeloperoksidaz gibi enzimler ile parçalanarak ortadan kaldırılır (Ryan & Majno, 1977; Tuzlalı, 2014).

Nötrofillerin temel fonksiyonu, fagositoz ile mikroorganizmaları yok etmektir ve burada temel etken myeloperoksidaz (MPO) enzimidir. MPO, Cl^- iyonlarını kullanarak H_2O_2 'yi Hipokloroz aside (HOCl) dönüştürür. Oldukça reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitleyerek ortadan kaldırmaktadır (Klebanoff, 1999).





Şekil 2.4 Akut inflamasyonda lökositlerin davranış mekanizması (Tuzlalı, 2014)

Tüm bu vasküler ve hücrel olaylar, farklı kimyasal medyatörler tarafından gerçekleştirilir. Vasküler olayların ilk aşamasında yer alan vazodilatasyon prostaglandinler ve nitrik oksit kontrolünde meydana gelir. Lökositlerin aktif hale geçmesi kemokinler (örn: Interlökin-8) aracılığıyla gerçekleştirilir. İnflamasyonun sistemik etkilerinden ateş; IL-1, IL-6, TNF- α ve prostaglandinler aracılığı ile şekillenirken, ağrı gelişiminde prostaglandinler ve bradikininler rol oynamaktadır. Doku hasarının oluşmasında ise nötrofil ve makrofaj lizozomal enzimleri, oksijen metabolitleri ve nitrik oksit gibi birçok kimyasal medyatör görev alır (Nathan, 2002; Ryan & Majno, 1977; Tuzlalı, 2014).

Akut inflamatuvar yanıtın oluşmasına neden olan zararlı etkenlerin varlığının devam etmesi durumu veya iyileşme sürecinde meydana gelen herhangi bir aksaklık sonucunda doku iyileşmesi meydana gelmezse, akut inflamasyon kronik inflamasyona ilerler.

2.1.2 Kronik İnflamasyon

İnflamasyon, herhangi bir nedenle iyileştiremez duruma gelirse, akut inflamasyon kronik bir aşamaya dönüşür. Sürekli enfeksiyon durumu oluşması veya kronik hücrel yaralanma gibi, tetikleyici uyarının yok edilmesinin başarısız olduğu durumlarda, haftalarca ve aylarca devam eden kronik inflamasyon gelişir. Kronik inflamatuvar durumlarda, konakçıya verilen hasar, patojenler gibi yabancı istilacıların değil, konakçının kendisinin oluşturduğu inflamatuvar yanıt tarafından meydana gelir (Ahmed, 2011).

Akut inflamasyondan farklı olarak kronik inflamasyonda aşağıdaki mekanizmalar meydana gelir:

1. Akut inflamasyonda başlangıçta nötrofilik lökosit infiltrasyonu mevcuttur. Bunu 24 ve 48 saat sonra monositik hücrelerin hâkimiyeti takip eder. Buna karşılık kronik inflamasyonda makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri gibi tek çekirdekli hücrelerin varlığı mevcuttur.
2. İnflamasyonun meydana geldiği dokuda bulunan inflamatuvar hücrelerin salgıladıkları ürünler doku yıkımının gerçekleşmesine sebep olur.
3. Yeni damar yapılanması (anjyogenez) ve fibrozisin meydana geldiği doku onarımı mevcuttur (Tuzlalı, 2014).

Modern tıp çağındaki kronik inflamasyonun önemi, ateroskleroz, obezite, Tip II Diabetes Mellitus, astım, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit ve kanser gibi birçok hastalıkla ilişkili olması nedeniyle göz ardı edilemez hale gelmiştir (Ahmed, 2011).

2.1.3 İnflamatuvar Sitokinler

İnflamatuvar mekanizmanın oluşumunda, çok çeşitli kimyasal medyatörler görev almaktadır. Bunların içinde önemli bir kısmı oluşturan sitokinler, hücreler tarafından salgılanan küçük proteinlerdir (8-26 kDa) ve hücreler arasındaki etkileşimler ve iletilişimler üzerinde spesifik etkilere sahiptirler (Zhang & An, 2007).

Tablo 2.1 Başlıca İnflamatuvar Medyatörler ve Etkileri (Tuzlalı, 2014)

Medyatör	Kaynaklar	Etkileri
Hücrelerden Kaynaklanan		
Histamin	Mast hücreleri, bazofiller, trombositler	Vazodilatasyon, damar geçirgenliğinin artması, endotel aktivasyonu
Serotonin	Trombositler	Vazokonstriksiyon
Prostaglandinler	Mast hücreleri, lökositler	Vazodilatasyon, ağrı, ateş
Lökotrienler	Mast hücreleri, lökositler	Damar geçirgenliğinin artması, kemotaksi, lökosit adhezyonu ve aktivasyonu
Trombositleri aktive eden faktör	Mast hücreleri, lökositler	Vazodilatasyon, damar geçirgenliğinin artması, kemotaksi, lökosit adhezyonu, degranülasyon, oksidatif patlama
Reaktif oksijen türevleri	Lökositler	Mikropların öldürülmesi, doku hasarı
Nitrik oksit	Endotel, makrofajlar	Damarlardaki düz kasların gevşemesi, mikropların öldürülmesi
Sitokinler (TNF, IL-1, IL-6)	Makrofajlar, endotel hücreleri, mast hücreleri	Lokal: endotel aktivasyonu (adhezyon moleküllerinin ekspresyonu). Sistemik: ateş, metabolik anormallikler,

		hipotansiyon
Kemokinler	Lökositler, aktive makrofajlar	Kemotaksi, lökosit aktivasyonu
Plazma proteinlerinden kaynaklanan		
Kompleman	Plazma (karaciğerde üretilir)	Lökosit kemotaksisi ve aktivasyonu, hedefin doğrudan öldürülmesi (MAC, membran atak kompleksi), vazodilatasyon (mast hücresi stimülasyonu)
Kininler	Plazma (karaciğerde üretilir)	Damar geçirgenliğinde artma, düz kasların kasılması, vazodilatasyon, ağrı
Proteazlar pıhtılaşma sırasında aktive olur	Plazma (karaciğerde üretilir)	Endotel aktivasyonu, lökositlerin toplanması

Sitokin genel bir isimdir; diğer isimler arasında lenfokin (lenfositler tarafından üretilen sitokinler), monokin (monosit tarafından üretilen sitokinler), kemokin (kemotaktik faaliyet gösteren sitokinler) ve interlökin (bir lökosit tarafından üretilen ve diğer lökositler üzerine etki yapan sitokinler-IL) bulunur. Sitokinler, kendilerini salgılayan hücrelere (otokrin eylem), yakındaki hücrelere (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücrelere (endokrin eylem) etki edebilirler. Sitokinler birçok hücre nüfusu tarafından üretilir, ancak baskın üreticiler yardımcı T hücreleri (T- Helper, TH) ve makrofajlardır (Zhang & An, 2007).

Sitokinler zararlı etkenlere karşı ortaya çıkan en erken bağışıklık ve inflamasyon mekanizmalarında ve mikroplara karşı daha geç gelişen spesifik bağışıklık reaksiyonlarında görev alırlar. Sitokinler, görev aldıkları reaksiyonlara göre, pro- ve anti-inflamatuar sitokinler olmak üzere ikiye ayrılırlar (Tuzlalı, 2014; Zhang & An, 2007).

Tablo 2.2 Bazı önemli sitokinler ve birincil etkileri (Zhang & An, 2007).

Sitokinler	Birincil kaynakları	Birincil Aktiviteleri
IL-1 α ve 1 β	Makrofajlar ve diğer antijen sunan hücreler(APC)	APC ve T hücrelerinin uyarılması, inflamasyon, ateş, akut faz cevabı, hematopoez
IL-2	Aktive T-yardımcı 1 (T _H 1) Hücreler, doğal katil hücreler (NK)	B hücrelerinin proliferasyonu, aktive T ve NK hücre fonksiyonları
IL-3	Aktive T hücreleri	Hematopoetik progenitor hücrelerin büyümesi
IL-4	Aktive T hücreleri	B hücre proliferasyonu, eozinofil ve mast hücreleri, büyüme ve fonksiyonları, monokin üretim inhibisyonu

IL-5	T _H 2 ve mast hücreleri	Eozinofil büyüme ve fonksiyonu
IL-6	Aktive T _H 2 hücreleri, APC ve diğer somatik hücreler	Akut faz yanıtı, trombopoez, B hücre çoğalması, T hücreleri üzerinde IL-1 ve TNF ile sinerjistik
IL-7	Timik ve kemik iliği stromal hücreleri	T ve B lenfopoezisi
IL-8	Makrofajlar ve somatik hücreler	Nötrofiller ve T hücreleri için kemoatraktan
IL-9	T hücreleri	Hematopoetik ve timopoetik etkileri
IL-10	Aktive T _H 2 hücreleri, CD8+ T ve B hücreleri, Makrofajlar	Sitokin üretimi inhibisyonu, B hücre proliferasyonu ve antikor üretimi, hücrel bağışıklığın baskılanması, mast hücrelerin büyümesi
IL-11	Atromal hücreler	Sinerjistik hematopoetik ve trombopoetik etkiler
IL-12	B hücreleri, makrofajlar	NK hücrelerinin proliferasyonu, İnterferon (IFN) üretimi, Hücre-aracılı bağışıklık
IL-13	T _H 2 ve hücreleri	IL-4 benzeri aktiviteler
IL-18	Makrofajlar	T ve NK hücrelerinden IFN üretimi
IFN- α ve β	Makrofajlar, nötrofiller, bazı somatik hücreler	Antiviral etkiler, makrofaj ve NK hücre aktivasyonları
IFN- γ	Aktive T _H 1 ve NK hücreleri	Nötrofil, makrofaj ve NK hücreleri aktivasyonu, hücre-aracılı bağışıklık, antiviral etkiler
TNF- α	Makrofajlar, mast ve NK hücreleri, duyu nöronları	Hücre ölümü, inflamasyon, ağrı
TGF- β	T hücreleri, monositler	Kemotaksi, IL-1 sentezi, IgA sentezi, proliferasyon inhibisyonu
TNF- β	T _H 1 hücreleri	Fagositoz, NO üretimi, hücre ölümü

2.1.3.1 Pro-inflamatuar Sitokinler

Pro-inflamatuar sitokinler ağırlıklı olarak aktive makrofajlar tarafından üretilir ve inflamatuvar reaksiyonların başlatılmasında, şiddetinin ve süresinin düzenlenmesinde görev alırlar. IL-1 β , IL-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)- α gibi bazı proinflamatuvar sitokinlerin patolojik ağrı sürecinde yer aldığına dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır (Zhang & An, 2007). Akut inflamasyonda rol alan başlıca etkin pro-inflamatuar sitokinler; IL-1, IL-6 ve TNF- α dir.

IL-1, öncelikle monositler ve makrofajlar olmak üzere, hücre yaralanması, enfeksiyon, zararlı etken istilası ve inflamasyon sırasında fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi bağışıklık sisteminde yer almayan hücreler tarafından da salınır (Zhang & An, 2007). IL-1 α ve β , için cDNA'lar 1984'de klonlanmıştır. İkisi de insan kromozomunun 2. lokasyonunda bulunan iki farklı gen tarafından kodlanmıştır. Boyutları, hücre ile ilişkili moleküller için 22-31 kDa ve salgılanmış molekül için 17,5 kDa'dır. IL-1 β 'nin, özellikle Lipopolisakkarit kaynaklı inflamasyon ve ağrıda, TNF- α ile birlikte başlıca sorumlu sitokin olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (Watkins, vd., 1994). Hem IL-1 α hem de IL-1 β , hipotalamusun vasküler endotel hücrelerini uyararak, prostaglandin E2 sentezini artırır ve ateşi tetikler. Ayrıca T hücre proliferasyonunu da uyarabilir (Feghali & Wright, 1997; Warren, 1990).

IL-6'nın en önemli üretim yerleri mononükleer fagositik hücrelerdir. IL-6 aynı zamanda fibroblastlar, endotel hücreleri, B ve T lenfositler, hepatositler, keratinositler, glial hücreler ve kemik iliği stroma hücreleri tarafından da sentezlenir. Akut inflamasyonun başında, IL-6 akut faz yanıtına aracılık eder. Pro-inflamatuar bir sitokin olarak aktivitesi sürdüğünde akut inflamasyon, immün yanıtları içeren kronik inflamasyona dönüşür. Karaciğer tarafından akut faz protein sentezinin uyarılmasını sağlayan IL-6 ayrıca olgun B hücreleri için bir büyüme faktörüdür ve bu bağışıklık sistemi hücrelerinin antikor üreten plazma hücrelerine dönüşümlerini indükler. Sistemik juvenil idiyopatik artrit, Tip I Diabetes Mellitus, ankilozan spondilit, Sedef ve Crohn hastalığı, romatizmal artrit de dâhil olmak üzere bazı inflamatuvar hastalıklarda dolaşımdaki IL-6 seviyeleri yüksektir (Feghali & Wright, 1997; Gabay, 2006; Zhang & An, 2007).

Aynı zamanda kaşektin olarak da bilinen Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), inflamasyon oluşumunda önemli rol oynayan bir diğer pro-inflamatuar sitokindir. Öncelikli olarak T lenfositler ve makrofajlar tarafından sentezlenmektedir. Sekretuar formu 17 kDa, membran formu ise 26 kDa olan bir sitokindir (Kriegler, Perez, DeFay, Albert, & Lu, 1988). TNF, 2 hücre yüzeyi reseptörü, TNFR1 ve TNFR2 vasıtasıyla, apoptotik yolları düzenleyen, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve stresle aktive protein kinazların (SAPK'ları) aktivasyonu ile inflamasyonu düzenleyen çeşitli sinyal yolları üzerinde hareket eder (Zhang & An, 2007). TNF- α ve IL-1 birçok inflamatuvar özellikleri paylaşmaktadır. TNF- α , IL-1 gibi, doğrudan hipotalamusun vasküler endotel hücreleri tarafından prostaglandin E2 sentezinin uyarılması yoluyla ya da dolaylı olarak IL-1'in serbest bırakılması ile ateşe neden olabilir. TNF- α , IL-6 ve IL-1 gibi, karaciğer tarafından akut faz yanıt proteinlerinin üretimini indüklemektedir (Feghali & Wright, 1997; Watkins et al., 1994; Zhang & An, 2007).

Sepsis sırasında, gram negatif bakterilerden salınan lipopolisakkaritler, makrofajlar tarafından TNF- α 'nın (ve ardından IL-1 ve IL-6'nın) yaygın üretimini tetikler. TNF- α 'nın sistemik salınımının, septik şokun karakterize ettiği ateş ve hipotansiyondan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, TNF- α 'nın bazı kanser ve enfeksiyonlarda ortaya çıkan kaşeksiden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Beutler & Cerami, 1988; Feghali & Wright, 1997).

2.1.3.2 Anti-inflamatuar sitokinler

Anti-inflamatuar sitokinler, pro-inflamatuar sitokinlerin aktivite ve etkilerini kontrol eden bir dizi immün düzenleyici moleküllerdir. Başlıca anti-inflamatuar sitokinler, IL-1 reseptör antagonisti, IL-4, IL-10, IL-11 ve IL-13'ü içerir. IL-1, TNF- α ve IL-18 için spesifik sitokin reseptörleri de pro-inflamatuar sitokinler için inhibitörler olarak işlev görür (Zhang & An, 2007).

Tüm anti-inflamatuar sitokinler arasında, IL-10, aktive makrofajlar tarafından salgılanan TNF- α , IL-6 ve IL-1 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu bastırarak, güçlü inflamasyon önleyici özelliklere sahip bir sitokindir. Aktive edilmiş T hücreleri tarafından IFN- γ üretimini inhibe ettiği için, IL-10'a B hücresi türevi T hücresi büyüme faktörü ve sitokin sentezi engelleyici faktör (CSIF) ismi de verilmiştir. İnsan IL-10'u için cDNA, 1990'da klonlandı ve 18 kDa'lık bir protein olduğu bulundu. IL-10, CD4 + T hücreleri, aktive CD8 + T hücreleri ve aktive B hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir (W. F. Chen & Zlotnik, 1991; Feghali & Wright, 1997; Zhang & An, 2007).

IL-10, endojen anti-sitokinlerin üretimlerini indükleyebilir ve pro-inflamatuar sitokin reseptörlerinin üretimlerini baskılayabilir. Dolayısıyla, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini ve işlevini, yüksek düzeylerde zıt şekilde regüle etmektedir (Zhang & An, 2007). Etkileri arasında, antijen spesifik T hücre proliferasyonunun azaltılması, nitrik oksit ve prostaglandin sentezinin baskılanması, IL-2 ile indüklenen IFN- γ üretiminin ve monositlerde IL-4 ve IFN- γ ile indüklenen Majör doku-uygunluğu bileşeni (MHC) sınıf II proteinlerin ekspresyonlarının inhibisyonu yer almaktadır (de Waal Malefyt, Yssel, Roncarolo, Spits, & de Vries, 1992; Feghali & Wright, 1997).

T hücresi kaynaklı, B hücresi büyüme faktörü olarak adlandırılan IL-4 önemli antiinflamatuar sitokinlerden biridir. Esas kaynak hücreleri tip 2 yardımcı T lenfosit (Th2) hücreleridir. Ayrıca makrofajlar, monositler, mast hücreleri, bazofiller, fibroblast ve endotel hücrelerinden de salınımları yapılmaktadır. IL-4, TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuar sitokinlerin ve monositler tarafından salgılanan (monokin) parçalayıcı enzimlerin üretimini azaltır. IL-1 β sentezini, özellikle IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) uyararak azaltabilir. (Abbas AK, Lichtman AH, & JS., 2000; Özbal, 2000).

12-17 kDa'lık bir protein olan IL-13, IL-10 gibi, lipopolisakkarit benzeri etkenler sonrası insan periferel kan monositleri tarafından salgılanan IL-1 β , TNF- α , IL-8 ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ederek anti-inflamatuar etkinlikler sergilemektedir. IL-13, hücrel kaynağı Th2 hücreleri olup, birçok özellikleri IL-4 ile ortaktır (Feghali & Wright, 1997; Gour & Wills-Karp, 2015).

2.2 Karaciğerin İnflamasyondaki Rolü

Karaciğer, metabolik aktiviteler, besleyici madde depolanması ve detoksifikasyon görevlerinin yanısıra, akut faz proteinleri, kompleman bileşenleri, sitokinler ve kemokinlerin üretiminden sorumlu olan, immünolojik açıdan fonksiyonel bir organdır. Sağlıklı bireylerde karaciğer devamlı olarak inflamasyon yaratma potansiyeline sahip besinler ve bakteri ürünleri ile bombardımana tutulur. Bu moleküller, aynı zamanda oluşacak tehlikeye karşı cevap vermeye hazır olan hepatik bağışıklık sistemi tarafından tolere edilebilir olmalıdır (Nemeth, Baird, & O'Farrelly, 2009; Robinson, Harmon, & O'Farrelly, 2016).

Böyle tehlikeli uyarınları yok etmek ve inflamasyonu gidermekte meydana gelen bir aksaklık; kronik enfeksiyon, fibrozis, siroz, karaciğer yetmezliği ve hatta karaciğer kanserine ilerleyebilen patolojiler ile sonuçlanır.

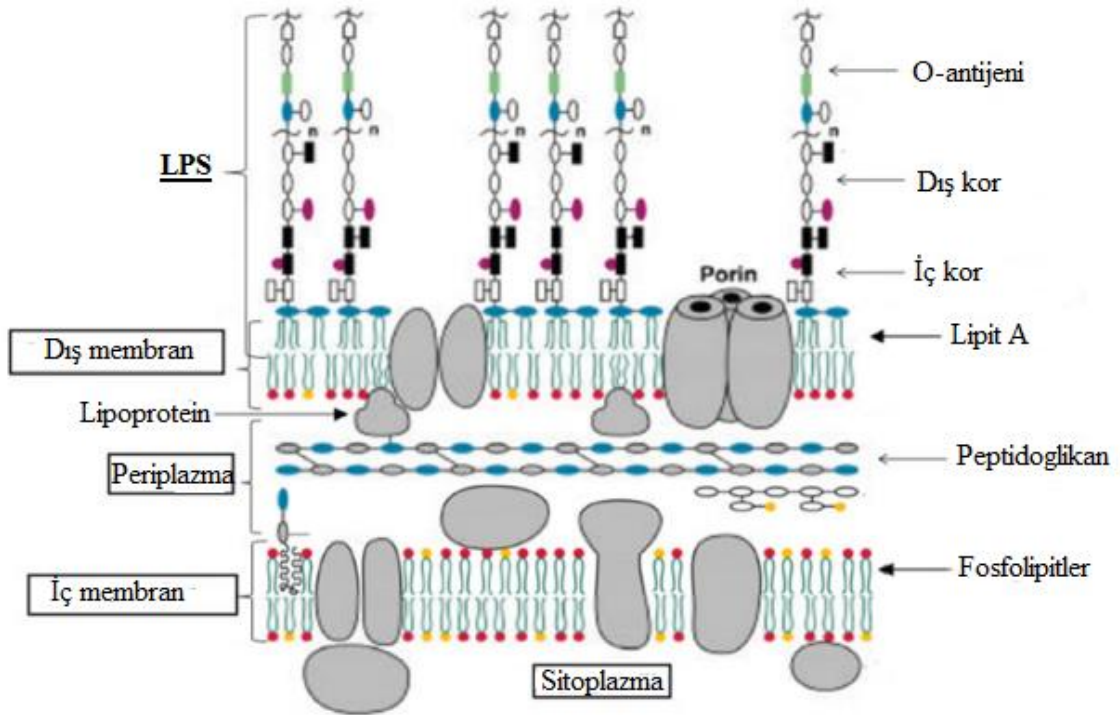
Karaciğerde, homeostatik inflamatuvar süreçler; hemodinamik değişiklikler, kılcal geçirgenlik, lökositlerin dokulara migrasyonu ve inflamatuvar mediatörlerin salgılanması gibi mekanizmaları içermektedir (Robinson, 2016).

Karaciğerin anahtar sistemik bir fonksiyonu, serum proteini üreticisi olmasıdır. Akut inflamasyonda ortaya çıkan proinflamatuvar sitokinler IL-1 ve IL-6, karaciğerden akut faz proteinlerinin salgılanmasını indükler (Tuzlalı, 2014). Hepatositler tarafından üretilen akut faz proteinleri doğrudan efektör fonksiyonuna sahiptir ve patojen temizlemeyi teşvik eden inflamasyonun sistemik etkilerinden sorumludur. Akut faz proteinleri, vücutta; kanda lökosit artışı, ateş, davranış değişikliğine neden olan beyindeki değişiklikler ve ilk inflamasyon bölgesine kitlesel immün hücre infiltrasyonu dahil olmak üzere bir dizi mekanizmaya neden olur. Aynı zamanda akut faz yanıt, inflamasyonun aşırı yanıtını engelleyici yönde bir takım mekanizmaların oluşumunu da içermektedir. Bu mekanizmalar; α 2-makroglobin gibi proteaz inhibitör proteinlerin nötrofil fonksiyonlarını inhibe etmesini, C-reaktif protein (CRP) ve Kupffer hücrelerinden TNF üretiminin inhibisyonu gibi prosesleri içerir (Robinson, 2016; (Moshage, 1997).

2.3 Lipopolisakkarit (LPS)

Bakteriyel endotoksinler (lipopolisakkarit, LPS), gram negatif bakterilerin dış zarının işlevsel bütünlüğü için gerekli olan yapısal olarak korunmuş amfifillerdir. Bu endotoksinler, pikomolar düzeylerde de olsa, insanlarda doğal bağışıklık sistemini tetikleyecek inflamasyona sebep olabilirler (Faraj, McLaughlin, & Erridge, 2017).

LPS'ler genel olarak üç büyük yapısal alan içeren ortak bir mimari paylaşır; iyi korunmuş bir lipid-A alanı, orta derecede korunmuş bir çekirdek oligosakkarit bölgesi ve çoğu organizmada oldukça değişken bir O-polisakkarit bölgesi.



