

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

**DENEYSEL SEPSİS MODELİ OLUŞTURULAN RATLARDA S-
ALLİLSİSTEİN'İN TRANSGLUTAMİNAZ II ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORHAN BAYRAKTAR

DANIŐMAN

Yrd. Doç. Dr. FAHRETTİN AKYÜZ

ŐUBAT 2013

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

**DENEYSEL SEPSİS MODELİ OLUŞTURULAN RATLARDA S-
ALLİLSİSTEİN'İN TRANSGLUTAMİNAZ II ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORHAN BAYRAKTAR

DANIŐMAN

Yrd. Doç. Dr. FAHRETTİN AKYÜZ