Şekil 2.5 Gram negatif bakterilerin iç ve dış membran yapısı ve LPS lokalizasyonu (Raetz & Whitfield, 2002)

Lipopolisakkarit (LPS), iki majör fonksiyonu gerçekleştirmektedir. Birincisi, koruyucu role sahip olması; gram negatif bakteriler için zorlu çevresel şartlara ve stres faktörlerine karşı bariyer görevi görmesidir. İkincisi ise, LPS gram negatif bakterilerin aynı zamanda endotoksinidir ve memeli hücrelerde patojen olarak davranmalarını sağlar (Steimle, Autenrieth, & Frick, 2016).

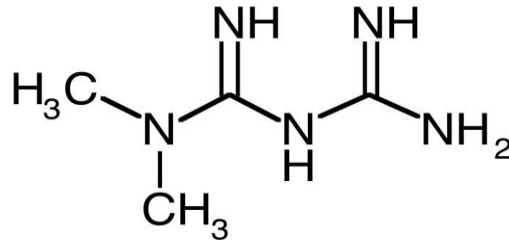
LPS'nin endotoksisitesi kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Yapısındaki polisakkarit kısım en dış yüzde bulunur. O-antijeni olarak adlandırılan halkadan oluşur ve endotoksinin spesifikliğinden sorumludur.

Diğer bölge olan kor zincir kısmı ise Gram negatif bakterilerde genel yapı itibariyle aynıdır. Fosfolipit yapıdaki Lipit A bölgesi, toksisitenin oluşmasını sağlayan ve inflamatuvar yanıtı neden olan esas yapıdır (Raetz & Whitfield, 2002).

LPS organizmada öncelikle bir plazma proteini olan lipid-A bağlayıcı protein (LBP) ile bağlanarak bir kompleks oluşturur. Kompleks daha sonra monositlerde, monosit farklılaşma antijeni olan CD14'e bağlanarak inflamatuvar cevabı başlatır. LPS; monosit, lenfosit ve özellikle makrofajların zarında bulunan TLR4 sinyal reseptörü ve yardımcı proteini MD-2 uyarılmasını sağlayarak immün yanıtın başlamasına öncülük eder. Bu reseptörlerin uyarılması sonrası, hücre içerisindeki bir dizi sinyal mekanizmayı başlatan NF-kB ve Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) aktive edilir. Bunun sonucunda TNF- α , IL-1 β , IL-8 ve IL-6 gibi birçok proinflamatuvar sitokin ve uyarılabilen nitrik oksit sentazın (iNOS) ekspresyonunda bir artış meydana gelir. Etkenin yok edilmesi için aktiflenen bu inflamatuvar yanıtın sonrasında, iNOS aracılığıyla oluşan nitrik oksit (NO), siklooksigenaz-2 (COX-2) enzim etkisiyle oluşan prostaglandinler ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi, organizmada toksik etkiler oluşturabilecek ürünler açığa çıkar. Ayrıca T ve B lenfositlerin de uyarılmasına sebep olan LPS, antikor üretimini de uyarır. Serum proteazlarının, kompleman sistem elemanlarının ve fagositlerin aktifleşmelerine de neden olmaktadır (Gnauck, Lentle, & Kruger, 2016; Raetz & Whitfield, 2002).

2.4 Metformin

Metformin (1,1-dimetilbiguanid), molekül ağırlığı 129,167 g/mol olan biguanid türevi oral antidiyabetiktir. Günümüzde özellikle Tip II Diabetes Mellitus hastalığında dünya çapında kullanılmaktadır. Metformin ve diğer biguanidler, keçisakalı bitkisi olarak bilinen French Lilac Galega Officinalis'den türetilmiştir. Oral hipoglisemik ajanlar olarak yararları 1950'lerde ortaya çıkarılmış olup, 1950'lerin sonlarında piyasaya sürülmüştür (Saisho, 2015).



Şekil 2.6 Metforminin yapısı (Saisho, 2015)

Metformin, antihiperlipidemik bir madde olarak kabul edilir çünkü belirgin hipoglisemiye neden olmadan Tip II Diabetes Mellitus'daki kan şekeri konsantrasyonu artışı düşürür. Metformin ayrıca insülin direncinde ve plazmada açlık insülin düzeyinde belirgin azalmaya neden olmaktadır (Viollet, vd., 2012). Metforminin glukoz düşürücü etkisi için bazı mekanizmalar öne sürülmüştür. Esas olarak hepatik glukoneogenezin baskılanması yoluyla plazma glukoz seviyesini düşürmektedir (Saisho, 2015; Stumvoll, Nurjhan, Perriello, Dailey, & Gerich, 1995).

Metforminin insülin duyarlılığında yaptığı iyileşme, insülin reseptörü ekspresyonu artışı ve tirozin kinaz aktivitesi üzerindeki olumlu etkilerinden kaynaklanabilir (Viollet, vd., 2012). Metforminin akut olarak glukagon benzeri peptid 1'in (GLP-1) plazma seviyelerini arttırdığını ve peroksizom proliferatör-aktive reseptörüne (PPAR)- α bağlı olan bir mekanizma yoluyla adacık inkretin reseptör geni ekspresyonunu indükleyerek bu etkileri oluşturduğu gösterilmiştir (Maida, Lamont, Cao, & Drucker, 2011). Metforminin aynı zamanda, hücrede metabolik stres altında aktive edilen hücrel bir enerji sensörü olan AMP aktive protein kinaz (AMPK) ile de etki gösterdiği düşünülmektedir. Metformin AMPK'yı aktive ederek, hepatik glukoz üretimini inhibe eder, insülin duyarlılığını ve kaslara glukoz girişini artırır, yağ asidi oksidasyonunu indükler (Saisho, 2015).

Metforminin antidiyabetik etkilerinin yanı sıra, aynı zamanda antiinflamatuvar etkilerinin de olduğu günümüzde yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmalar, AMPK'nın aktivasyonu ile NF- κ B'nin inhibisyonunun metforminin antiinflamatuvar etkilerini ortaya çıkardığını göstermektedir (Saisho, 2015). Sığır aort endotel hücrelerinde yapılan bir *in vitro* çalışmada, metforminin NO sentezini AMPK'nın aktivasyonu yoluyla arttırdığı, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H) oksidazın ve mitokondriyal solunum zincirinin inhibisyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azalttığı bildirilmiştir (Davis, Xie, Viollet, & Zou, 2006); Ouslimani, vd., 2005).

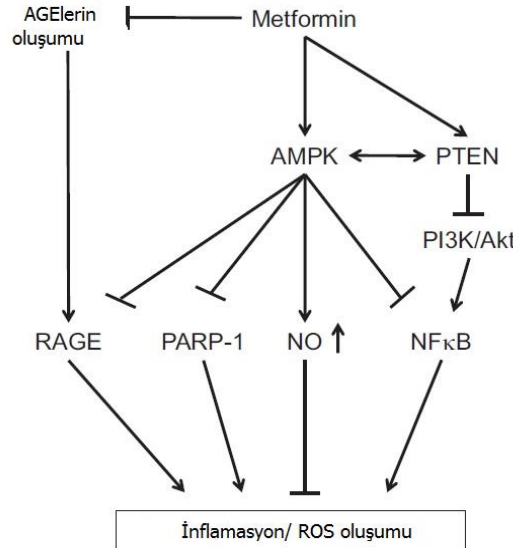
İnsan vasküler düz kas hücreleri ile yapılan bir başka *in vitro* çalışmada, metforminin AMPK'dan bağımsız olarak, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)-Akt yolağının blokajı ile, NF- κ B'nin inhibisyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Isoda, vd., 2006). Yine insan vasküler düz kas hücreleri ile yapılan bir başka *in vitro* çalışmada, bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN ve AMPK'nın, metforminin antiinflamatuvar etkinliğini birlikte regüle ettikleri gösterilmiştir. PTEN, PI3K'yı antagonize ederek, hücre yaşamı, büyümesi ve proliferasyonu süreçlerinde yer alır (Kim & Choi, 2012).

B hücreli lenfoma-6 protein (Bcl-6), inflamasyon sonrasında monositleri vasküler endotel hücrelerine yardım etmek üzere endotele taşıyan vasküler

hücre adhezyon molekülü-1 ve monosit kemotaktik protein-1 ve -3 gibi inflamatuvar mediyatörler için baskılayıcı olarak görev alan bir proteindir. Poly [ADP-riboz] polimeraz 1 (PARP-1) enzimi ise, kısmen Bcl-6 ekspresyonunu baskılamak için Bcl-6 intronuna bağlanması yoluyla proinflamatuvar özellik taşımaktadır. İnsan umbilikal vasküler endotelial hücreler ile yapılan *in vitro* çalışmada, metformin tedavisi ile AMPK aktivasyonunun, Bcl-6 intron 1'den PARP-1 enziminin ayrışmasını ile Bcl-6 ekspresyonunu arttırdığını ve inflamatuvar medyatörlerin ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirilmiştir (Gongol, vd., 2013).

Hiperглиsemi, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumunu artırır ve metformin, kendisi ve metilglüksal gibi AGE'lerin dikarbonil öncül molekülleri arasındaki bir kimyasal reaksiyon yoluyla bu moleküllerin seviyelerini düşürmektedir. AGE'ler organizma için tehlikelidir çünkü bu moleküller inflamasyon ve ROS oluşumunu tetikler (Saisho, 2015). Yakın tarihli bir çalışmada, metformin, AMPK aktivasyonu sonrası, AGE reseptörlerinin ekspresyonunun baskılanmasıyla ROS üretimini azaltarak, tübüler hücrelerde AGE'lerin neden olduğu apoptozu, inflamatuvar ve fibrotik reaksiyonları inhibe ettiğini göstermiştir (Ishibashi, Matsui, Takeuchi, & Yamagishi, 2012).

Tüm bu antiinflamatuvar mekanizmaların yanı sıra, metformin, makrofajlardaki NF- κ B aktivasyonunun inhibe edilmesi yoluyla NO, prostaglandin E2 ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) üretimini azaltmaktadır (Hyun, vd., 2013).



Şekil 2.7 Metformin'in antiinflamatuvar mekanizması (Saisho, 2015)

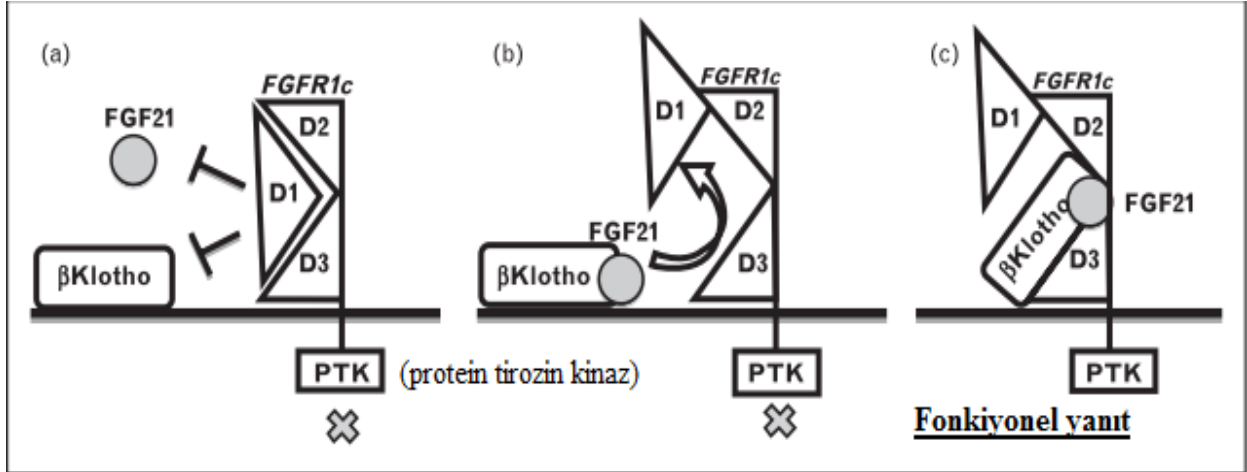
2.5 Fibroblast Büyüme Faktörü 21 (FGF21)

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler) küçük polipeptit büyüme faktörleridir ve hepsi ortak bazı yapısal özelliklere sahip olup çoğunlukla heparine bağlı olarak bulunurlar. Çoğu FGF, salgı için sinyal peptidleri içerir ve ekstrasellüler matriksin (ECM) heparan-benzeri glikozaminoglikanları (HLGAGler) üzerine bağlanabilecekleri hücre dışı ortamda salınırlar. FGF'ler direkt olarak hedef hücrelere etki edebilir veya ECM'nin sindirimi sonucunda bir FGF bağlayıcı protein olarak salgılanır ve etki gösterebilir. FGF'ler, HLGAG üzerindeki spesifik tirozin kinaz reseptörlerine bağlanırlar ve bu bağlanma, reseptör dimerizasyonu ve aktivasyonunu başlatır, daha sonra çeşitli sinyal iletim kaskatlarının aktivasyonu ile sonuçlanır. Bazı FGF'ler güçlü anjiyogenik faktörler olup çoğu embriyonik gelişim ve yara iyileşmesi gibi proseslerde önemli rol oynamaktadır. FGF sinyalizasyonu ayrıca tümör büyümesinde ve anjiyogeneizde rol oynamaktadır (Powers, McLeskey, & Wellstein, 2000).

İlk önce fare embriyolarında homoloji bazlı polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanan FGF21, hidrofobik bir N-terminus sinyal sekansı olan 210 aminoasitten oluşan bir salgı proteinidir. Fare FGF21'in aminoasit dizisi, insan FGF21'i ile yüksek oranda özdeştir. İnsan FGF21 aminoasit dizisi de 209 aminoasitten oluşmaktadır. Başlangıçta, FGF21 mRNA'sının karaciğerde ve daha düşük seviyelerde timusta eksprese edildiği rapor edilmiştir (Nishimura, Nakatake, Konishi, & Itoh, 2000). Son zamanlarda, FGF21'in yüksek oranda pankreasta, testiste ve daha düşük seviyelerde duodenum ve adipoz dokuda da eksprese edildiği bulunmuştur (Fon Tacer, vd., 2010)

FGF21'in ana üretim yeri karaciğerdir. Yapılan çalışmalar, nükleer reseptör peroksizom proliferatör-aktive reseptör alfa (PPAR α)'nın temel rolünü vurgulamış ve böylelikle FGF21'in karaciğerde bu reseptör üzerinden etkilerini gösterdiği kanıtlanmıştır (Inagaki, vd., 2007).

FGF21 hücre yüzeyindeki tirozin kinaz yapısındaki reseptörler aracılığı ile Beta klotho ile düzenlenmektedir. Beta klotho; karaciğer, pankreas, testis ve beyaz yağ dokusunda bulunur. Bu reseptörler FGF 21'in hücre yüzeyi aktivasyonunda etkilidir (Ding, vd., 2012). Hücre yüzeyine gelen FGF21 molekülü öncelikle Beta Klotho ile birleşir. Oluşan kompleks, FGF Reseptörü 1c (FGFR1c) üzerindeki inhibitör etkili D1 domeni uzaklaştırır. Daha sonra kompleks D2 ve D3 domenleri ile etkileşerek reseptör dimerizasyonu ve aktivasyonunu başlatır, daha sonra protein tirozin kinazın aktiflenmesiyle, çeşitli sinyal iletim kaskatlarının aktivasyonu fizyolojik etkileri meydana getirir (Yie, vd., 2012).

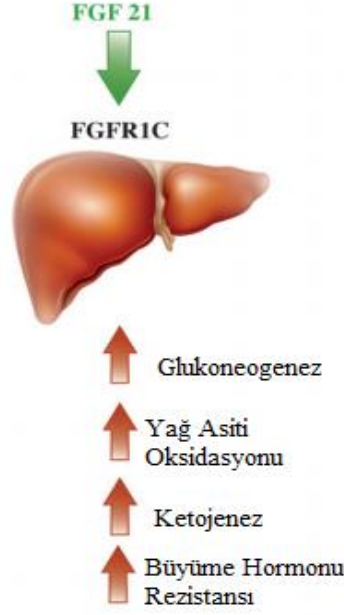


Şekil 2.8 FGF21 tarafından FGFR1c reseptörünün aktivasyonu (Cuevas-Ramos, Aguilar-Salinas, & Gomez-Perez, 2012)

Karaciğerdeki insan FGF21 geninin ekspresyonu, hem açlık hem de beslenme sinyalleri ile regüle edilir. Açlık sinyallerinde esas olarak, FGF21 geninin ekspresyonunu arttıran PPAR α ve glukagon-stimule protein kinaz A (PKA)'dır. Bir beslenme sinyali olan glukoz, karbohidrat yanıt element-bağlama proteini (ChREBP) aktivasyonu yoluyla yine karaciğerde FGF21 geni ekspresyonunu da uyarır. PPAR gama (PPAR γ) ve ChREBP ise, adipositlerdeki FGF21 geninin sentezlenmesini koordine eder ve termojenik yanıtı uyarır.

Açlık durumunda karaciğerden salgılanan FGF21, yağ asiti oksidasyonunu artırır ve bu mekanizma sonucu açığa çıkan ürünleri de keton cismi oluşumu için ketojeneze yönlendirir. FGF21'in bazı metabolik etkileri glukagonunkilere benzer olsa da, FGF21 glikojenolizi artırmaz. Bu nedenle, uzamış açlık durumlarında devreye girerek glukoneogenezi indükler (Cuevas-Ramos, Aguilar-Salmos & Gomez-Perez, 2012; Kharitonov, vd., 2007). Yine karaciğerde FGF21, Büyüme Hormonu (GH) etkilerinin majör medyatörü olan sinyal transkripsiyon faktör 5 (STAT5) konsantrasyonlarını düşürerek, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi bu hedef genlerin ekspresyonlarını azaltır. FGF21, aynı zamanda, IGF-1 bağlayıcı protein 1'in hepatik ekspresyonunu ve GH sinyalizasyonunu engelleyen sitokin sinyallemesi-2 yolağını uyarır. Bu veriler, açlığa adaptif cevabı indüklemedeki daha geniş rolünün parçası olarak büyümeyi inhibe etme konusunda FGF21'in merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (Inagaki, vd., 2008).

FGF21 beslenmeden sonra endokrin etkilere de sahiptir. Yüksek karbonhidratlı diyet alımı FGF21'in, özellikle beyaz adipoz doku hücrelerinden ekspresyonunu ve salınımını indükler. FGF21, plazma glukoz, trigliserit ve insülin düzeylerini azaltırken, aynı zamanda insülin duyarlılığını da arttırmaktadır (Cicione, Degirolamo, & Moschetta, 2012).



Şekil 2.9 FGF21'in karaciğerdeki metabolik etkileri (Cicione, Degirolamo, & Moschetta, 2012).

İlginçtir ki, FGF21 geni transkripsiyonu, beyaz yağ dokusunda beslenme sonrası indüklenirken, karaciğerde açlıkla indüklenir. Bu diferansiyel düzenleme, fizyolojik açıdan önemlidir ve Tip II Diabetes Mellitus, obezite ve metabolik sendrom gibi hastalıklar için, tedaviye yönelik farmakolojik çalışmaların bir hedefi olabilir (Cicione, Degirolamo, & Moschetta, 2012).

Son dönemlerde yapılan güncel çalışmalar, FGF21'in endokrin metabolik etkilerinin yanı sıra, inflamasyonda da rol aldığını göstermektedir. Farelere LPS uygulaması sonrası yaratılan inflamasyon ile yapılan bir çalışmada, akut faz yanıtı olduğu sırada, serumda FGF21 düzeylerinin ciddi oranda artmış olduğunu göstermiştir. Çalışmada aynı zamanda farelere dışarıdan rekombinant FGF21 uygulanmış olup, eksojen FGF21'in uygulanması, hayvanlara LPS'nin meydana getirdiği bakteriyel sepsisin toksik etkileri ve inflamasyon için, serumda yükselen endojen FGF21 ile koruyucu bir etki meydana getirdiği tespit edilmiştir. (Feingold, vd., 2012). Fareler ile yapılan başka bir çalışmada, farelerde yüksek yağlı diyet uygulaması ile inflamasyon yaratılmıştır. Çalışmada pankreatik FGF21 düzeyleri incelenmiş olup, açlıkta eksprese edilen düzeyden 3-4 kat fazla düzeyde obezitede ekspresyon olduğu tespit edilmiştir. FGF21 geni alınmış farelerde, pankreasta islet hücre hiperplazisinin meydana geldiği, fakat eksojen FGF21 uygulamasının bu durumu azalttığı ve pankreatik inflamasyonu engellediği düşünülmüştür (Singhal, vd., 2016).

LPS uygulanmış makrofaj hücreleri ile yapılan bir *in vitro* çalışmada, inflamasyon oluşturulan makrofaj hücrelerine rekombinant FGF21 uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda FGF21 uygulamasının, makrofajlardaki NF- κ B yolağının inhibe olması ile proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-6 düzeylerinin önemli derecede azaldığı görülmüştür (Yu, vd., 2016).

FGF21 ile yapılan çalışmalar genellikle *in vitro* olup, *in vivo* veriler azdır. Özellikle yapılan *in vivo* çalışmalarda da, FGF21 eksojen olarak uygulanmış olup, sistemik FGF21 düzeylerinin etkilerinin incelenmesi sınırlı olarak kalmıştır.

Tüm bu bilgilerin ışığında, ratlarda LPS ile indüklenen inflamasyonda, metformin ve FGF21'in etkilerini incelemeyi amaçladık. Metforminin olası koruyucu ya da tedavi edici etkilerini ortaya çıkarmayı ve FGF21 düzeyleri ile ilişkisini göstermeyi amaçladık.

3-GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 GEREÇLER

3.1.1 Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Bakımı

Deney prosedürü ve çalışmalara başlanmadan önce, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan, hayvan temini için onay alınmıştır(545/2016). KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş den temin edilen 44 adet *Sprague Dawley* türü 250-300 gr ağırlığa sahip erkek rat, her grupta 8 hayvan olacak şekilde 5 deney grubu ve 4 hayvan ön çalışma için olmak üzere uygun kafeslere ayrılarak, deney süresince 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık ışıklandırması olan, ısı ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemi (%45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deney sürecinde tüm ratlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart rat yemi ile beslenmiş ve çeşme suyu verilmiştir. Deney süresince hayvanlar günlük olarak kontrol edilerek genel morfolojik görünümleri (tüy dökülmesi, dışkılama bozuklukları) görsel olarak değerlendirilmiştir. Ratlara yem ve su kısıtlaması yapılmamıştır. Tüm cerrahi işlemler ve ötenazi, anestezi altında gerçekleştirilmiştir.

Gruplardaki ratlara 80 mg/kg ketamin (Ketalar®), 10 mg/kg Xylazine (Rhompun®) intramuskuler olarak verilerek, cerrahi işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Deney Gruplarının Belirlenmesi ve Deneysel İşlemler

4 adet rat, deneysel prosedürü değerlendirmek amacı ile kullanıldı. Bu ratlara 5 mg/kg LPS %0,9'luk NaCl içerisinde çözündürülerek intraperitoneal olarak uygulandı. 6 saat sonunda ratlar, diseksiyon ile intrakardiyak kanları alınarak öldürüldü ve uygun koşullarda serumları elde edildi. Serumlarından yapılan ölçümler sonucunda, yeterince karaciğer hasarı oluşmadığından, LPS uygulama süresi 6 saatten 24 saate çıkarıldı.

250-300 gr ağırlığındaki 8'er hayvan ile 5 adet deney grubu oluşturuldu. Deney gruplarındaki hayvanlara aşağıdaki tabloda yer alan işlemler uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Deney grupları ve gruplara göre uygulanan işlemler

Gruplar	Gruplara Göre Uygulanan İşlemler
Grup 1 (Kontrol)	Bu grup deney hayvanlarına %0,9'luk NaCl solüsyonu intraperitoneal olarak enjekte edildi ve 24. Saatte diseksiyon yapıldı.
Grup 2 (LPS)	Bu grup deney hayvanlarına % 0,9'luk NaCl içinde çözülerek hazırlanmış olan LPS enjeksiyonu intraperitoneal yolla yapıldı ve 24. saatte diseksiyon yapıldı.
Grup 3 (LPS öncesi metformin)	Bu grup deney hayvanlarına % 0,9'luk NaCl içinde çözülerek hazırlanmış olan 200 mg/kg metformin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Enjeksiyonu takiben bir saat sonra % 0,9'luk NaCl içinde çözülerek hazırlanmış olan LPS enjeksiyonu intraperitoneal yolla yapıldı. LPS verilmesinden 24 Saat sonra diseksiyon yapıldı.
Grup 4 (LPS ve 1.saatte metformin)	Bu grup deney hayvanlarına % 0,9'luk NaCl içinde çözülerek hazırlanmış olan LPS enjeksiyonu intraperitoneal yolla yapıldı. LPS enjeksiyonundan bir saat sonra % 0,9'luk NaCl içinde çözülerek hazırlanmış olan 200 mg/kg metformin intraperitoneal olarak enjekte edildi. LPS verilmesinden sonra 24. saatte diseksiyon yapıldı.
Grup 5 (LPS ve 3. Saatte metformin)	Bu grup deney hayvanlarına % 0,9'luk NaCl içinde çözülerek hazırlanmış olan LPS enjeksiyonu intraperitoneal yolla yapıldı. LPS enjeksiyonundan üç saat sonra % 0,9'luk NaCl içinde çözülerek hazırlanmış olan 200 mg/kg metformin intraperitoneal olarak enjekte edildi. LPS enjeksiyonu sonrası 24. saatte diseksiyon yapıldı.

3.1.3 Deneysel İşlemlerde Kullanılan Sarf Malzemeler

- 1 ml (insülin), 10 ml steril enjektör ve siyah iğne uçları
- 10 – 1000 µL hacim aralıklı pipetörler ve uçları (Nichiryo)
- 2,5 – 50 mL hacim aralıklı pipetörler ve uçları (Nichiryo)
- 3,3'-5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) (AL8615, Aldrich)
- Absolü etanol (Riedel de Haen)
- Bakır sülfat (CuSO₄, Merck)
- Bistüri ucu
- Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma)
- Dimetilsülfoksit (DMSO, D8418 Sigma)
- Doku blok kaseti (Isolab)
- Eldiven (Steril Ameliyat Eldiveni, M boy)
- Eppendorf tüp (1,5 ml)
- Ethylendiamine Tetraacetic Acid (EDTA) (SIE9884, Sigma)
- H₂O₂ (Merck)
- Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide (HETAB) (SIH5882, Sigma)
- Kurutma kağıdı, 40x40 cm (Isolab)
- Lipopolysaccharides from Escherichia coli0111:B4 (L2630, Sigma)
- Metformin, Hydrochloride An AMPK activator (1691, Biovision)
- N-N Dimetilformamid (DMF) (AL319937, Aldrich)

- Rat fibroblast growth factor 21 (FGF21) ELISA kit 96T (CSB-EL008627RA, Cusabio)
- Rat IL-10 ELISA KIT 96T (CSB-E04595r, Cusabio)
- Rat TNF- α ELISA kit 96T (CSB-E11987r, Cusabio)
- Serum fizyolojik (Polifarma)
- Sodyum Hidroksit (NaOH, Merck)
- Sodyum Potasyum Tartarat (Merck)
- Thiobarbituric Acid (TBA) (Sigma)

3.1.4 Deneysel İşlemlerde Kullanılan Cihazlar

- BioTek ELx50 mikro plate yıkayıcı
- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin Dondurucu, -80°C (Thermo, ULT 1386-5-V40)
- Disposable mikrotom bıçağı Low profil (Thermo Shandon, USA)
- Distile su cihazı
- Eppendorf EDOS elektronik pipetleyici (Eppendorf EDOS 5222)
- Etüv (Binder)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Mikroplatt okuyucu (Perkin Elmer 2030 Multilabel reader, Victor X3)
- Roche Cobas c501 otoanalizör cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- Santrifüj (Nüve NF800)
- Santrifüj, soğutmalı (Jouan MR22)
- Shaker (WiseMax)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)
- Su banyosu (Nüve BM402)
- Tüplü ısıtıcı

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Cerrahi İşlemler

Tüm cerrahi işlemler steril aletler kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar içerisindeki hayvanlara verilecek LPS ve metformin dozları, çeşitli literatür taraması sonucunda, ortalama dozlar seçilerek belirlenmiştir.

Gruplardaki hayvanlar, deneysel prosedür sonucunda, ketamin (80 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) intramuskuler anestezisi altında uygun separatör jelli tüplere intrakardiyak kanları alınarak öldürüldü. Kan örnekleri 3500 rpm'de 15 dakika (Jouan MR 22) santrifüj edildikten sonra, elde edilen serumların bir kısmı ELISA ölçümleri için ependorflara ayrılarak analizi yapılana kadar derin dondurucuda (-80°C, Jouan VX350 series Thermo

Electron) muhafaza edildi. Kalan taze serumlar biyokimyasal parametrelerin ölçümü için otoanalizörde çalıştırıldı.

Kanları alınan hayvanların, insizyon ile açılan batinlarından karaciğer dokuları alındı. Histolojik incelemeler için karaciğer örneklerinin bir kısmı %10'luk formaldehite kondu ve kalanı doku biyokimyası ölçümleri için saklandı.

3.2.2 Karaciğer Hasarı Belirteçleri

Karaciğer hücrelerinin olası fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla serum örneklerinde Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Alanin Aminotransferaz (ALT) enzim aktiviteleri belirlendi.

Alanin ve Aspartat aminotransferaz enzim aktiviteleri standardize edilmiş UV-fotometrik ölçüm prensibine dayanan Roche Cobas c501 otoanalizör cihazında ALT ve AST test kitiyle otomatize çalışılmıştır. Her iki testte de NADH'nın NAD⁺'e yükseltgenmesi sırasında NADH'nın azalan miktarının fotometrik ölçümü enzim aktiviteleriyle doğru orantılıdır.

3.2.3 Hücre Aktivasyonu ve İnflamasyonun Değerlendirilmesi

Çalışmamızda hücre aktivasyonu ve inflamasyonun değerlendirilmesinde myeloperoksidaz (MPO) enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Ölçüm Yöntemi :

Myeloperoksidaz aktivitesi, Suzuki ve arkadaşlarının belirlemiş olduğu, kinetik ölçüm yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlendi (Suzuki, Ota & Sasagawa, 1983). Yöntem asidik koşullar altında, H₂O₂ ile birlikte MPO enzimin, Tetrametilbenzidini (TMB) substrat olarak kullanarak, okside TMB oluşturması ve substrat düzeylerine bağlı değişen absorbansın 655 nm'de takip edilmesine dayanmaktadır.

- Karaciğer doku örnekleri, homojenizatör kullanılarak 1/10 oranında soğuk 50mM pH'sı 7,4 olan Fosfat tamponu ile homojenize edildi.
- Homojenatlardan 1 ml alınarak, 4 C° 'de 4650 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımları atıldı.
- Kalan pelletler, soğuk 50mM pH'sı 6,0 olan ve içersinde %0,5'lik HETAB ve 10mM EDTA içeren Fosfat tamponu ile tekrar homojenize edildi.

- Aşağıdaki kimyasallar ve hacimlerine göre tüm örnekler için numune ve bir adet kör tüpü hazırlandı.

Tablo 3.2 MPO yöntemi

MADDELER	KÖR	NUMUNE
pH 5,4 Fosfat tamponu	1000 µL	1000 µL
TMB (16mM DMF içinde çözülen)	200 µL	200 µL
Örnekler	-	40 µL
Distile su	700 µL	660 µL

- Tüm reaktifler eklendikten sonra, tüpler 2 dakika 37 C°'lik su banyosunda bekletildi.
- Ölçümden hemen önce tüplere 100 µL %0,06'lık H₂O₂ eklendi.
- 655 nm'de kör tüpüne karşı sıfırlandıktan sonra, 3 dakika boyunca absorbans artışları spektrofotometrede izlendi. Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$U/ml = \frac{\Delta A \times VT \times DF}{e \times VH \times \Delta t}$$

ΔA = Absorbans değişimi

VT = Küvet içerisindeki toplam hacim (ml)

DF = Dilüsyon faktörü

e = Ekstinksiyon katsayısı ($M^{-1}.cm^{-1}$)

VH = Homojenat hacmi (ml)

Δt = Reaksiyon süresi

- Homojenatların total proteinleri ölçüldü ve enzim aktiviteleri total proteinlerine oranlandı. Doku MPO sonuçları U/mg protein olarak verildi.

3.2.4 Oksidatif Stres Hasarının Belirlenmesi

Karaciğerde meydana gelen oksidatif hasarın belirlenmesi için Malondialdehit (MDA) ölçümü yapılmıştır.

MDA lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup, lipitlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde en çok kullanılan parametrelerden biri olarak kabul görür.

Doku homojenatlarında MDA düzeyi Ohkawa ve ark.'nın bildirdiği yöntemle ölçüldü (Ohkawa, Ohishi & Yagi, 1979). Bu yöntemle göre; MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur; bu kompleksin spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçümü gerçekleştirilir.

Standartların Hazırlanması:

1,1,3,3 tetrametoksiopropan (yoğunluk: 0,99 g/mL)' tan günlük stok standart (100 nmol/mL) hazırlandı ve farklı konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlamak için seri dilüsyon yapıldı.

Ölçüm Yöntemi:

- Karaciğer doku örnekleri, 1/10 oranında %1,15'lik pH 7,0 olan Potasyum Klorür (KCl) çözeltisi ile homojenize edildi.
- Örnekler homojenizasyon sonrası 4 C° soğutmalı santrifüjde 1000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant kısımları alındı.
- Aşağıdaki tabloda yer alan çözeltiler ve hacimlerde numune ve kör tüpleri hazırlandı.

Tablo 3.3 MDA yöntemi

MADDELER	KÖR	NUMUNE
% 8,1'lik Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)	200 µL	200 µL
%20'lik pH 3,5 Asetat tamponu	1500 µL	1500 µL
%0,8'lik pH 5,5-7 Tiyobarbitürik asit(TBA)	1500 µL	1500 µL
Distile su	800 µL	600 µL
Örnekler	-	200 µL

- Tüm tüpler 95 C°'de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresinin sonunda tüpler musluk suyu ile soğutuldu. 1500 x g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi.
- 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbanslar ölçüldü.

- Seri dilüsyon ile hazırlanan standartların (100–50–25–6,25–3,125–1,562–0 nmol/ml) absorbanları kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği üzerinden MDA konsantrasyonları nmol/ml olarak hesaplandı.
- Homojenatların total proteinleri ölçüldü ve örneklerin konsantrasyonları total proteinlerine oranlandı. Doku MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

3.2.5 İnflamatuar Belirteçlerin Ölçümü

3.2.5.1 Tümör Nekroz faktörü- α (TNF- α) Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum TNF- α düzeyleri Cusabio Rat TNF- α (CSB-E11987r) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü.

Kit Prensipleri:

Bu kit kantitatif sandviç enzim immunoassay tekniğini kullanır. TNF- α için spesifik antikor mikropalakaya kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler kuyucuklara pipetlenir ve eğer içerisinde TNF- α varsa antikor ile bağlanır. Bağlanmayan diğer bileşenler ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra TNF- α için spesifik olan biotin-konjuge antikor kuyucuklara eklenir. Yıkama yapıldıktan sonra, avidin konjuge peroksidaz (HRP) enzimi kuyucuklara eklenir. Bağlanmamış avidin-enzim kalıntılarının ortadan kaldırılması için yapılan son yıkama işlemi sonrasında, şiddeti TNF- α içeriğine bağlı olarak artacak olan renk meydana getirecek substrat solüsyonu eklenir. Reaksiyonu durdurmak için son olarak durdurucu solüsyon eklendikten sonra, oluşan rengin absorbanı 450nm'de ölçülür.

Tablo 3.4 TNF- α ELISA kiti içerisinde yer alan ölçüm materyalleri

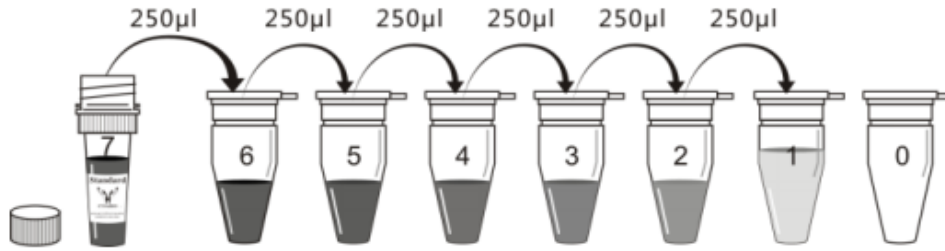
REAKTİFLER	İÇERİĞİ
Mikroplaka (12 x 8 antikor kaplı kuyucuklu)	1 adet (96 kuyucuklu)
Standartlar (liyofilize toz)	2 adet
Biyotin-antikor (100 x konsantre)	1 x 120 μ L
HRP-avidin (100 x konsantre)	1 x 120 μ L
Biyotin-antikor Dilüsyon Solüsyonu	1 x 15 ml
HRP-avidin Dilüsyon Solüsyonu	1 x 15 ml
Örnek Dilüsyon Solüsyonu	1 x 50 ml

Yıkama Tamponu (25 x konsantre)	1 x 20 ml
Tetrametilbenzidin (TMB) Substrat	1 x 10 ml
Durdurma Solüsyonu	1 x 10 ml

Reaktiflerin hazırlanması:

1. Standart çözeltilerinin hazırlanması

- Liyofilize haldeki standart şişesi, işlem yapılmadan önce 10.000 rpm 'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası, şişe içine 1 ml örnek dilüsyon solüsyonu eklenerek stok standart çözeltisi (400pg/ml) hazırlandı.
- 7 adet boş ependorf tüpe 250 µL örnek dilüsyon solüsyonu pipetlendi.
- Stok standart çözeltilerden 250 µL alınarak ilk tüpe aktarıldı. Böylece 1:2 oranında seyreltme yapılarak 200pg/ml konsantrasyonuna sahip standart çözelti elde edildi.
- Diğer tüpler için de aynı oranda seyreltme yapıldı.



Tüpler	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
pg/ml	400	200	100	50	25	12.5	6.25	0

2. Yıkama Tamponunun Hazırlanması:

- Kit içeriğindeki mevcut yıkama tamponu 25 kat konsantre olup çalışma anında 1 hacim yıkama tamponu 24 hacim distile suyla 25 kat seyreltildi. Kuyucuk başına harcanan miktar hesaplanarak gerekli miktarda tampon hazırlandı.

3. Biyotin-antikor ve HRP-avidin çözeltilerinin hazırlanması:

- 100 kat konsantre Biyotin-antikor ve HRP-avidin stok şişelerinden iki farklı cam tüpe 50 µL pipetlendi. Üzerlerine 4950 µL kendi

dilüsyon solüsyonlarından ilave edilerek 100 kat seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Çözeltiler prosedür sırasında kullanılacakları zaman taze olarak hazırlandı.

Ölçüm Metodu:

1. Standartlar önce olmak üzere, hazırlanan tüm standart çözeltiler ve serum örnekleri kuyucuklara 100 µL hacimde pipetlendi.
2. Pipetleme tamamlandıktan sonra, plaka üzeri yapışkanlı kağıt ile kapatılarak 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda, kuyucuklardaki tüm sıvılar boşaltılarak, içlerine 100 µL seyreltilmiş Biotin-antikör solüsyonu eklendi.
4. 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
5. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı ve 200 µL yıkama tamponu ile 3 kez otomatik plaka yıkama cihazında yıkandı.
6. Kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş HRP-avidin çözeltisi eklendi ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
7. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı ve 200 µL yıkama tamponu ile 5 kez otomatik plaka yıkama cihazında yıkandı.
8. Kuyucuklara 90 µL TMB substrat solüsyonu eklenerek 15-30 dakika ışıktan uzakta 37°C'de inkübe edildi.
9. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve 5 dakika içerisinde 450nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

3.2.5.2 Interlökin 10 (IL-10) Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum IL-10 düzeyleri Cusabio Rat IL-10 (CSB-E04595r) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü.

Kit Prensipleri:

Bu kit kantitatif sandviç enzim immunoassay tekniğini kullanır. IL-10 için spesifik antikör mikroplakaya kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler kuyucuklara pipetlenir ve eğer içerisinde IL-10 varsa antikör ile bağlanır. Bağlanmayan diğer bileşenler ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra IL-10 için spesifik olan biotin-konjuge antikör kuyucuklara eklenir. Yıkama yapıldıktan sonra, avidin konjuge peroksidaz (HRP) enzimi kuyucuklara eklenir. Bağlanmamış avidin-enzim kalıntılarının ortadan kaldırılması için yapılan son yıkama işlemi sonrasında, şiddeti IL-10 içeriğine bağlı olarak artacak olan renk meydana getirecek substrat solüsyonu eklenir. Reaksiyonu durdurmak

için son olarak durdurucu solüsyon eklendikten sonra, oluşan rengin absorbanası 450nm'de ölçülür.

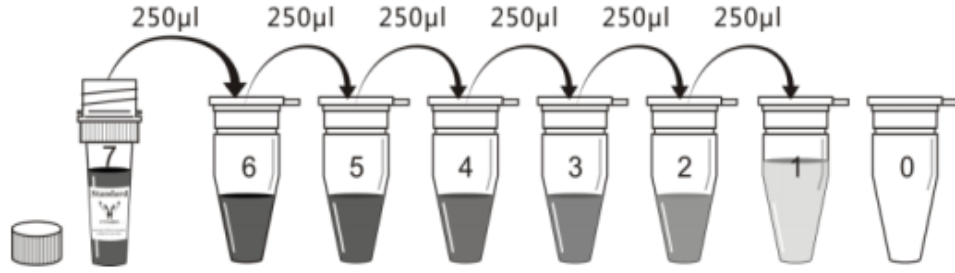
Tablo 3.5 IL-10 ELISA kiti içerisinde yer alan ölçüm materyalleri

REAKTİFLER	İÇERİĞİ
Mikroplaka (12 x 8 antikor kaplı kuyucuklu)	1 adet (96 kuyucuklu)
Standartlar (liyofilize toz)	2 adet
Biyotin-antikor (100 x konsantre)	1 x 120 µL
HRP-avidin (100 x konsantre)	1 x 120 µL
Biyotin-antikor Dilüsyon Solüsyonu	1 x 15 ml
HRP-avidin Dilüsyon Solüsyonu	1 x 15 ml
Örnek Dilüsyon Solüsyonu	1 x 50 ml
Yıkama Tamponu (25 x konsantre)	1 x 20 ml
Tetrametilbenzidin (TMB) Substrat	1 x 10 ml
Durdurma Solüsyonu	1 x 10 ml

Reaktiflerin hazırlanması:

1. Standart çözeltilerinin hazırlanması

- Liyofilize haldeki standart şişesi, işlem yapılmadan önce 10.000 rpm 'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası, şişe içine 1 ml örnek dilüsyon solüsyonu eklenerek stok standart çözeltisi (400pg/ml) hazırlandı.
- 7 adet boş ependorf tüpe 250 µL örnek dilüsyon solüsyonu pipetlendi.
- Stok standart çözeltilerden 250 µL alınarak ilk tüpe aktarıldı. Böylece 1:2 oranında seyreltme yapılarak 200pg/ml konsantrasyonuna sahip standart çözelti elde edildi.
- Diğer tüpler için de aynı oranda seyreltme yapıldı.



Tüpler	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
pg/ml	400	200	100	50	25	12.5	6.25	0

2. Yıkama Tamponunun Hazırlanması:

- Kit içeriğindeki mevcut yıkama tamponu 25 kat konsantre olup çalışma anında 1 hacim yıkama tamponu 24 hacim distile suyla 25 kat seyreltildi. Kuyucuk başına harcanan miktar hesaplanarak gerekli miktarda tampon hazırlandı.

3. Biyotin-antikor ve HRP-avidin çözeltilerinin hazırlanması:

- 100 kat konsantre Biyotin-antikor ve HRP-avidin stok şişelerinden iki farklı cam tüpe 50 µL pipetlendi. Üzerlerine 4950 µL kendi dilüsyon solüsyonlarından ilave edilerek 100 kat seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Çözeltiler prosedür sırasında kullanılacakları zaman taze olarak hazırlandı.

Ölçüm Metodu:

1. Standartlar önce olmak üzere, hazırlanan tüm standart çözeltiler ve serum örnekleri kuyucuklara 100 µL hacimde pipetlendi.
2. Pipetleme tamamlandıktan sonra, plaka üzeri yapışkanlı kağıt ile kapatılarak 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda, kuyucuklardaki tüm sıvılar boşaltılarak, içlerine 100 µL seyreltilmiş Biyotin-antikor solüsyonu eklendi.
4. 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
5. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı ve 200 µL yıkama tamponu ile 3 kez otomatik plaka yıkama cihazında yıkandı.
6. Kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş HRP-avidin çözeltisi eklendi ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.

7. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı ve 200 µL yıkama tamponu ile 5 kez otomatik plaka yıkama cihazında yıkandı.
8. Kuyucuklara 90 µL TMB substrat solüsyonu eklenerek 15-30 dakika ışıktan uzakta 37°C'de inkübe edildi.
9. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve 5 dakika içerisinde 450nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

3.2.6 Fibroblast Büyüme Faktörü 21 (FGF21) Düzeyleri Ölçümü

Çalışmamızda, inflamasyonun kontrolünde metformin ilacının yanı sıra, inflamasyona etkisinin incelenmesi için serum ve karaciğer doku FGF21 düzeyleri Cusabio Rat FGF21 (CSB-EL008627RA) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü. Karaciğer doku örneklerinde ölçüm işlemi yapılmadan önce 100 kat seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltme işlemi için, kit içeriğinde bulunan örnek dilüsyon solüsyonu kullanıldı.

Kit Prensibi:

Bu kit kantitatif sandviç enzim immunoassay tekniğini kullanır. FGF21 için spesifik antikor mikropalakaya kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler kuyucuklara pipetlenir ve eğer içerisinde FGF21 varsa antikor ile bağlanır. Bağlanmayan diğer bileşenler ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra FGF21 için spesifik olan biotin-konjuge antikor kuyucuklara eklenir. Yıkama yapıldıktan sonra, avidin konjuge peroksidaz (HRP) enzimi kuyucuklara eklenir. Bağlanmamış avidin-enzim kalıntılarının ortadan kaldırılması için yapılan son yıkama işlemi sonrasında, şiddeti FGF21 içeriğine bağlı olarak artacak olan renk meydana getirecek substrat solüsyonu eklenir. Reaksiyonu durdurmak için son olarak durdurucu solüsyon eklendikten sonra, oluşan rengin absorbansı 450nm'de ölçülür.

Tablo 3.6 FGF21 ELISA kiti içerisinde yer alan ölçüm materyalleri

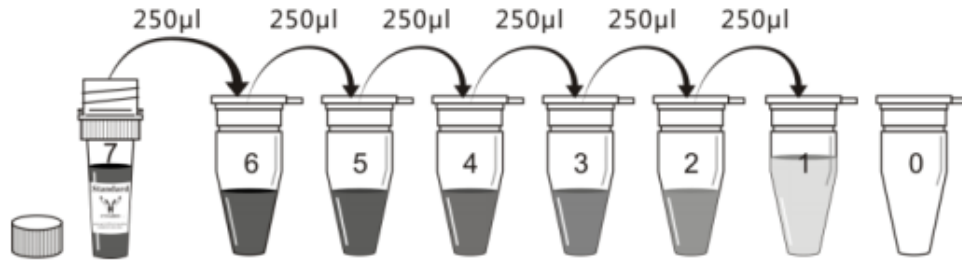
REAKTİFLER	İÇERİĞİ
Mikropalaka (12 x 8 antikor kaplı kuyucuklu)	1 adet (96 kuyucuklu)
Standartlar (liyofilize toz)	2 adet
Biyotin-antikor (100 x konsantre)	1 x 120 µL
HRP-avidin (100 x konsantre)	1 x 120 µL
Biyotin-antikor Dilüsyon Solüsyonu	1 x 15 ml

HRP-avidin Dilüsyon Solüsyonu	1 x 15 ml
Örnek Dilüsyon Solüsyonu	1 x 50 ml
Yıkama Tamponu (25 x konsantre)	1 x 20 ml
Tetrametilbenzidin (TMB) Substrat	1 x 10 ml
Durdurma Solüsyonu	1 x 10 ml

Reaktiflerin hazırlanması:

1. Standart çözeltilerinin hazırlanması

- Liyofilize haldeki standart şişesi, işlem yapılmadan önce 10.000 rpm 'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası, şişe içine 1 ml örnek dilüsyon solüsyonu eklenerek stok standart çözeltisi (400pg/ml) hazırlandı.
- 7 adet boş ependorf tüpe 250 µL örnek dilüsyon solüsyonu pipetlendi.
- Stok standart çözeltiden 250 µL alınarak ilk tüpe aktarıldı. Böylece 1:2 oranında seyreltme yapılarak 200pg/ml konsantrasyonuna sahip standart çözelti elde edildi.
- Diğer tüpler için de aynı oranda seyreltme yapıldı.



Tube	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
pg/ml	1500	750	375	187.5	94	47	23.5	0

4. Yıkama Tamponunun Hazırlanması:

- Kit içeriğindeki mevcut yıkama tamponu 25 kat konsantre olup çalışma anında 1 hacim yıkama tamponu 24 hacim distile suyla

25 kat seyreltildi. Kuyucuk başına harcanan miktar hesaplanarak gerekli miktarda tampon hazırlandı.

5. Biyotin-antikor ve HRP-avidin çözeltilerinin hazırlanması:

- 100 kat konsantre Biyotin-antikor ve HRP-avidin stok şişelerinden iki farklı cam tüpe 50 µL pipetlendi. Üzerlerine 4950 µL kendi dilüsyon solüsyonlarından ilave edilerek 100 kat seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Çözeltiler prosedür sırasında kullanılacakları zaman taze olarak hazırlandı.

Ölçüm Metodu:

1. Standartlar önce olmak üzere, hazırlanan tüm standart çözeltiler, serumlar ve karaciğer doku homojenatları kuyucuklara 100 µL hacimde pipetlendi.
2. Pipetleme tamamlandıktan sonra, plaka üzeri yapışkanlı kağıt ile kapatılarak 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda, kuyucuklardaki tüm sıvılar boşaltılarak, içlerine 100 µL seyreltilmiş Biyotin-antikor solüsyonu eklendi.
4. 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
5. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı ve 200 µL yıkama tamponu ile 3 kez otomatik plaka yıkama cihazında yıkandı.
6. Kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş HRP-avidin çözeltisi eklendi ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
7. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı ve 200 µL yıkama tamponu ile 5 kez otomatik plaka yıkama cihazında yıkandı.
8. Kuyucuklara 90 µL TMB substrat solüsyonu eklenerek 15-30 dakika ışıktan uzakta 37°C'de inkübe edildi.
9. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve 5 dakika içerisinde 450nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

3.2.7 Karaciğer Doku Homojenatlarında Protein Ölçümü

Doku örneklerinde total protein düzeyi Gornall ve ark. tarafından bildirilen Biüret yöntemine göre gerçekleştirildi (Gornall, Bardawill, & David, 1949). Bu yöntem, alkali koşullar altında Cu^{+2} iyonlarının aminoasit, peptid, protein gibi amonyumlu bileşiklerle mavi-mor renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan renkli kompleksin absorbansı spektrofotometrik olarak 545 nm dalga boyunda ölçülmektedir.

Büret Reaktifinin Hazırlanması: 1,5 gr CuSO₄ ve 6 gr Na-K-tartarat tartılarak ayrı kaplarda az miktar distile su ile çözüldü. 30 gr NaOH da yine 300 ml de distile su ile çözüldü (2,5 N). Bu reaktifler karıştırıldı ve 1 L'ye tamamlandı.

Standartların Hazırlanması: Standart olarak Bovin Serum Albumin kullanıldı. 20mg/ml stok çözelti hazırlanarak seri dilüsyonlar ile 20-10-5-2,5 -1,25-0 mg/ml hacimde standartlar hazırlandı.

Standartlar, homojenatlar ve kör için cam tüpler hazırlandı ve aşağıdaki tabloya göre çözeltilerin pipetlemeleri yapıldı.

Tablo 3.7 Büret ölçüm prosedüründeki bileşenlerin hacimleri

	KÖR	NUMUNE	STANDARTLAR
Homojenat	-	50 µL	-
Standartlar	-	-	50 µL
Büret Rektifi	1250 µL	1250 µL	1250 µL
Distile su	50 µL	-	-

15 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildikten sonra 545 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümleri gerçekleştirildi.

3.2.8 Karaciğer Dokularının Histolojik Olarak İncelenmesi

Deney sonunda sakrifiye edilen ratların karaciğerleri dikkatlice çıkarıldıktan sonra hemen SF ile yıkandı ve küçük parçalara ayrılarak % 10'luk tamponlu formaldehit içerisinde 24 saat süreyle fikse edildi. Çeşme suyu altında yıkamayı takiben dereceleri artan etil alkollerden geçirilerek dehidratasyon yapıldı. Ardından ksilol içerisinde şeffaflaştırma işlemi uygulandı ve sıvı parafinlerde bekletildikten sonra parafin bloklar haline getirildiler. Bloklardan 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak H-E ile boyandılar. Binoküler mikroskop altında histopatolojik inceleme yapılarak grubu temsil eden mikro görüntüler elde edildi.

3.2.9 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, Nitel veriler ise n, ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdalık değerler olarak ifade edilmiştir. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren değişkenlere One Way Analysis of Variance testi ile

analiz edilmiş olup, normal dağılım göstermeyen değişkenlere ise Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Test uygulanmıştır. $p < 0.05$ olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir. Tüm veri analizleri IBM SPSS Statistics 21 paket programları ile yapılmıştır.



4-BULGULAR

4.1 Karaciğer Hasarı Belirteçleri

Çalışma gruplarımızın serum AST ve ALT değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Tablo 4.1' de verilmiştir.

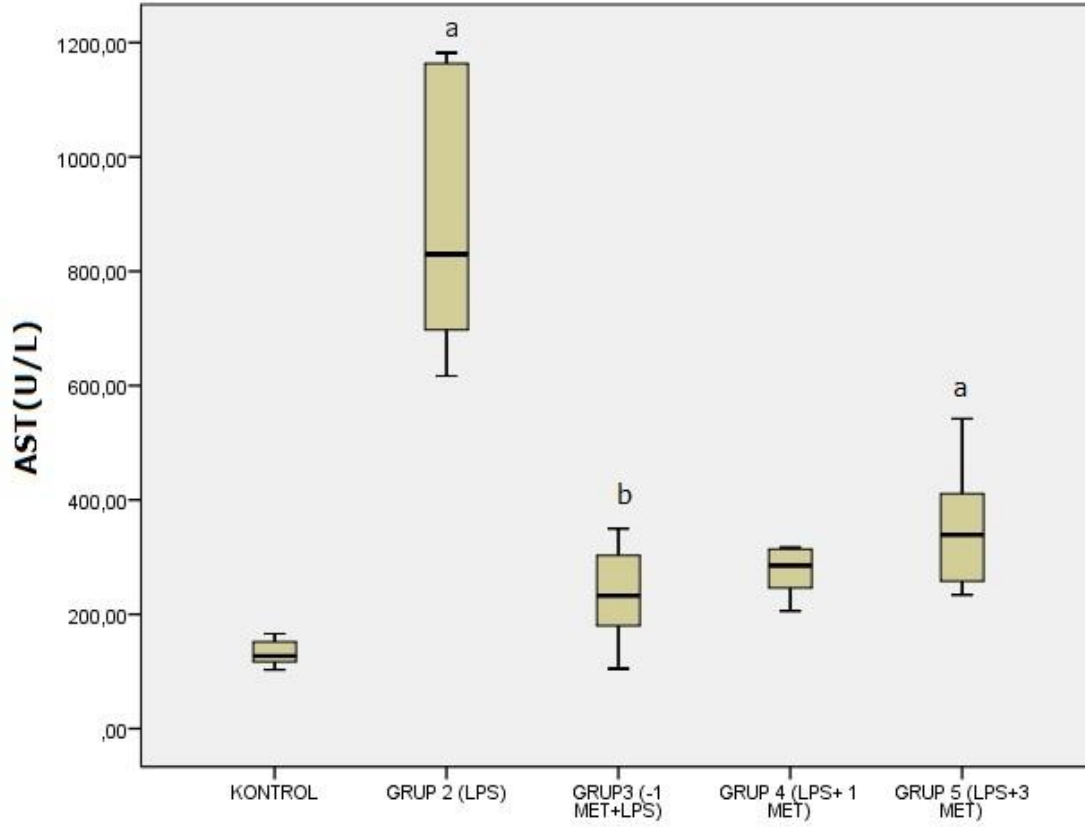
Tablo 4.1 Çalışma Gruplarında AST ve ALT Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması (U/L)

		N	Median (25%-75%)	P
AST	KONTROL	8	127,00 (117,00-152,00)	<0,001**
	GRUP 2 (LPS)	8	830,00 (697,50-1163,50)	
	GRUP3(-1 MET+LPS)	6	232,50 (180,00-303,00)	
	GRUP4(LPS+ 1 MET)	6	285,50 (246,00-314,00)	
	GRUP 5(LPS+3 MET)	6	339,00 (258,00-411,00)	
ALT	KONTROL	8	67,00 (61,50-79,50)	<0,001**
	GRUP 2 (LPS)	8	623,50 (537,00-900,50)	
	GRUP3(-1 MET+LPS)	6	126,50 (95,00-207,00)	
	GRUP4(LPS+ 1 MET)	6	164,00 (120,00-241,00)	
	GRUP5 (LPS+3 MET)	6	226,00 (186,00-345,00)	

** Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (Median 25%-75%)

Gruplarımızın serum AST median değerleri sırasıyla; 127,00 (117,00-152,00); 830,00 (697,50-1163,50); 232,50 (180,00-303,00); 285,50 (246,00-314,00); 339,00 (258,00-411,00) olarak bulunmuştur.

İstatistiksel olarak Grup I'e göre değerlendirildiğinde Grup II'de ve Grup V'te ileri derecede önemli artış bulunmuştur ($p<0,001$). Grup II'ye göre değerlendirme yapıldığında ise Grup III'te yüksek düzeyde anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p<0,001$) (Grafik 4.1.A).



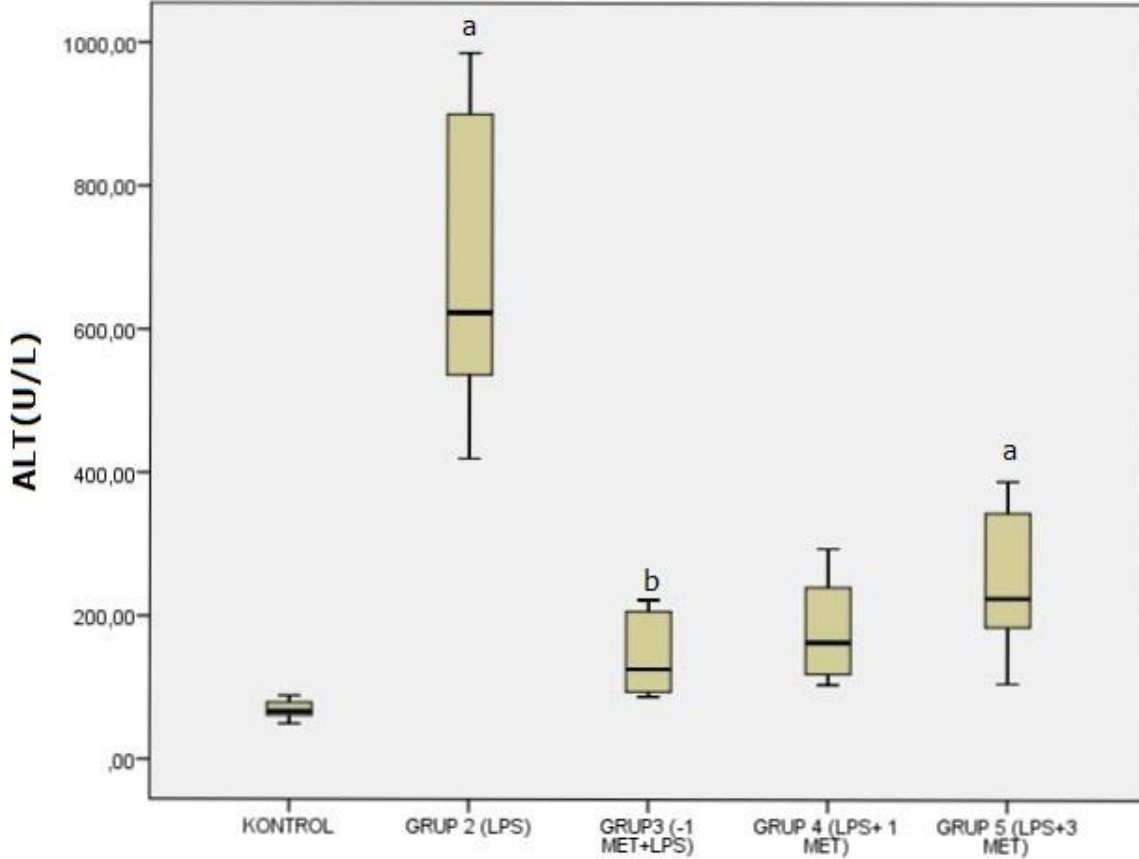
Grafik 4.1.A Serum AST değerlerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

^a: Grup I'e göre farklılık $p < 0,001$

^b: Grup II'ye göre farklılık $p < 0,001$

Gruplarımızın serum ALT median değerleri sırasıyla; 67,00 (61,50-79,50); 623,50 (537,00-900,50); 126,50 (95,00-207,00); 164,00 (120,00-241,00); 226,00 (186,00-345,00) olarak bulunmuştur.

İstatistiksel olarak Grup I'e göre değerlendirildiğinde Grup II'de ve Grup V'te ileri derecede önemli artış bulunmuştur ($p < 0,001$). Grup II'ye göre değerlendirme yapıldığında ise Grup III'te yüksek düzeyde anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p < 0,001$) (Grafik 4.1.B).



Grafik 4.1.B Serum ALT değerlerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

^a: Grup I'e göre farklılık $p < 0,001$

^b: Grup II'ye göre farklılık $p < 0,001$

4.2 Hücre Aktivasyonu Ve İnflamasyonu Belirteçleri

Çalışma gruplarımızın doku MPO düzeylerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi Tablo 4.2' de verilmiştir.

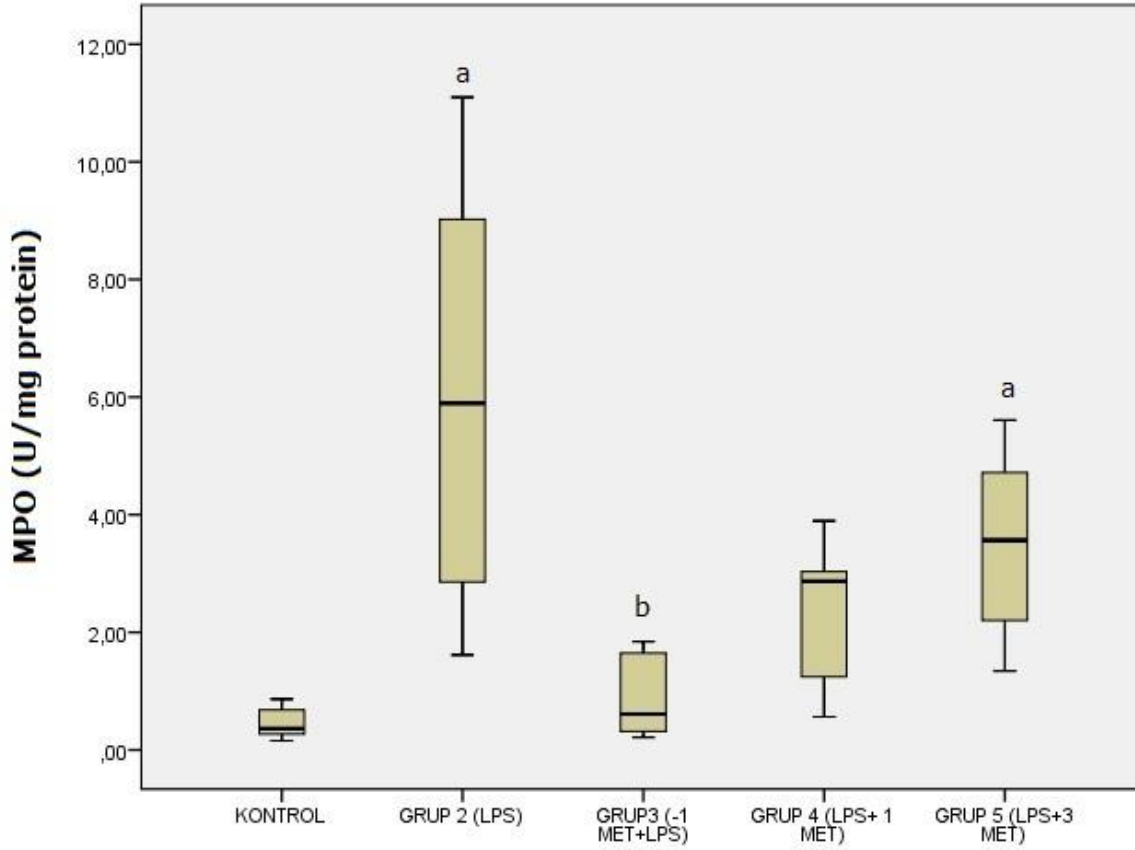
Tablo 4.2 Çalışma Gruplarında Doku MPO Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması (U/mg protein)

		N	Median (25%-75%)	P
MPO	KONTROL	8	0,36 (0,27-0,68)	<0,001**
	GRUP 2 (LPS)	8	5,89 (2,86-9,02)	
	GRUP3 (-1 MET+LPS)	6	0,61 (0,32-1,65)	
	GRUP 4 (LPS+ 1 MET)	6	2,87 (1,24-3,03)	
	GRUP 5 (LPS+3 MET)	6	3,57 (2,20-4,72)	

** Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (Median 25%-75%)

Gruplarımızın doku MPO median değerleri sırasıyla; 0,36 (0,27-0,68); 5,89 (2,86-9,02); 0,61 (0,32-1,65); 2,87 (1,24-3,03); 3,57 (2,20-4,72) olarak bulunmuştur.

İstatistiksel olarak Grup I'e göre değerlendirildiğinde Grup II'de ve Grup V'te ileri derecede önemli artış bulunmuştur ($p<0,001$). Grup II'ye göre değerlendirme yapıldığında ise Grup III'te yüksek düzeyde anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p<0,001$) (Grafik 4.2).



Grafik 4.2 Doku MPO değerlerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

^a: Grup I'e göre farklılık $p<0,001$

^b: Grup II'ye göre farklılık $p<0,001$

4.3 Oksidatif Stres Hasarı Belirteci

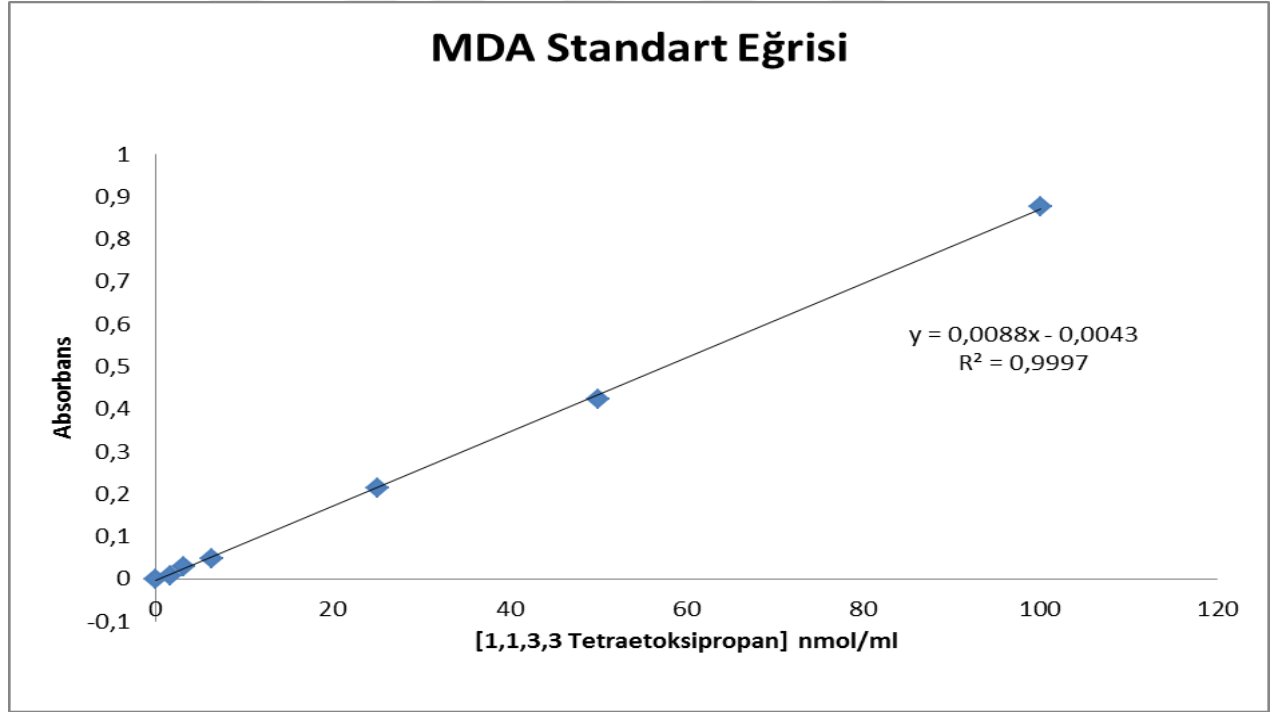
Çalışma gruplarımızın doku MDA düzeylerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi Tablo 4.3' te verilmiştir.

Tablo 4.3 Çalışma Gruplarında Doku MDA Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması (nmol/mg protein)

		N	Mean±Std. Deviation	P
MDA	KONTROL	8	1,82±0,46	<0,001*
	GRUP 2 (LPS)	8	4,05±0,99	
	GRUP3 (-1 MET+LPS)	6	1,51±0,45	
	GRUP 4 (LPS+ 1 MET)	6	1,91±0,32	
	GRUP 5 (LPS+3 MET)	6	1,82±0,46	

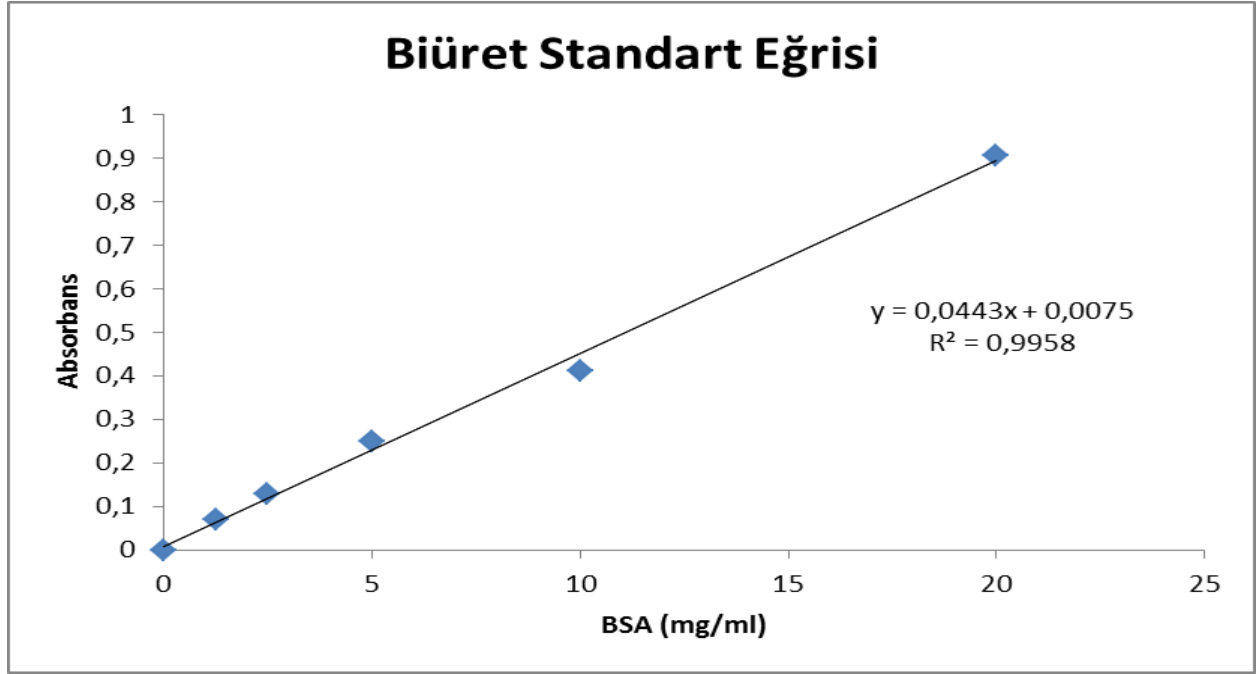
* One Way Analysis of Variance (Mean± Std. Deviation)

MDA düzeyleri aşağıdaki kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak belirlenmiştir (Grafik 4.3)



Grafik 4.3 MDA kalibrasyon grafiği

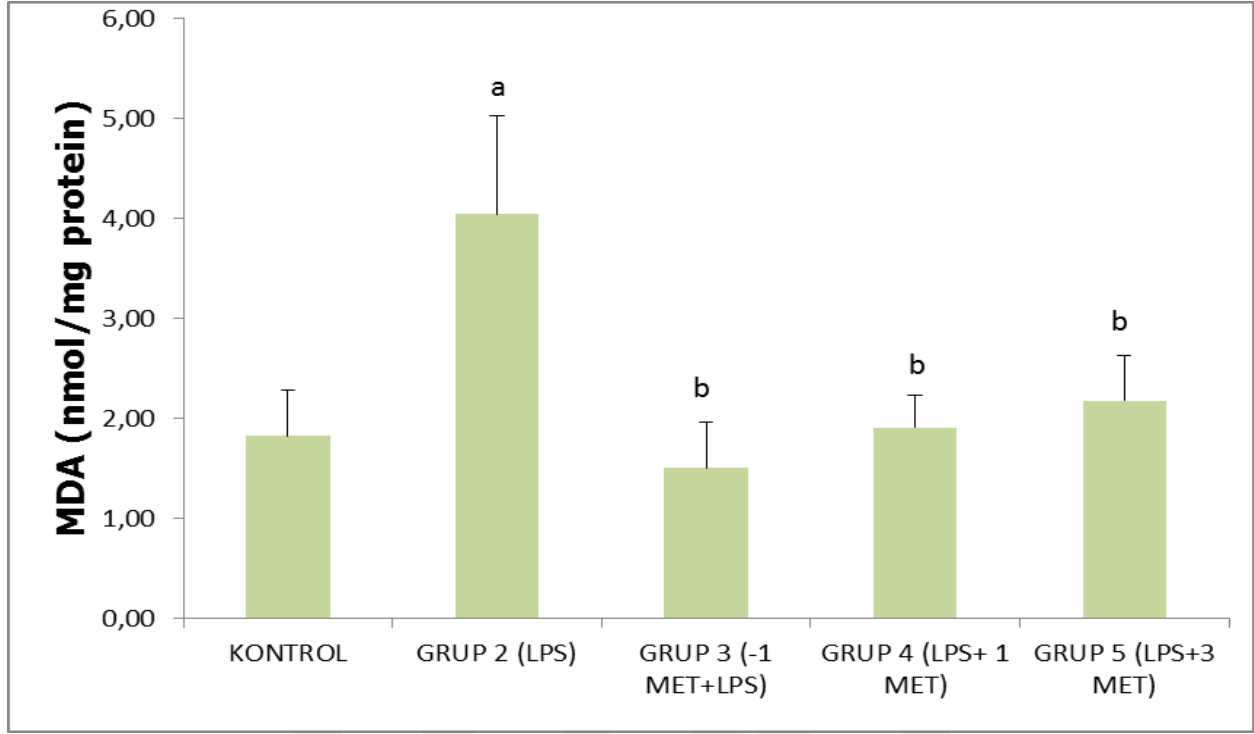
Doku homojenatlarında yapılan protein ölçümleri için aşağıdaki standart grafikten yararlanılmıştır.



Grafik 4.4 Total protein(Biüret) Standart Grafiği

Gruplarımızın doku MDA mean değerleri sırasıyla; $1,82 \pm 0,46$; $4,05 \pm 0,99$; $1,51 \pm 0,45$; $1,91 \pm 0,32$; $1,82 \pm 0,46$ olarak bulunmuştur.

İstatistiksel olarak Grup I'e göre değerlendirildiğinde Grup II'de ileri derecede önemli artış bulunmuştur ($p < 0,001$). Grup II'ye göre değerlendirme yapıldığında ise Grup III'te, Grup IV'te ve Grup V'te yüksek düzeyde anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p < 0,001$) (Grafik 4.5).



Grafik 4.5 Doku MDA düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

^a: Grup I'e göre farklılık $p < 0,001$

^b: Grup II'ye göre farklılık $p < 0,001$

4.4 İnflamatuar Belirteçler

4.4.1 Tümör Nekroz faktörü – α (TNF- α) Düzeyleri

Serum TNF- α değerleri için grupların istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 4.4' te verilmiştir.

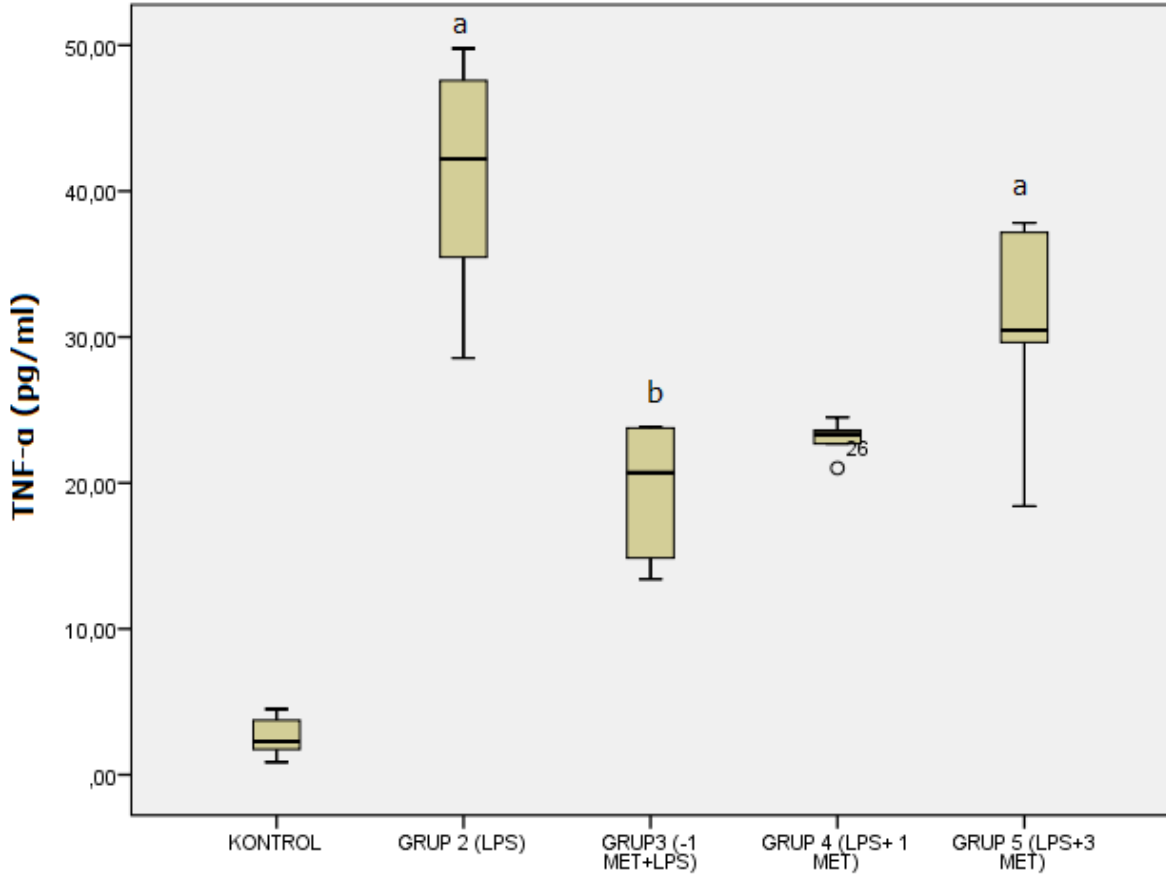
Tablo 4.4 Çalışma Gruplarında Serum TNF- α Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması (pg/ml)

		N	Median (25%-75%)	P
TNF-α	KONTROL	8	2,28 (1,74-3,73)	<0,001**
	GRUP 2 (LPS)	8	42,21 (35,47-47,57)	
	GRUP3 (-1 MET+LPS)	6	20,69 (14,86-23,77)	
	GRUP 4 (LPS+ 1 MET)	6	23,33 (22,68-23,62)	
	GRUP 5 (LPS+3 MET)	6	30,47 (29,64-37,17)	

** Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (Median 25%-75%)

Bir pro-inflamatuar sitokin olan TNF- α 'nın gruplar arası karşılaştırılması incelendiğinde median değerleri sırasıyla; 2,28 (1,74-3,73); 42,21 (35,47-47,57); 20,69 (14,86-23,77); 23,33 (22,68-23,62); 30,47 (29,64-37,17) olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel olarak Grup I'e göre değerlendirildiğinde Grup II'de ve Grup V'te ileri derecede önemli artış bulunmuştur ($p < 0,001$). Grup II'ye göre değerlendirme yapıldığında ise Grup III'te yüksek düzeyde anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p < 0,001$) (Grafik 4.6).



Grafik 4.6 Serum TNF- α düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

^a: Grup I'e göre farklılık $p < 0,001$

^b: Grup II'ye göre farklılık $p < 0,001$

4.4.2 Interlökin 10 (IL-10) Düzeyleri

Serum IL-10 değerleri için grupların istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 4.5' te verilmiştir.

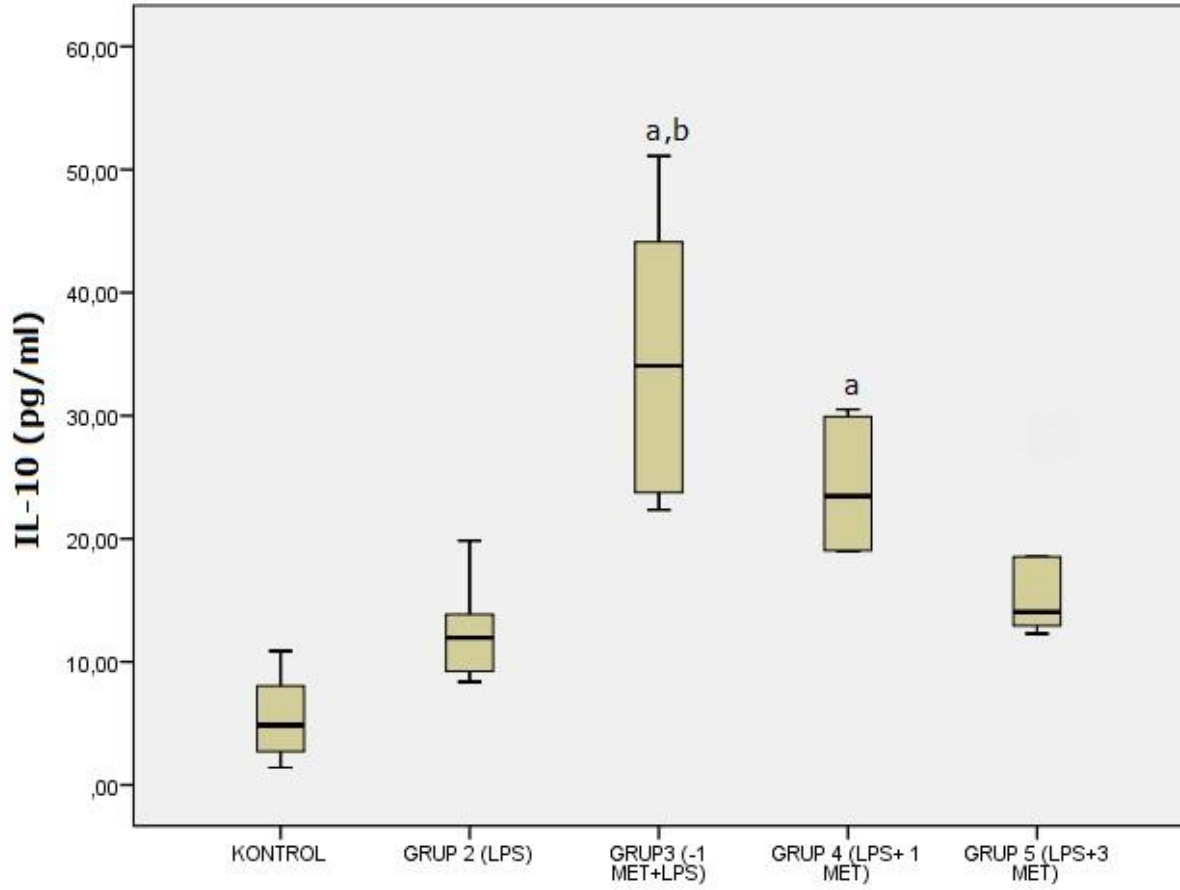
Tablo 4.5 Çalışma Gruplarında Serum IL-10 Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması (pg/ml)

		N	Median (25%-75%)	P
IL-10	KONTROL	8	4,85 (2,72-8,05)	<0,001**
	GRUP 2 (LPS)	8	11,95 (9,23-13,86)	
	GRUP3 (-1 MET+LPS)	6	34,04 (23,75-44,12)	
	GRUP 4 (LPS+ 1 MET)	6	23,46 (19,04-29,93)	
	GRUP 5 (LPS+3 MET)	6	14,04 (12,94-18,53)	

** Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (Median 25%-75%)

Bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10'un gruplar arası karşılaştırılması incelendiğinde median değerleri sırasıyla; 4,85 (2,72-8,05); 11,95 (9,23-13,86); 34,04 (23,75-44,12); 23,46 (19,04-29,93); 14,04 (12,94-18,53) olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel olarak Grup I'e göre değerlendirildiğinde Grup III'te ve Grup IV'te ileri derecede önemli artış bulunmuştur ($p < 0,001$). Grup II'ye göre değerlendirme yapıldığında ise Grup III'te yüksek düzeyde anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p < 0,001$) (Grafik 4.7).



Grafik 4.7 Serum IL-10 düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

^a: Grup I'e göre farklılık $p < 0,001$

^b: Grup II'ye göre farklılık $p < 0,001$

4.5 Fibroblast Büyüme Faktörü 21 (FGF21) Düzeyleri

Serum ve doku FGF21 değerleri için grupların istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.6 Çalışma Gruplarında Serum FGF21 Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması (pg/ml)

		N	Median (25%-75%)	P
SERUM_FGF21	KONTROL	8	16,47 (12,53-19,63)	<0,001**
	GRUP 2 (LPS)	8	95,68 (75,68-109,90)	
	GRUP 3 (-1 MET+LPS)	6	34,37 (22,26-41,74)	
	GRUP 4 (LPS+ 1 MET)	6	35,68 (9,11-56,47)	
	GRUP 5 (LPS+3 MET)	6	44,37 (24,37-54,90)	

** Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (Median 25%-75%)

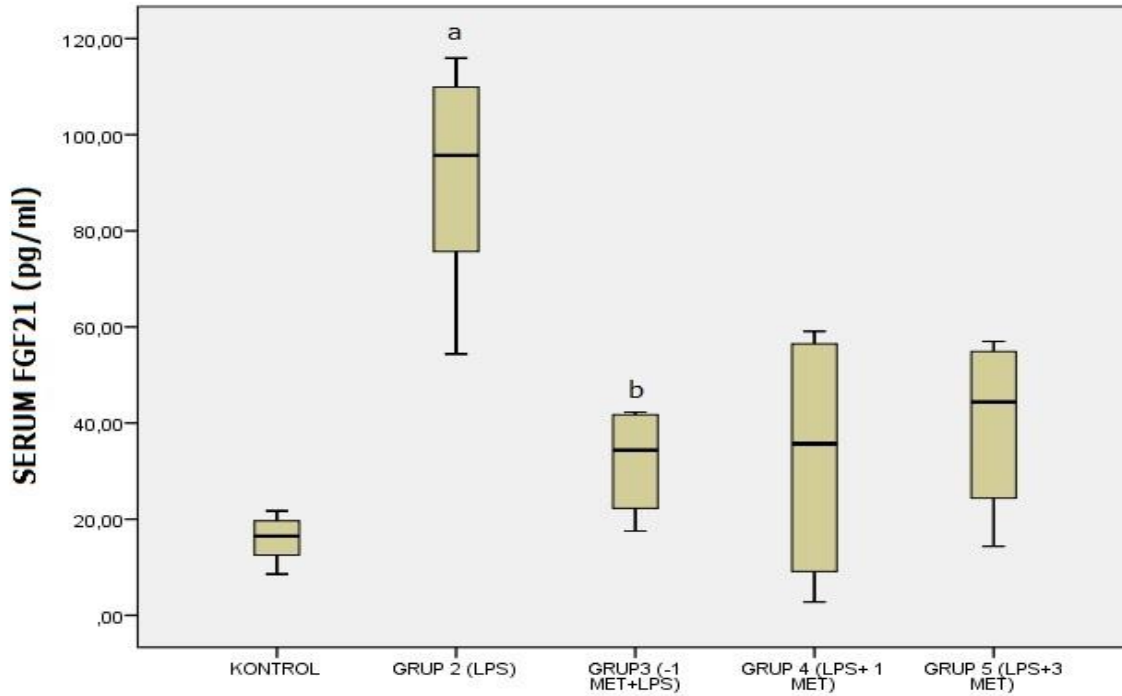
Tablo 4.7 Çalışma Gruplarında Doku FGF21 Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması (pg/100mg yaş doku)

		N	Mean±Std. Deviation	P
DOKU_FGF21	KONTROL	8	4056,18±293,40	<0,001*
	GRUP 2 (LPS)	8	7548,95±441,50	
	GRUP3 (-1 MET+LPS)	6	5408,60±298,09	
	GRUP 4 (LPS+ 1 MET)	6	5998,95±1102,05	
	GRUP 5 (LPS+3 MET)	6	6394,56±1117,96	

* One Way Analysis of Variance (Mean± Std. Deviation)

Gruplarımızın serum FGF21 median değerleri sırasıyla; 16,47 (12,53-19,63); 95,68 (75,68-109,90); 34,37 (22,26-41,74); 35,68 (9,11-56,47); 44,37 (24,37-54,90) olarak bulunmuştur.

İstatistiksel olarak Grup I'e göre değerlendirildiğinde Grup II'de ileri derecede önemli artış bulunmuştur ($p<0,001$). Grup II'ye göre değerlendirme yapıldığında ise Grup III'te yüksek düzeyde anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p<0,001$) (Grafik 4.8).



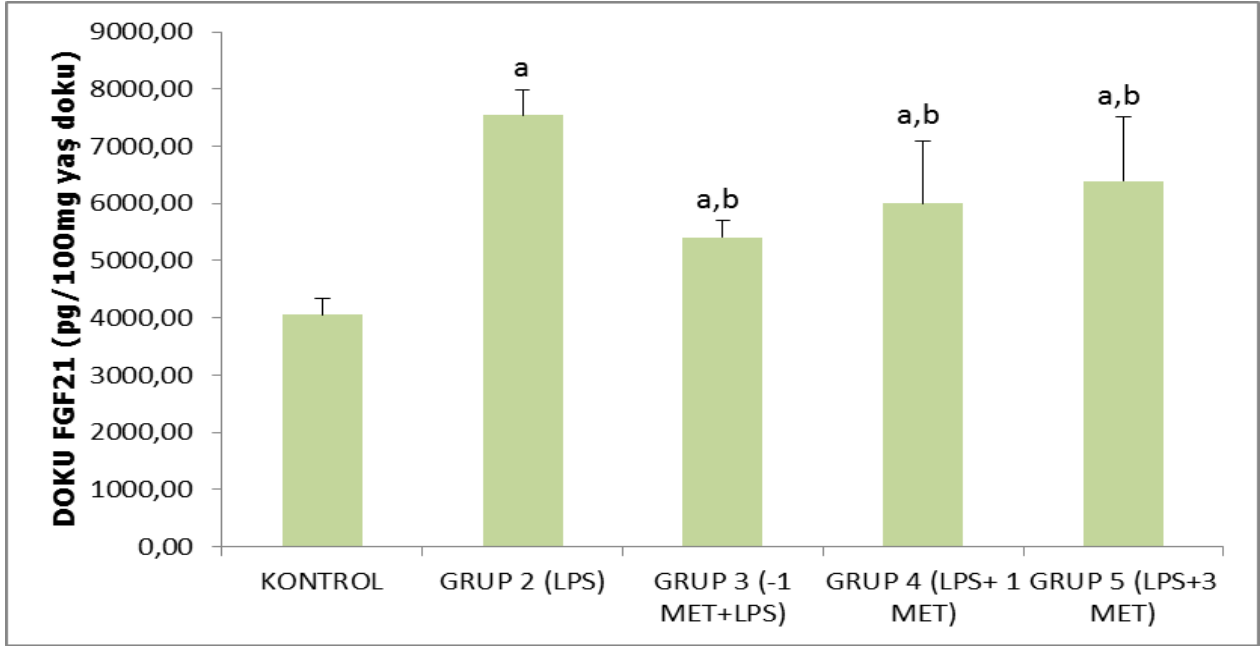
Grafik 4.8 Serum FGF21 düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

^a: Grup I'e göre farklılık $p<0,001$

^b: Grup II'ye göre farklılık $p<0,001$

Gruplarımızın doku FGF21 mean değerleri sırasıyla; 4056,18±293,40; 7548,95±441,50; 5408,60±298,09; 5998,95±1102,05; 6394,56±1117,96 olarak bulunmuştur.

İstatistiksel olarak Grup I'e göre değerlendirildiğinde tüm gruplarda ileri derecede önemli artış bulunmuştur ($p<0,001$). Grup II'ye göre değerlendirme yapıldığında ise yine tüm tedavi gruplarında yüksek düzeyde anlamlı azalış gözlemlenmiştir ($p<0,001$) (Grafik 4.9).



Grafik 4.9 Doku FGF21 düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması

^a: Grup I'e göre farklılık $p<0,001$

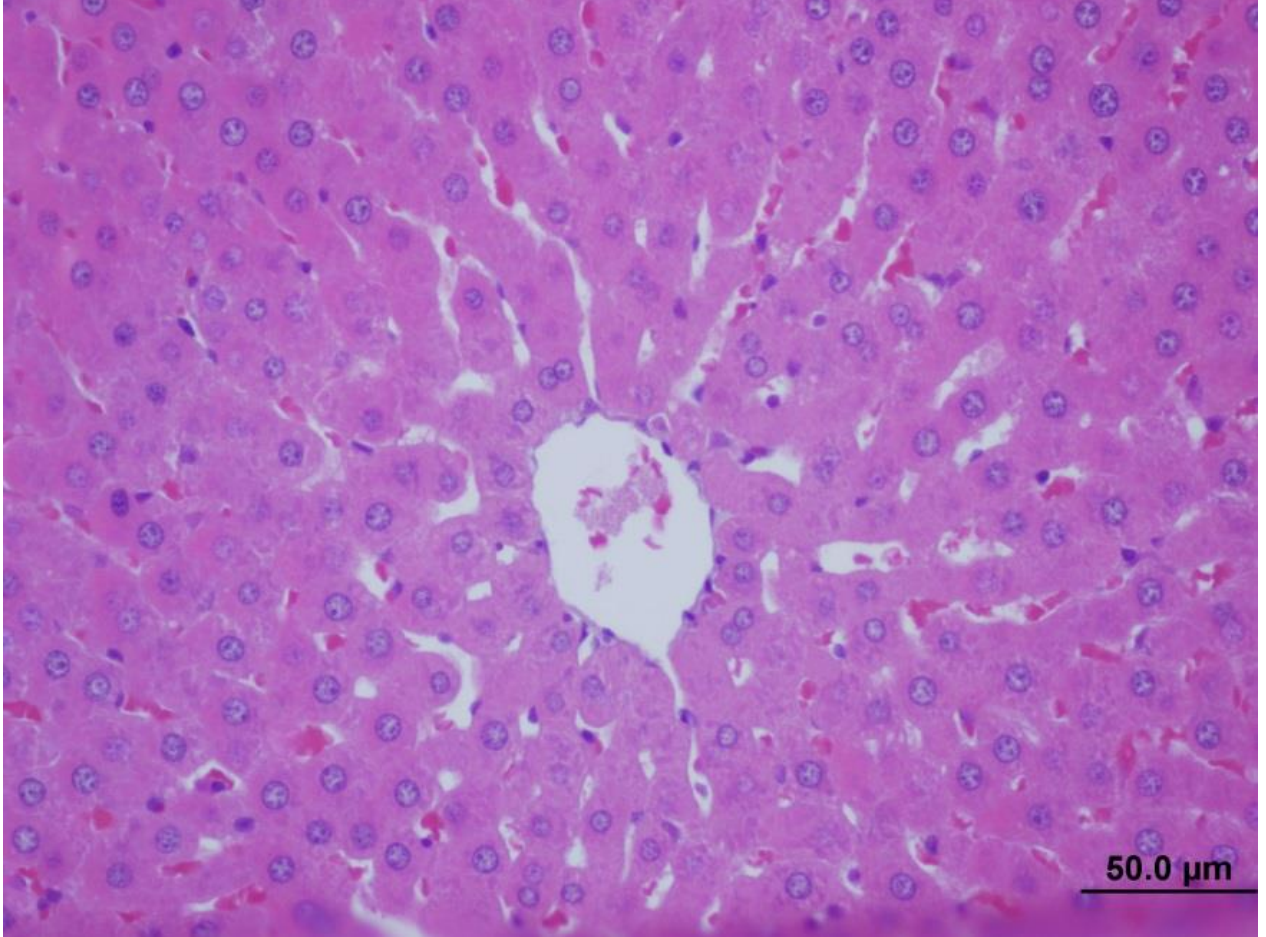
^b: Grup II'ye göre farklılık $p<0,001$

Tedavi grupları olan Grup III, IV ve V'te ikişer olmak üzere toplamda 6 adet hayvan kaybedilmiştir. Hayvanlarda meydana gelen inflamasyonun belirgin bir şekilde ortaya çıkması ve metforminin etkisinin net bir şekilde görülebilmesi için, LPS'nin uygulama süresi ön çalışma ile 24 saat olarak belirlenmiştir. Ancak sürenin uzun olması ve her hayvanın farklı metabolizmaya sahip olması dolayısıyla, bazı hayvanlar bu süreyi tolere edemediğinden deney sürecini tamamlayamamışlardır.

4.6 Histolojik Bulgular

Grup 1: Kontrol SF

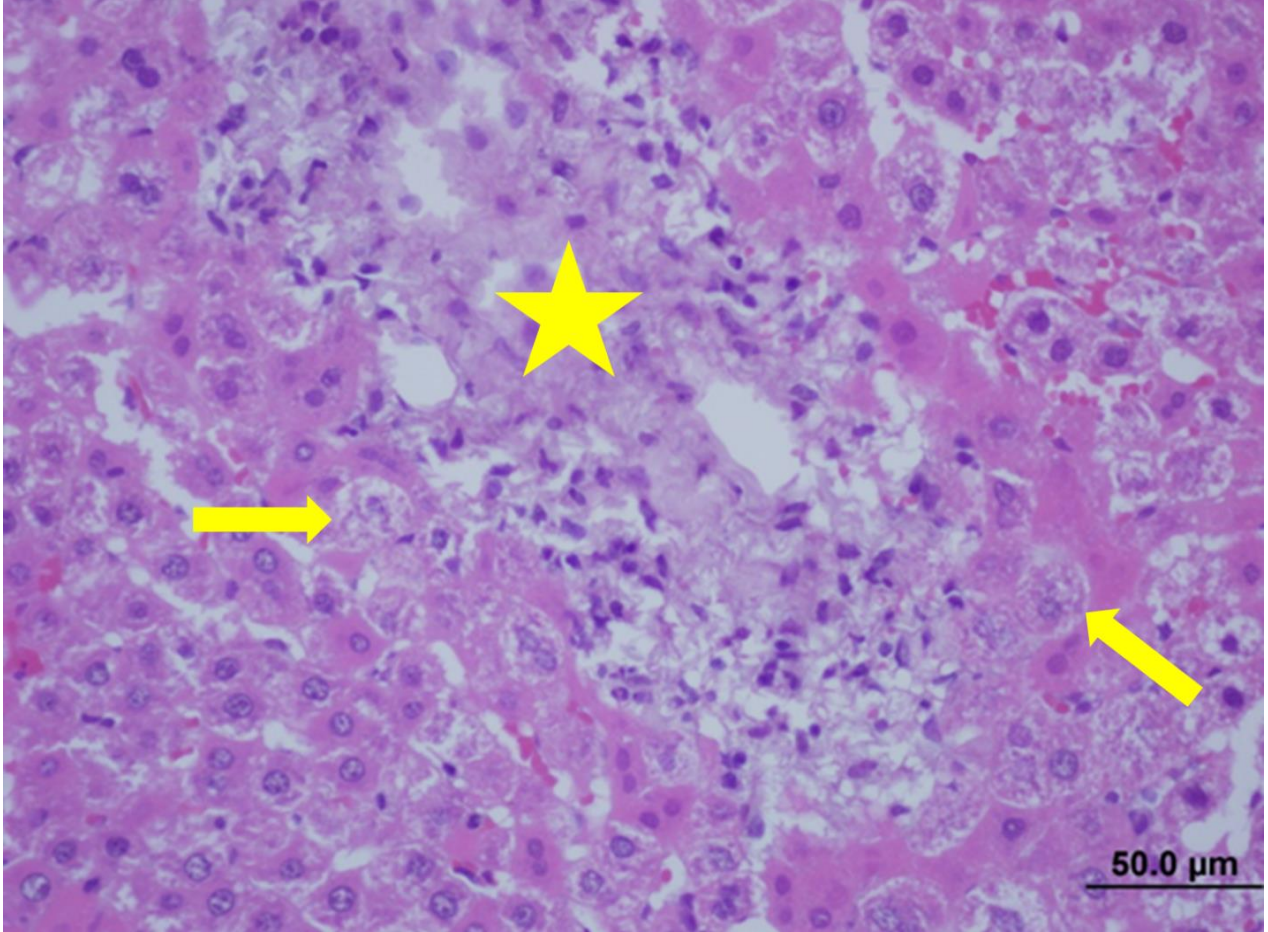
Kontrol grubuna ait karaciğer kesitlerinde normal histolojik yapı izlendi. Hepatositler poligonal şekilleri, hafif eozinofilik sitoplazmaları ve düzgün kenarlı, yuvarlak ve ökromatik çekirdekleriyle santral venler çevresinde ışınsal tarzda düzenlenmişlerdi. Portal yapılar normal olarak değerlendirildi.



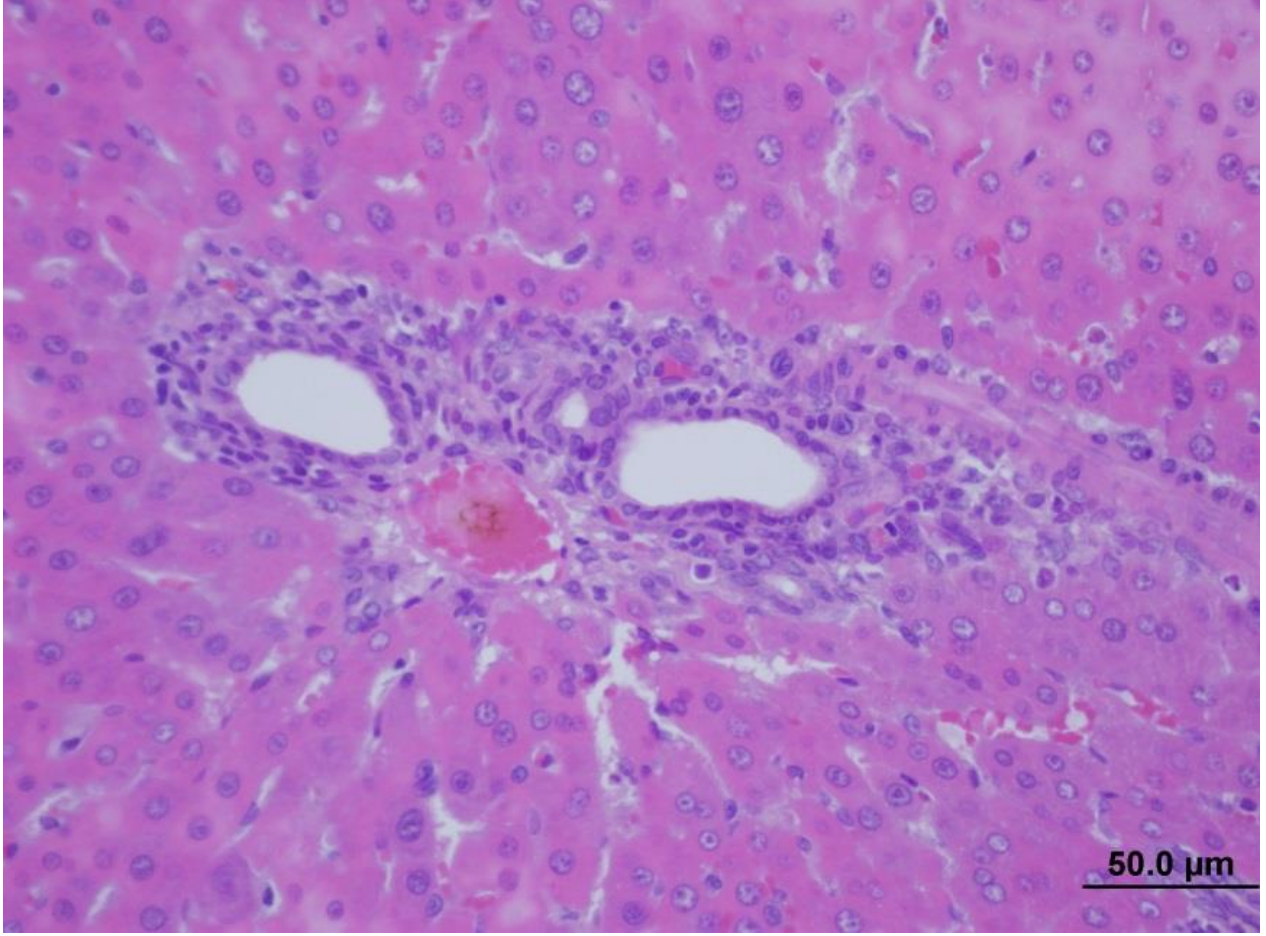
Şekil 4.1 Grup 1'e ait karaciğer kesitinde ortada bir santral ven ve etrafında ışınsal tarzda düzenlenmiş hepatositler görülmektedir. H-E, bar=50 µm.

Grup 2: LPS

Tek başına LPS verilen gruba ait karaciğer kesitlerinde lokal odaklar şeklinde inflamasyonlara rastlandı. Bu odaklarda pürülan materyal bulunmaktaydı. İltihap odaklarına komşu karaciğer hücrelerinde hidropik dejenerasyondan vakuoler dejenerasyon ve nekroza kadar giden hücre hasarları gözlemlendi. Yer yer kanama odakları dikkati çekti. Ayrıca santral venler ve portal yapılar etrafında da iltihabi hücre birikimlerine rastlandı.



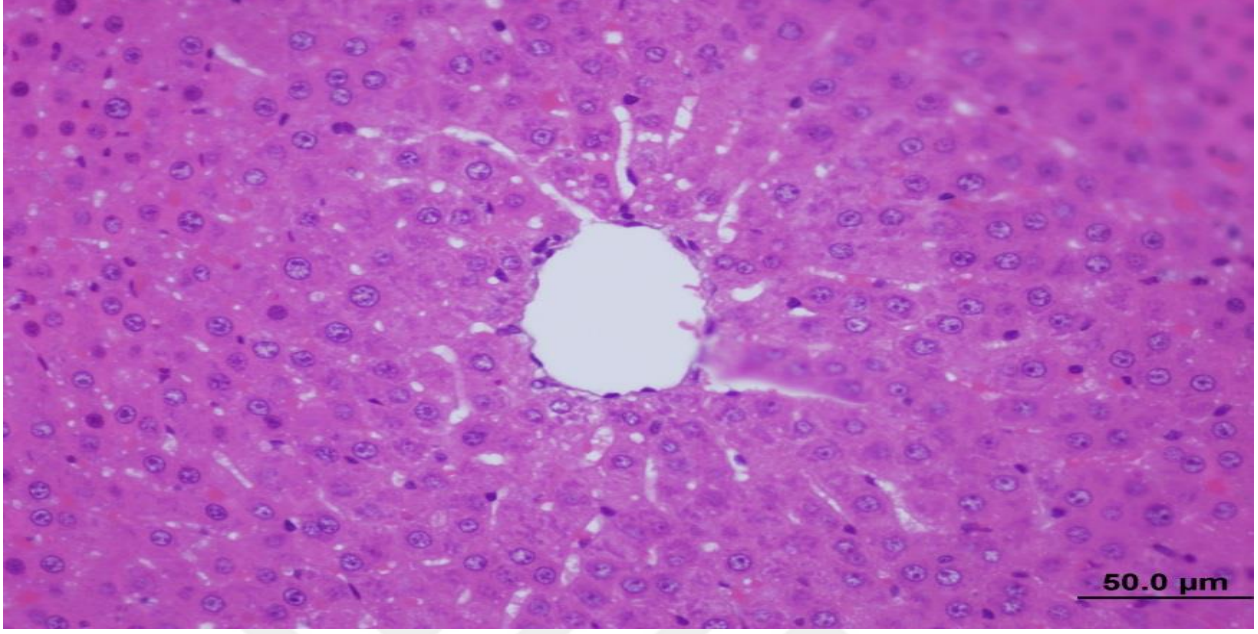
Şekil 4.2 Grup 2'ye ait karaciğer kesitinde ortada bir iltihap odağı (yıldız) ve etrafında dejenerasyona uğramış hepatositler (oklar) görülmektedir. H-E, bar=50 µm.



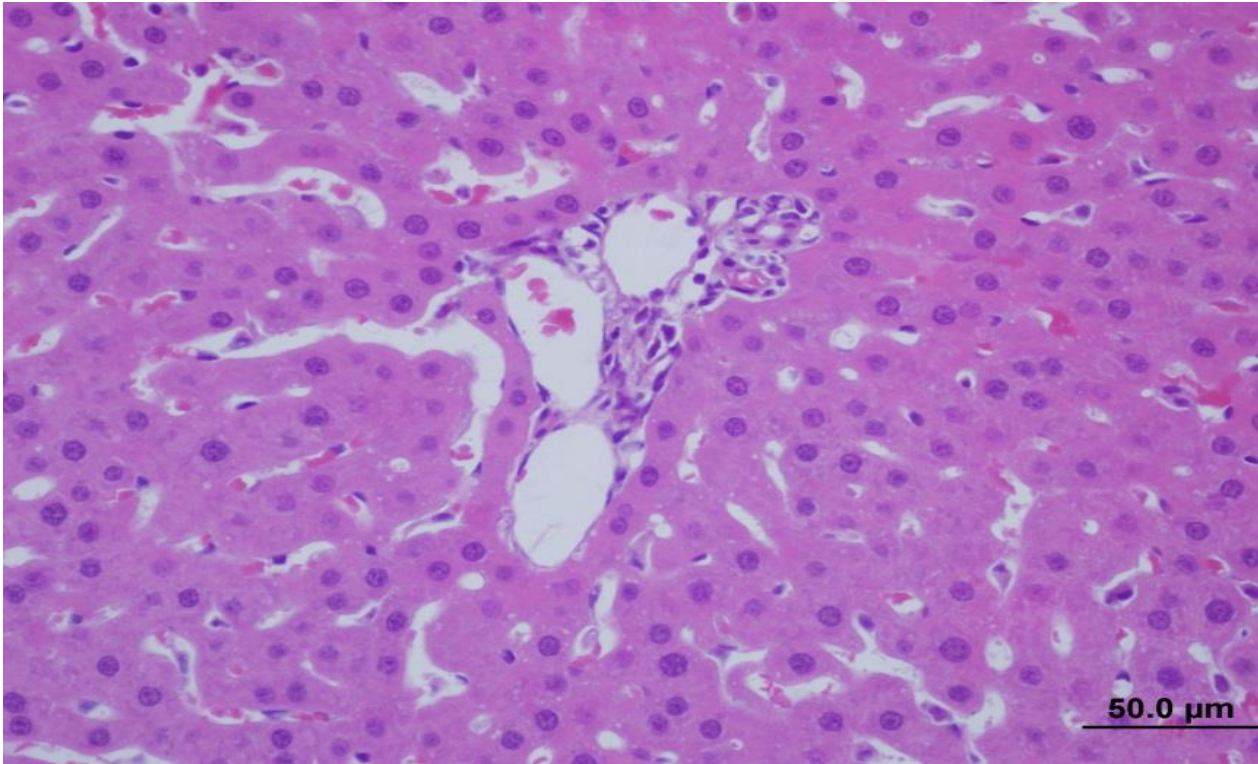
Şekil 4.3 Grup 2'ye ait karaciğer kesitinde ortada portal alan yapıları ve etrafında iltihabi hücre birikimi görülmektedir. H-E, bar=50 µm.

Grup 3: LPS + Metformin 1 Saat Önce

LPS uygulamasından 1 saat önce metformin uygulanan gruba ait karaciğer kesitlerinde iltihap ve kanama odaklarına rastlanmadı. Santral venler ve portal yapıların çevresinde hasar görülmedi. Karaciğer parankiminde sadece birkaç alanda az miktarda vakuolizasyon gösteren hepatositlere rastlandı. Genel olarak doku normale yakın bir histoloji sergiledi.



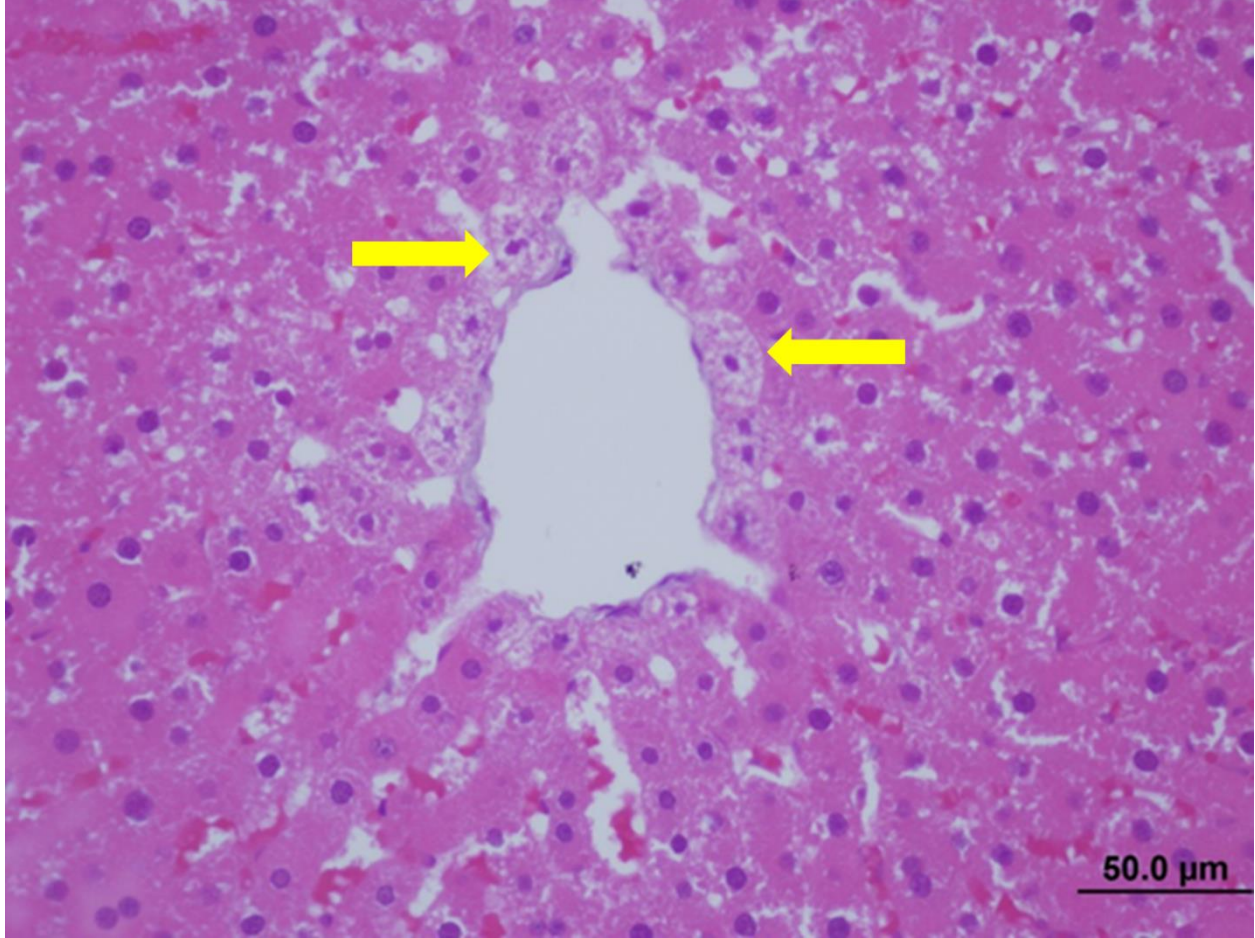
Şekil 4.4 Grup 3'e ait karaciğer kesitinde ortada bir santral ven ve etrafında genel olarak normal görünümlü hepatositler izlenmektedir. H-E, bar=50 µm.



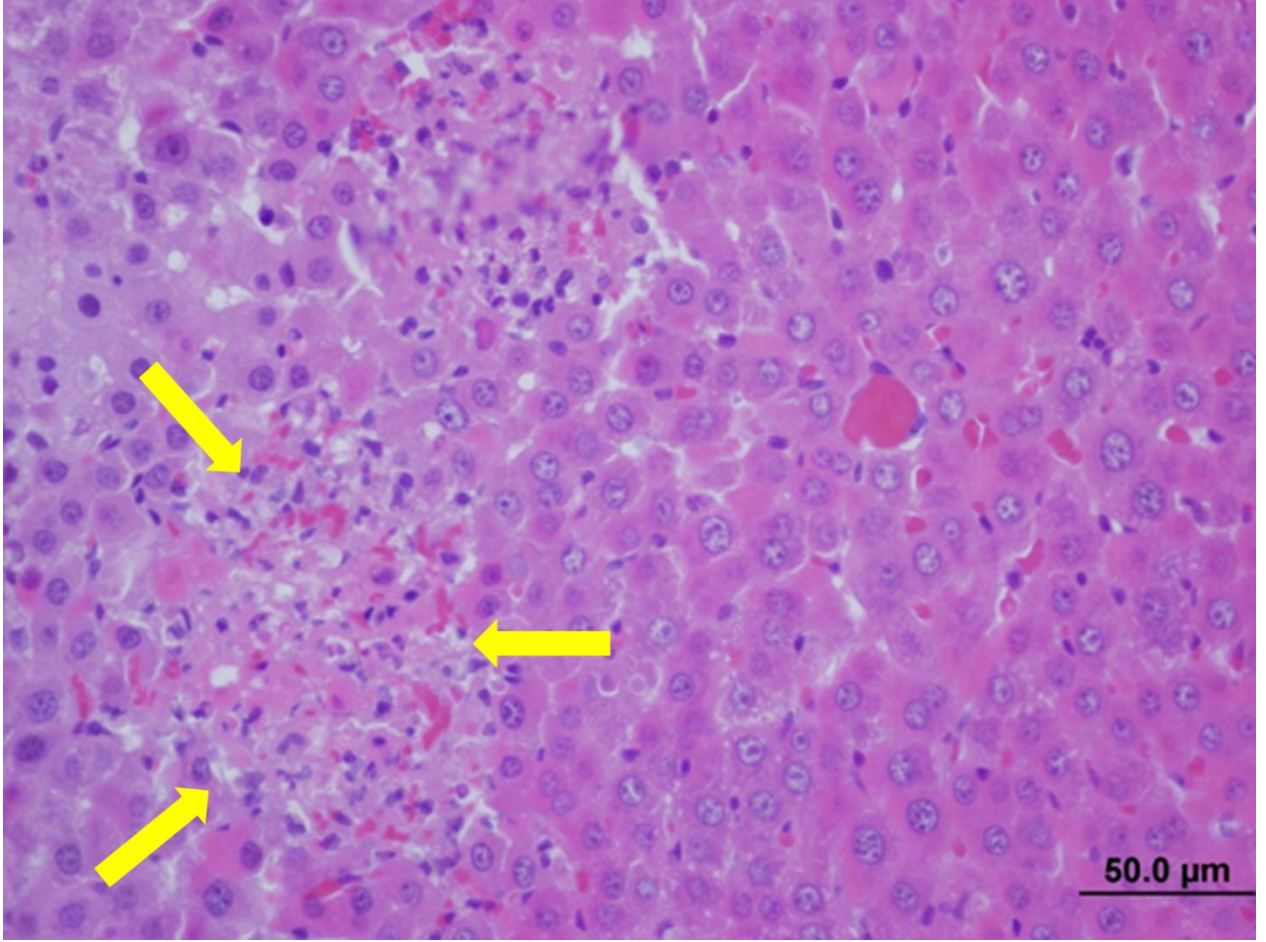
Şekil 4.5 Grup 3'e ait karaciğer kesitinde ortada portal yapılar ve etrafında genel olarak normal görünümlü hepatositler izlenmektedir. H-E, bar=50 µm.

Grup 4: LPS + Metformin 1 Saat Sonra

LPS verildikten 1 saat sonra metformin uygulanan gruba ait karaciğer kesitlerinde metforminin etkisiz kaldığına dair bulgulara rastlandı. İltihabi ve kanamalı odaklar, santral venler ve portal yapılar etrafında iltihabi hücre birikimi, hepatositlerde değişik derecelerde dejenerasyonlar gözlemlendi.



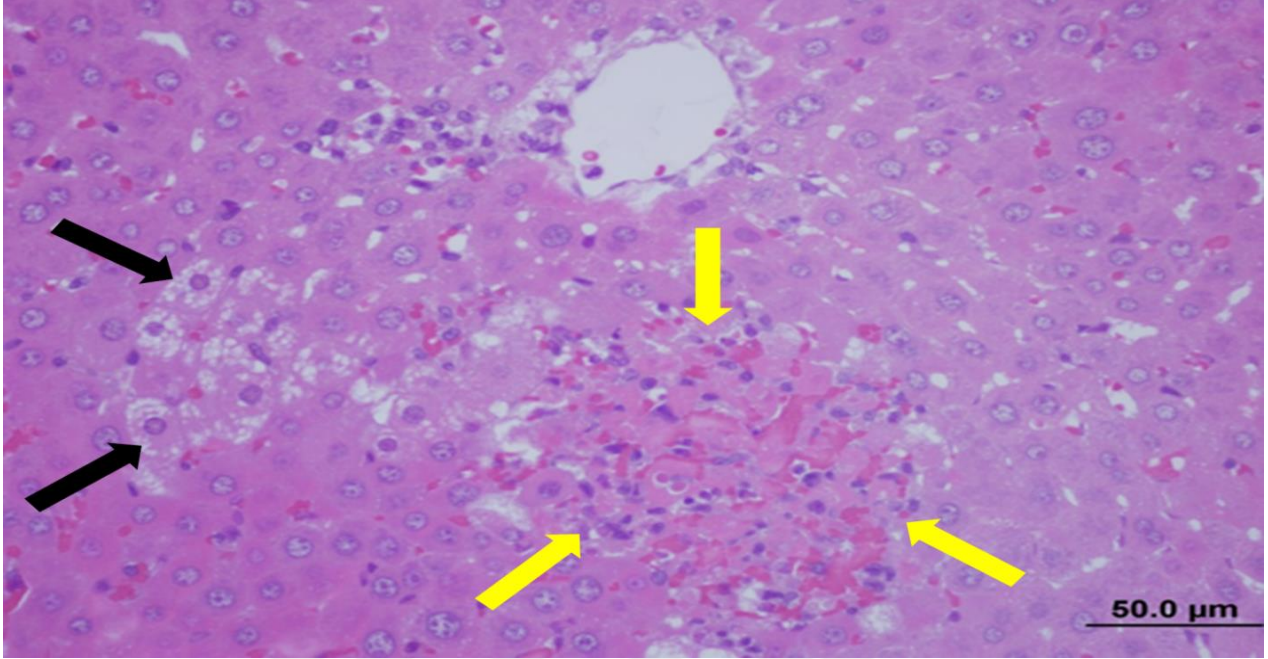
Şekil 4.6 Grup 4'e ait karaciğer kesitinde ortada bir santral ven ve etrafında dejenerasyona uğramış hepatositler (*oklar*) izlenmektedir. H-E, bar=50 µm.



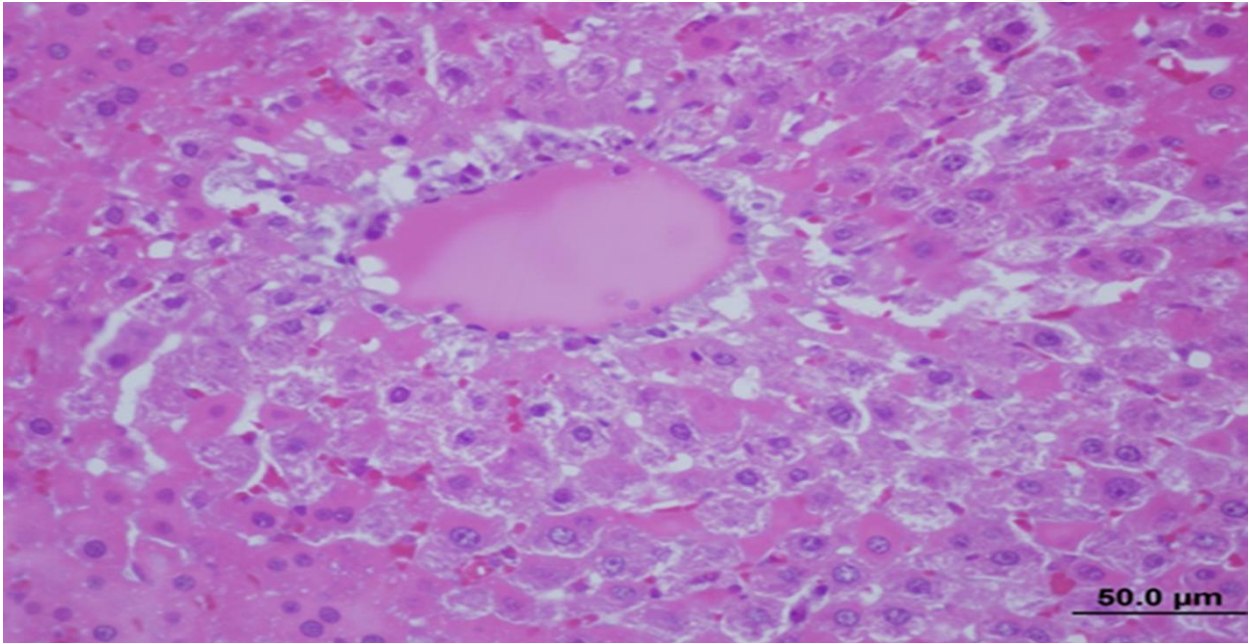
Şekil 4.7 Grup 4'e ait karaciğer kesitinde solda bir iltihap odağı (oklar) görülmektedir. Sağda normal görünümlü hepatositler dikkati çekmektedir. H-E, bar=50 µm.

Grup 5: LPS + Metformin 3 Saat Sonra

LPS verildikten 3 saat sonra metformin uygulanan gruba ait karaciğer kesitlerinde 4. gruptakine benzer, hatta daha ileri düzeyde iltihap kanama ve hepatosellüler dejenerasyona rastlandı.



Şekil 4.8 Grup 5'e ait karaciğer kesitinde üstte bir santral ven, solda vakuoler dejenerasyona uğramış hepatositler (koyu renkli oklar) ve aşağıda bir iltihap odağı (açık renkli oklar) izlenmektedir. H-E, bar=50 µm.



Şekil 4.9 Grup 5'e ait karaciğer kesitinde ortada bir santral ven ve etrafında dejenerasyona uğramış hepatositler görülmektedir. Resmin kenarlarındaki hepatositler normal yapı sergilemektedir. H-E, bar=50 µm.

5- TARTIŞMA

İnflamasyon, oksidatif stres, apoptoz ve immun yanıt gibi birçok mekanizmanın, akut karaciğer hasarına sebep olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, metforminin, Lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan inflamasyon üzerinde koruyucu ya da tedavi edici etkilerinin, FGF21 ile birlikte araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, LPS'nin meydana getirdiği inflamasyon, karaciğer dokuları üzerinden histolojik olarak ve bazı biyokimyasal belirteçler ile incelenmiştir. Özellikle LPS'nin organizmadaki detoksifikasyonu, karaciğerde retikuloendotelial sistemin başlıca bileşenleri olan Kupffer hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Kupffer hücreleri, endotoksemi sırasında, proinflamatuvar sitokinlerin ve ROS'ların başlıca kaynağı olması sebebiyle, bu hücrelerin aktivasyonu, LPS kaynaklı meydana gelen akut hepatik hasarın sebebi olabilir (Kalaz, vd., 2016; Yan, vd., 2016).

Metformin ve FGF21, anti-inflamatuvar etkinliklerini benzer mekanizmalar üzerinden gösterdikleri için, çalışmamızda etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada ratlara, intraperitoneal yolla 200 mg/kg metformin ve 5 mg/kg LPS enjeksiyonları yapılmıştır. Metformin ve LPS'nin dozları, ratlarda toksik dozun altında olacak şekilde, literatür araştırmaları sonucunda belirlenmiştir (Cho, Choi, Kim & Lee, 2009; Quaile, vd., 2010). LPS uygulamasından 24 saat sonra intrakardiyak kan örnekleri ve karaciğer dokuları alınmıştır. 24 saatlik inflamatuvar reaksiyon süresi, yapılan ön çalışma sonrası belirlenmiştir.

LPS uygulaması sonrasında, ratların karaciğer hücrelerinde hasar oluşup oluşmadığını tespit etmek amacıyla, serum örneklerinde Aspartat Aminotransferaz (AST) ve Alanin Aminotransferaz (ALT) enzimlerinin aktiviteleri belirlendi.

Bal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, LPS/D-galaktozamin(D-GalN) ile ratlarda inflamasyon meydana getirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, LPS/D-GalN uygulanan ratlarda, karaciğer hasarını işaret eden AST ve ALT aktivitelerinde ciddi bir artış meydana geldiği görülmüştür. Ancak LPS/D-GalN uygulamasından önce metformin verilen ratlardaki AST ve ALT aktivitelerindeki artışın LPS grubu kadar fazla olmadığı tespit edilmiştir (Bal, vd., 2014).

Bergheim ve arkadaşları, kısmi hepatektomi yapılan ratlarda, LPS endotoksemisinde metforminin koruyuculuğunu incelemişlerdir. Öncelikle ratlara 2/3 oranında hepatektomi yapılarak 2 gün iyileşmeye bırakmışlardır. Daha sonra LPS uygulanan bir hasta grup ve LPS öncesi iki kere metformin uygulanan tedavi grubu oluşturmuşlardır. Hepatektomili ve LPS uygulanan ratlarda ciddi oranda AST ve ALT artışı gözlenirken, LPS öncesinde metformin

uygulanan hepatektomili ratlarda bu artışın daha ılımlı düzeyde olduğu ve metforminin koruyucu bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Bergheim, vd., 2006).

Çalışmamızda, kontrol grubuna oranla, 2. Grup olan LPS grubundaki AST ve ALT aktivitelerinin istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı olması, ratlarda belirgin olarak karaciğer hasarı meydana geldiğini göstermektedir. Kontrol grubuna göre 5. Grup olan LPS sonrası 3. Saate metformin grubunun da istatistiksel olarak yüksek anlamlı olması, bu grupta verilen metforminin, karaciğerde meydana gelen hasarı onarma düzeyinde yetersiz kaldığını göstermektedir.

LPS grubuna oranla, 3. Grup olan LPS öncesi metformin grubunda meydana gelen AST ve ALT aktivitelerindeki azalış, metforminin koruyucu etki gösterdiğini ve LPS'nin karaciğer fonksiyonlarını etkileyecek düzeyde hasar vermesini engellediğini göstermektedir.

Doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonu, oksidatif stresin ve ardından kaçınılmaz olarak meydana gelen oksidatif hasarın bir göstergesi olarak sıklıkla kullanılır. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) miktarının ölçülmesi mevcut klinik ve deneysel çalışmalarda, oksidatif hasar belirteci olarak en çok kullanılan yöntemdir. Lipit peroksidasyonu endotoksin bağımlı hepatik hasarın sorumlularından biridir ve yıkım ürünleri en fazla karaciğer, akciğer ve serumda birikir (Haugaard, 1968).

Yuan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, farelerde karaciğer hasarı meydana getirmek için LPS/D-GalN kullanılmıştır. Sadece LPS/D-GalN uyguladıkları farelerin karaciğerlerinde yüksek düzeyde MDA konsantrasyonu tespit etmişlerdir. Ancak LPS/D-GalN uygulaması öncesinde metformin verilen gruptaki farelerde, sadece LPS/D-GalN uygulanan gruba oranla anlamlı düzeyde MDA konsantrasyonunda azalma meydana gelmiştir. Metforminin karaciğeri oksidatif hasardan korumuş olduğu tespit edilmiştir (Yuan, vd., 2012).

Zhou ve arkadaşları ise benzer olarak farelere hem LPS uygulayarak hem de yüksek yağlı diyet uygulayarak karaciğer hasarı meydana getirmişlerdir. 18 hafta boyunca yüksek yağlı diyet uyguladıkları farelerin, bir grubuna sadece LPS, diğer gruba ise LPS vermeden önce 4 hafta boyunca oral metformin vermişlerdir. Karaciğer dokuları alınıp MDA düzeylerine bakıldığında, LPS verilen grupta oldukça yüksek MDA konsantrasyonları tespit edilmiştir. Metformin uygulanan grupta ise, MDA düzeylerinin anlamlı düzeyde düşük olduğunu, metforminin karaciğeri oksidatif hasardan koruduğunu gözlemlemişlerdir (Zhou, vd., 2016).

Yapılan bu literatür çalışmalarına uyumlu olarak, biz de tez çalışmamızda karaciğerde meydana gelen oksidatif hasarı MDA düzeylerini ölçerek gösterdik. Kontrol grubuna oranla, 2. Grup olan LPS grubunda, MDA düzeyleri istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı olarak artmıştır. Bu durum LPS'nin karaciğerde belirgin olarak oksidatif hasar meydana getirdiğini desteklemektedir. LPS grubuna oranla, tedavi grupları karşılaştırıldığında ise, 3 grupta da ileri düzeyde anlamlı bir azalma belirlenmiştir.

LPS uygulaması sonrasında, ratların karaciğer hücrelerinde meydana gelen nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyonun belirlenmesi için myeloperoksidaz (MPO) enzim düzeyleri ölçüldü.

Pandey ve Kumar'ın, ratlarda meydana gelen akut inflamasyon ve oksidatif stres üzerine metforminin koruyucu etkisinin değerlendirdikleri çalışmada, akut inflamasyon değerlendirilmesi için doku MPO düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmada ratların arka ayak patileri üzerinde enjeksiyon ile inflamasyon oluşturulmuş olup, bir grupta düşük, diğer grupta yüksek dozda olmak üzere, inflamasyon öncesinde ratlara yine enjeksiyonla metformin verilmiştir. Sonuçları istatistiksel olarak değerlendirdiklerinde, sadece toksin enjekte edilen gruba kıyasla, düşük ve yüksek doz metformin uyguladıkları gruplar arasında, MPO düzeyleri açısından istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir düşüş olduğunu gözlemişlerdir. Metforminin düşük dozda da yüksek dozda da olsa, inflamasyona karşı koruyucu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (Pandey & Kumar, 2016).

Vaez ve arkadaşları, akciğerde LPS ile meydana getirdikleri akut inflamasyon üzerine metforminin koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Akciğer dokularında nötrofil infiltrasyon göstergesi olarak MPO düzeylerine bakmışlardır. Sonuçlara bakıldığında, sadece LPS enjeksiyonu yaptıkları gruba göre, LPS öncesi metformin enjekte ettikleri grupta, MPO düzeylerindeki düşüş istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur. Böylece metforminin akciğerlerdeki inflamasyonu belirgin oranda azaltarak koruyucu etki yaptığını belirlemişlerdir (Vaez, vd., 2016).

Çalışmamızda, literatüre uyumlu olarak, kontrol grubuna kıyasla, sadece LPS uyguladığımız 2. Gruptaki MPO düzeylerinde, istatistiksel olarak yüksek oranda anlamlı bir artış meydana geldi. Aynı zamanda 2. Gruba ait karaciğer dokuları histolojik olarak değerlendirildiğinde, iltahabi hücre odakları, yer yer kanamalar ve dejenerasyona uğramış hepatositler gibi inflamasyonu işaret eden bulgular olduğu belirlendi. LPS grubu olan 2. Grup ile LPS öncesi metformin uygulanan 3. Grup kıyaslandığında, MPO düzeylerinde istatistiksel olarak yüksek oranda anlamlı azalma meydana geldi. Aynı zamanda 3. Grubun karaciğer dokuları incelendiğinde, iltahabi ve

kanama odakları görülmeyip, sadece bazı yerlerde vakuolizasyon gösteren hepatositlere rastlandı. Genel olarak neredeyse kontrol grubuna yakın histolojik inceleme sonuçları olması, metforminin karaciğerde LPS'nin meydana getirdiği inflamasyonu koruyucu yönde başarılı bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Kontrol grubuna kıyasla, 5. Grup olan LPS sonrası 3. Saatte metformin grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış olması, 3 saat sonra metformin verilmesinin inflamasyonu önlemede yetersiz kaldığını göstermiştir. Histolojik bulgularda da, LPS grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmamızda inflamatuvar belirteçlerden, proinflamatuvar sitokin olan TNF- α ve antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 düzeyleri araştırılmıştır.

Hyun ve arkadaşlarının fare makrofaj hücreleri ile gerçekleştirdiği *in vitro* çalışmada, LPS ile hücre kültürü ortamında inflamasyon meydana getirilmiştir. Sadece LPS uygulanan hücrelerde, kontrol hücrelerine göre TNF- α düzeylerinde istatistiksel olarak yüksek oranda anlamlı artış meydana gelmiştir. Yüksek oranda metformin ile birlikte LPS uygulanan hücrelerde ise, LPS uygulanan hücrelere oranla TNF- α değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır. IL-10 düzeyleri ise Western Blotting yöntemi ile incelenmiş olup, LPS ile birlikte metformin verilen gruplarda, IL-10 protein ekspresyon düzeylerinin bir miktar daha artmış olduğu görülmüştür (Hyun, vd., 2013).

Chen ve arkadaşlarının Tip II Diabetes Mellitus hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada ise metformin ve diğer anti-diyabetik ilaçların, inflamatuvar etkilerinin karşılaştırması yapılmıştır. Bir yıllık bir çalışma yürüten grup, metforminin proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bir yıl boyunca düzenli olarak yalnızca metformin kullanan gruptaki hastaların serumları ile diğer ilaçları kullanan hastaların serumları karşılaştırıldığında, metforminin bir yıllık süreçte TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyesini azalttığı, bir antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyelerini ise arttırdığı tespit edilmiştir (W. Chen, Liu, & Ye, 2016).

Çalışmamızdaki TNF- α sonuçlarına bakıldığında, kontrol grubuna göre, LPS verilen 2. Gruptaki TNF- α değerleri, istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bir artış göstermiştir. Diğer parametreler ile uyumlu olarak, LPS grubundaki ratlarda belirgin oranda inflamasyon meydana geldiği görülmektedir. Kontrol grubuna göre, 5. Grup olan LPS sonrası 3. Saatte metformin grubunda da anlamlı artış olması, inflamasyonun baskılanmadığını göstermektedir. 2. Gruba göre, 3. Grup olan LPS öncesi metformin grubunda ise istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı azalma meydana gelmiştir. Bu durum metforminin, inflamasyon sonucu açığa çıkan

TNF- α üretimini baskıladığını ve LPS'nin meydana getirdiği inflamasyona karşı koruyucu etki oluşturduğunu göstermektedir.

IL-10 sonuçlarına bakıldığında, anlamlı düzeyde olmasa da, LPS grubunda kontrol grubuna göre bir artış meydana geldiği görülmektedir. IL-10'un, LPS'nin makrofajlardan TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını inhibe ettiği ve dolayısıyla inflamatuvar yanıtı sınırladığı gösterilmiştir (Pengal, vd., 2006; Grutz, 2005). Bu nedenle LPS grubundaki IL-10 düzeyleri, meydana gelen aşırı inflamatuvar yanıtı kontrol altına almak için artmış olabilir. Kontrol grubuna göre, 3. Grup olan LPS öncesi metformin ve 4. Grup olan LPS sonrası 1. Saatte metformin gruplarında IL-10 düzeyleri kıyaslandığında, istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir artış meydana geldiği görülmüştür. Metforminin, bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 düzeylerini arttırarak, ratlarda meydana gelen inflamasyonu baskıladığı görülmektedir. LPS grubu olan 2. Grup ile 3. Grup arasındaki IL-10 düzeyleri kıyaslandığında ise, yine istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Böylece metforminin, özellikle inflamasyon öncesinde IL-10 üretimini indükleyerek, oluşan inflamatuvar hasara karşı koruma sağladığı görülmektedir. Sonuçlar, literatür araştırmalarını destekler nitelikte bulunmuştur.

Nygaard ve arkadaşlarının insan ve rat hepatositleri üzerinde yaptıkları *in vitro* çalışmada, metforminin hepatositlerdeki FGF21 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Bu regülasyonun, metforminin etki mekanizmasında yer alan AMP aktive protein kinaz (AMPK) aktivasyonu ile olup olmadığı da çalışmada araştırılmıştır. Bunun için kültür ortamında hücreler metformin eklendikten sonra, AMPK inhibitörü olan Compound C ile muamele edilmiş ve FGF21 ekspresyonunun durduğu görülmüştür. Çalışma, metforminin, hepatic FGF21 ekspresyonunun kuvvetli bir uyarıcısı olduğunu ve metforminin bu etkiyi AMPK aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştirdiğini göstermektedir (Nygaard, 2012).

Feingold ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farelere LPS enjeksiyonu yapılmış ve 16 saat sonra serumdaki FGF21 düzeyleri incelenmiştir. Kontrol grubuna göre, LPS grubundaki FGF21 düzeylerinin neredeyse 2 kat fazla olduğu bulunan çalışmada, FGF21'in bir akut faz proteini olduğu ancak akut faz yanıt sırasında geç yükselen bir belirteç olduğu yorumuna ulaşılmıştır (Feingold, 2012).

Wang ve arkadaşlarının diyabetik ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, metformin ile tedavi edilen ratlardaki FGF21 düzeyleri incelenmiştir. Diyabetik ratlar 12 hafta boyunca oral olarak metformin ile tedavi edildikten sonra, ratların serumları alınmıştır. Metformin uygulanan ratlarda, kontrol ve diyabet grubuna oranla FGF21 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı

düzyede artış olduğu görölmüştür. Çalışmada metforminin diyabet tedavisinde FGF21 düzeylerinde artma sağlayarak da etki göstermiş olabileceği yorumuna ulaşılmıştır (Wang, vd., 2017).

Yu ve arkadaşlarının fare makrofaj hücreleri ile gerçekleştirdiği *in vitro* çalışmada, LPS ile hücre kültürü ortamında, hücrelerde inflamasyon ve oksidatif stres meydana getirilmiştir. Çalışmada, FGF21'in antiinflamatuvar etkilerini incelemek için, FGF21 hücrelere rekombinant olarak eksojen uygulanmıştır. LPS uygulanan hücrelere kıyasla, LPS ile birlikte FGF21 verilen hücrelerde, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu azalırken, bir antiinflamatuvar sitokin olan IL-10'un ekspresyonunun arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu etkinin de NF- κ B sinyal yolağının inhibisyonu üzerinden gerçekleştiği tespit edilmiştir. Böylece, tıpkı metforminde olduğu gibi, FGF21'in de benzer mekanizmalar ile inflamasyonu engellediği yorumuna ulaşılabilir (Yu, 2016).

Bu literatür bilgilerinin ışığında, tez çalışmamızda, metforminin inflamasyon üzerindeki etkilerini, FGF21 ile değerlendirmeyi amaçladık. FGF21'in başlıca üretim yeri karaciğer olduğu için, değerlendirme hem serum hem de karaciğer doku homojenatları üzerinden yapılmıştır.

Serumlardaki sonuçlara bakıldığında, kontrol grubuna göre, LPS verilen 2. Gruptaki FGF21 düzeyleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştır. Literatür ile uyumlu olarak, FGF21 düzeyleri inflamasyon meydana gelmesi ile serumda yükselmiştir. 2. Grup ve LPS öncesi metformin verilen 3. Grup arasındaki FGF21 düzeyleri kıyaslandığında ise, 3. Grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma meydana gelmiştir. 3. Grupta, metforminin LPS'nin oluşturduğu inflamasyon üzerinde koruyucu bir etki sağladığı için, FGF21 düzeylerinde azalma meydana geldiği düşünölmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, kontrol grubuna oranla, tedavi gruplarında FGF21 oranlarının yüksek olması, metforminin FGF21 üretimini indüklediğini göstermektedir. Ancak, en yüksek FGF21 düzeylerinin hasta grubunda olması, FGF21 üretiminin özellikle inflamasyon ile indüklediğini, metforminin inflamatuvar yanıtta meydana getirdiği azalma ile FGF21 düzeylerinde düşüş meydana geldiği görölmüştür.

Karaciğer doku sonuçlarına bakıldığında, kontrol grubuna oranla tüm diğer gruplardaki FGF21 değerleri istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı artış göstermiştir. Bu durum, hem inflamasyonun, hem de metforminin, karaciğerde FGF21 üretimini arttırdığını göstermektedir. FGF21'in, metformin ile paralel olarak, inflamasyonda koruyucu bir metabolit olarak salgısının arttığı görölmektedir. Bunun yanı sıra, 2. Grup olan LPS grubuna kıyasla, tedavi gruplarındaki FGF21 değerleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalış göstermiştir. Metforminin, karaciğerdeki inflamatuvar hasarı düzeltmeye

yönelik etki gösterdiği ve FGF21'in de paralel olarak üretiminin azaldığı yorumu yapılabilir. LPS grubunda, FGF21 düzeylerinin en yüksek değerlerde olması, inflamasyon sonrası FGF21'in karaciğer hasarına karşı koruyucu olarak üretiminin arttığını göstermektedir.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, 2. gruptaki ratların karaciğerlerinde artan MDA konsantrasyonları ve MPO aktivitesi, serumda yükselen ALT ve AST aktiviteleri, LPS'nin karaciğerde ciddi düzeyde hasar meydana getirdiğini göstermektedir. Artmış TNF- α ve IL-10 düzeyleri, histolojik incelemede görülen nötrofil infiltrasyonu ve bozulmuş yapıdaki hepatositler, ileri düzeyde bir inflamatuvar hasarın oluştuğunu ortaya koymaktadır. FGF21 düzeyleri incelendiğinde ise, özellikle LPS uygulanan grupta en yüksek sonuçların belirlenmesi, FGF21'in inflamasyon ile birlikte karaciğerden salınımı artan bir akut faz medyatörü olduğunu göstermektedir. Metformin uygulanan gruplardaki sonuçlar, metforminin özellikle inflamatuvar yanıtı tetikleyen LPS'den önce verildiğinde, inflamasyonu başarılı bir şekilde baskıladığını göstermiştir. LPS'den 1 saat sonra uygulandığında nispeten düzelmiş sonuçlar olsa da, 3. saatte metformin uygulanan grupta, LPS grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir. Uygulama süresinin diğer gruplara göre daha uzun olmasından kaynaklı, metformin etkinliği azalmış ve inflamasyonu baskılamada yetersiz kalmış olabilir.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, gerek serum ve karaciğer homojenatındaki biyokimyasal parametreler, gerekse de karaciğer dokularının histolojik incelemelerine bakıldığında, LPS'nin ratlarda, inflamasyon açısından ciddi ve belirgin bir hasar meydana getirdiği görülmektedir. Histopatolojik incelemeler LPS'nin karaciğerde iltihap ve hepatosellüler dejenerasyonlara yol açtığını, serumda ve karaciğerde bakılan oksidatif stres ve inflamatuvar belirteçlerin yüksek olması da sistemik bir inflamasyonun meydana geldiğini göstermektedir. Tedavi gruplarında ise, 3. Grup olan LPS öncesi metforminde, hem biyokimyasal parametrelerin hem de histolojik inceleme sonuçlarının kontrol grubuna yakın düzeylerde çıkması, metforminin inflamasyona karşı belirgin bir koruyucu etki sağladığını göstermektedir. 4. Grup olan LPS sonrası 1. Saatte metformin verilen grupta, nispeten düzelmiş değerler görülse de, özellikle 5. Grup olan LPS sonrası 3. Saatte metformin uygulanan grupta, hasta gruba yakın histolojik ve biyokimyasal bulgular olması, metforminin inflamasyon oluştuktan sonra tedavi etme durumunda yetersiz kaldığını göstermektedir. Literatürdeki pek çok çalışmaya bakıldığında da, metforminin inflamasyonda baskılayıcı değil, koruyucu etkisi ön plana çıkmaktadır. Sonuçlarımız, metforminin sepsis riski altında bulunan hastalar için koruyucu özellik gösterebileceğini düşündürmüştür. İnflamasyon sonrasında metforminin etkinliğini incelemek için, farklı doz ve süreler ile yapılacak olan çalışmalar yararlı olabilir.

Çalışmamızda, LPS sonucu gelişen inflamasyonun kontrolünde, metforminin yanı sıra FGF21 düzeylerini de inceledik. Sonuçlar değerlendirildiğinde, FGF21'in inflamasyon sonucunda koruyucu bir metabolit olarak üretiminin indüklendiği görülmüştür. Metformin ile birlikte, özellikle karaciğerde üretiminin arttığı ve benzer yollar üzerinden metforminin koruyucu etkisine katkı sağladığı yorumu yapılabilir. Sonuçlarımız, FGF21'in sadece bir büyüme faktörü olarak değil, aynı zamanda metabolik düzenleyici bir medyatör olarak da inflamasyonda görev yaptığını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbas AK, Lichtman AH, & JS., P. (2000). *Cytokine In "Cellular and Molecular Immunology"*: WB Saunders Company Philadelphia.
- Ahmed, A. U. (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, 6(4), 274. doi:10.1007/s11515-011-1123-9
- Bal, F., Bekpinar, S., Unlucerci, Y., Kusku-Kiraz, Z., Onder, S., Uysal, M., & Gurdol, F. (2014). Antidiabetic drug metformin is effective on the metabolism of asymmetric dimethylarginine in experimental liver injury. *Diabetes Res Clin Pract*, 106(2), 295-302. doi:10.1016/j.diabres.2014.08.028
- Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 118(2), 413-420. doi:10.1172/jci34431
- Bergheim, I., Luyendyk, J. P., Steele, C., Russell, G. K., Guo, L., Roth, R. A., & Arteel, G. E. (2006). Metformin prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *J Pharmacol Exp Ther*, 316(3), 1053-1061. doi:10.1124/jpet.105.092122
- Beutler, B., & Cerami, A. (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem*, 57, 505-518. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.002445
- Bosmann, M., & Ward, P. A. (2013). The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*, 34(3), 129-136. doi:10.1016/j.it.2012.09.004
- Cariello, M., & Moschetta, A. (2014). Fibroblast Growth Factor 21: A New Liver Safeguard. *Hepatology*, 60(3), 792-794. doi:10.1002/hep.27147
- Chen, W., Liu, X., & Ye, S. (2016). Effects of metformin on blood and urine pro-inflammatory mediators in patients with type 2 diabetes. *Journal of Inflammation*, 13(1), 34. doi:10.1186/s12950-016-0142-3
- Chen, W. F., & Zlotnik, A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol*, 147(2), 528-534.
- Cho, Y. K., Choi, Y. H., Kim, S. H., & Lee, M. G. (2009). Effects of Escherichia coli lipopolysaccharide on the metformin pharmacokinetics in rats. *Xenobiotica*, 39(12), 946-954. doi:10.3109/00498250903215994
- Cicione, C., Degirolamo, C., & Moschetta, A. (2012). Emerging Role of Fibroblast Growth Factors 15/19 and 21 as Metabolic Integrators in the Liver. *Hepatology*, 56(6), 2404-2411. doi:10.1002/hep.25929
- Cuevas-Ramos, D., Aguilar-Salinas, C. A., & Gomez-Perez, F. J. (2012). Metabolic actions of fibroblast growth factor 21. *Current Opinion in Pediatrics*, 24(4), 523-529. doi:10.1097/MOP.0b013e3283557d22
- Davis, B. J., Xie, Z., Viollet, B., & Zou, M. H. (2006). Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes*, 55(2), 496-505.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., Roncarolo, M. G., Spits, H., & de Vries, J. E. (1992). Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*, 4(3), 314-320.
- Er, A., Yazar, E., Uney, K., Elmas, M., Altan, F., & Cetin, G. (2010). Effects of tylosin on serum cytokine levels in healthy and lipopolysaccharide-treated mice. *Acta Vet Hung*, 58(1), 75-81. doi:10.1556/AVet.58.2010.1.8
- Fan, H., Sun, X. M., Zhang, H., Liu, J., Zhang, P. R., Xu, Y., . . . Wang, G. (2016). Effect of Metformin on Fibroblast Growth Factor-21 Levels in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 18(3), 120-126. doi:10.1089/dia.2015.0261
- Faraj, T. A., McLaughlin, C. L., & Erridge, C. (2017). Host defenses against metabolic endotoxaemia and their impact on lipopolysaccharide detection. *Int Rev Immunol*, 36(3), 125-144. doi:10.1080/08830185.2017.1280483
- Feghali, C. A., & Wright, T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 2, d12-26.
- Feingold, K. R., Grunfeld, C., Heuer, J. G., Gupta, A., Cramer, M., Zhang, T., . . . Kharitonov, A. (2012). FGF21 is increased by inflammatory stimuli and protects leptin-deficient ob/ob mice from the toxicity of sepsis. *Endocrinology*, 153(6), 2689-2700. doi:10.1210/en.2011-1496
- Fon Tacer, K., Bookout, A. L., Ding, X., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., . . . Kliwer, S. A. (2010). Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Molecular Endocrinology*, 24(10), 2050-2064. doi:10.1210/me.2010-0142
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 8 Suppl 2, S3. doi:10.1186/ar1917
- Gnauck, A., Lentle, R. G., & Kruger, M. C. (2016). The Characteristics and Function of Bacterial Lipopolysaccharides and Their Endotoxic Potential in Humans. *Int Rev Immunol*, 35(3), 189-218. doi:10.3109/08830185.2015.1087518
- Gongol, B., Marin, T., Peng, I. C., Woo, B., Martin, M., King, S., . . . Shyy, J. Y. (2013). AMPKalpha2 exerts its anti-inflammatory effects through PARP-1 and Bcl-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), 3161-3166. doi:10.1073/pnas.1222051110
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*, 177(2), 751-766.
- Gour, N., & Wills-Karp, M. (2015). IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease. *Cytokine*, 75(1), 68-78. doi:10.1016/j.cyto.2015.05.014

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Grutz, G. (2005). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol*, 77(1), 3-15. doi:10.1189/jlb.0904484
- Haugaard, N. (1968). Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol Rev*, 48(2), 311-373.
- Hyun, B., Shin, S., Lee, A., Lee, S., Song, Y., Ha, N. J., . . . Kim, K. (2013). Metformin Down-regulates TNF-alpha Secretion via Suppression of Scavenger Receptors in Macrophages. *Immune Netw*, 13(4), 123-132. doi:10.4110/in.2013.13.4.123
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., . . . Kliewer, S. A. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metabolism*, 5(6), 415-425. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.003
- Inagaki, T., Lin, V. Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2008). Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metabolism*, 8(1), 77-83. doi:10.1016/j.cmet.2008.05.006
- Ishibashi, Y., Matsui, T., Takeuchi, M., & Yamagishi, S. (2012). Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced renal tubular cell injury by suppressing reactive oxygen species generation via reducing receptor for AGEs (RAGE) expression. *Horm Metab Res*, 44(12), 891-895. doi:10.1055/s-0032-1321878
- Isoda, K., Young, J. L., Zirlik, A., MacFarlane, L. A., Tsuboi, N., Gerdes, N., . . . Libby, P. (2006). Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(3), 611-617. doi:10.1161/01.atv.0000201938.78044.75
- Kalaz, E. B., Aydin, A. F., Dogan-Ekici, I., Coban, J., Dogru-Abbasoglu, S., & Uysal, M. (2016). Protective effects of carnosine alone and together with alpha-tocopherol on lipopolysaccharide (LPS) plus ethanol-induced liver injury. *Environ Toxicol Pharmacol*, 42, 23-29. doi:10.1016/j.etap.2015.12.018
- Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., . . . Shanafelt, A. B. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1627-1635. doi:10.1172/JCI23606
- Kharitonov, A., Wroblewski, V. J., Koester, A., Chen, Y. F., Clutinger, C. K., Tigno, X. T., . . . Etgen, G. J. (2007). The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*, 148(2), 774-781. doi:10.1210/en.2006-1168

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kim, S. A., & Choi, H. C. (2012). Metformin inhibits inflammatory response via AMPK-PTEN pathway in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(4), 866-872. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.165
- Klebanoff, S. J. (1999). Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*, 111(5), 383-389.
- Kolaç, U. K. (2015). *Salvia Officinalis Ekstresinin Deneysel İnflamasyon Ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi*. (Yüksek Lisans Tezi), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., & Lu, S. D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 53(1), 45-53.
- Kuralay, F., & Çavdar, Z. (2006). İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg*, 16(3).
- Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., . . . Ramsay, G. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*, 31(4), 1250-1256. doi:10.1097/01.ccm.0000050454.01978.3b
- Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*, 65(12 Pt 2), S140-146.
- Maida, A., Lamont, B. J., Cao, X., & Drucker, D. J. (2011). Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice. *Diabetologia*, 54(2), 339-349. doi:10.1007/s00125-010-1937-z
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Moshage, H. (1997). Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol*, 181(3), 257-266. doi:10.1002/(sici)1096-9896(199703)181:3<257::aid-path756>3.0.co;2-u
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846-852. doi:10.1038/nature01320
- Nemeth, E., Baird, A. W., & O'Farrelly, C. (2009). Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol*, 31(3), 333-343. doi:10.1007/s00281-009-0173-4
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*, 1492(1), 203-206.
- Nygaard, E. B., Vienberg, S. G., Orskov, C., Hansen, H. S., & Andersen, B. (2012). Metformin stimulates FGF21 expression in primary hepatocytes. *Exp Diabetes Res*, 2012, 465282. doi:10.1155/2012/465282

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ohkawa, H., Ohisi, N., Yagi, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358
- Ouslimani, N., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Legrand, A., & Beaudeau, J. L. (2005). Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism*, 54(6), 829-834. doi:10.1016/j.metabol.2005.01.029
- Özbal, Y. (2000). *Temel İmmünoloji* (2 ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd ğti.
- Pandey, A., & Kumar, V. L. (2016). Protective Effect of Metformin against Acute Inflammation and Oxidative Stress in Rat. *Drug Dev Res*, 77(6), 278-284. doi:10.1002/ddr.21322
- Pengal, R. A., Ganesan, L. P., Wei, G., Fang, H., Ostrowski, M. C., & Tridandapani, S. (2006). Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by the serine/threonine kinase Akt. *Molecular Immunology*, 43(10), 1557-1564. doi:10.1016/j.molimm.2005.09.022
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giral, M., & Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovascular Research*, 106(1), 19-31. doi:10.1093/cvr/cvu263
- Powers, C. J., McLeskey, S. W., & Wellstein, A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*, 7(3), 165-197.
- Presta, M., Chiodelli, P., Giacomini, A., Rusnati, M., & Ronca, R. (2017). Fibroblast growth factors (FGFs) in cancer: FGF traps as a new therapeutic approach. *Pharmacology & Therapeutics*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.013>
- Quaile, M. P., Melich, D. H., Jordan, H. L., Nold, J. B., Chism, J. P., Polli, J. W., . . . Rhodes, M. C. (2010). Toxicity and toxicokinetics of metformin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 243(3), 340-347. doi:10.1016/j.taap.2009.11.026
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
- Robinson, M. W., Harmon, C., & O'Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*, 13(3), 267-276. doi:10.1038/cmi.2016.3
- Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F., & Kono, H. (2010). The sterile inflammatory response. *Annual review of immunology*, 28, 321-342. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101311

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ryan, G. B., & Majno, G. (1977). Acute inflammation. A review. *Am J Pathol*, 86(1), 183-276.
- Saisho, Y. (2015). Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 15(3), 196-205.
- Singhal, G., Fisher, F. M., Chee, M. J., Tan, T. G., El Ouaamari, A., Adams, A. C., . . . Maratos-Flier, E. (2016). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Protects against High Fat Diet Induced Inflammation and Islet Hyperplasia in Pancreas. *PLoS ONE*, 11(2). doi:ARTN e0148252
10.1371/journal.pone.0148252
- Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., Kurosawa, S., & Remick, D. G. (2011). The Pathogenesis of Sepsis. *Annual review of pathology*, 6, 19-48. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130327
- Steimle, A., Autenrieth, I. B., & Frick, J. S. (2016). Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol*, 306(5), 290-301. doi:10.1016/j.ijmm.2016.03.001
- Stenvinkel, P., Ketteler, M., Johnson, R. J., Lindholm, B., Pecoits-Filho, R., Riella, M., . . . Girndt, M. (2005). IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int*, 67(4), 1216-1233. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00200.x
- Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G., & Gerich, J. E. (1995). Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 333(9), 550-554. doi:10.1056/nejm199508313330903
- Suzuki K., Ota H., Sasagawa S., Sakatani T., Fujikura T., 1983, Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.*, 132:345-352.
- Tuzlalı, S., Güllüoğlu, Mine, Çevikbaş, Uğur. (2014). *Robbins Temel Patoloji* (9 ed.). İstanbul: Nobel Kitabevi.
- Vaez, H., Najafi, M., Toutouchi, N. S., Barar, J., Barzegari, A., & Garjani, A. (2016). Metformin Alleviates Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury through Suppressing Toll-like Receptor 4 Signaling. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 15(6), 498-507.
- Vincent, J. L., Opal, S. M., Marshall, J. C., & Tracey, K. J. (2013). Sepsis definitions: time for change. *Lancet*, 381(9868), 774-775. doi:10.1016/s0140-6736(12)61815-7
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, 122(6), 253-270. doi:10.1042/cs20110386

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Wang, Y., Dang, N., Sun, P., Xia, J., Zhang, C., & Pang, S. (2017). The effects of metformin on fibroblast growth factor 19, 21 and fibroblast growth factor receptor 1 in high-fat diet and streptozotocin induced diabetic rats. *Endocrine Journal*, 64(5), 543-552. doi:10.1507/endocrj.EJ16-0391
- Warren, J. S. (1990). Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 28(1), 37-59. doi:10.3109/10408369009105897
- Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Smith, K. P., Martin, D., & Maier, S. F. (1994). Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res*, 654(1), 15-26.
- Yan, D., Liu, H. L., Yu, Z. J., Huang, Y. H., Gao, D., Hao, H., . . . Zhou, X. Y. (2016). BML-111 Protected LPS/D-GalN-Induced Acute Liver Injury in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7). doi:10.3390/ijms17071114
- Yie, J., Wang, W., Deng, L., Tam, L. T., Stevens, J., Chen, M. M., . . . Wang, M. (2012). Understanding the physical interactions in the FGF21/FGFR/beta-Klotho complex: structural requirements and implications in FGF21 signaling. *Chem Biol Drug Des*, 79(4), 398-410. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01325.x
- Yu, Y., He, J., Li, S., Song, L., Guo, X., Yao, W., . . . Li, D. (2016). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibits macrophage-mediated inflammation by activating Nrf2 and suppressing the NF-kappaB signaling pathway. *Int Immunopharmacol*, 38, 144-152. doi:10.1016/j.intimp.2016.05.026
- Yuan, H., Li, L., Zheng, W., Wan, J., Ge, P., Li, H., & Zhang, L. (2012). Antidiabetic drug metformin alleviates endotoxin-induced fulminant liver injury in mice. *Int Immunopharmacol*, 12(4), 682-688. doi:10.1016/j.intimp.2012.01.015
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
- Zhou, Z. Y., Ren, L. W., Zhan, P., Yang, H. Y., Chai, D. D., & Yu, Z. W. (2016). Metformin exerts glucose-lowering action in high-fat fed mice via attenuating endotoxemia and enhancing insulin signaling. *Acta Pharmacol Sin*, 37(8), 1063-1075. doi:10.1038/aps.2016.21

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Ezgi Kar
Doğum tarihi ve yeri : 18.06.1990/Ankara
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresleri : yaverezgi@gmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : Cumhuriyet İlköğretim Okulu (1996 – 2001)
Ortaöğretim : Noterler Birliği İlköğretim Okulu (2001 – 2004)
Lise : Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi (2004 - 2008)
Üniversite : Ege Üniversitesi/Biyokimya Bölümü (2008 – 2012)

Mesleki Deneyim : ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD, Araştırma Görevlisi (2015 -)

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: Türk Biyokimya Derneği

Yayınlar (tez) : Uluslararası Biyokimya Kongresi 2017, 28. Ulusal Biyokimya Kongresi SS-046 özet numaralı Sözlü Bildiri

Bilimsel Etkinlikler

Projeler : 2016-1353 numaralı ESOGÜ BAP A1 projesi

Kurslar ve Eğitim Programları : İügen Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi (Mart, 2016)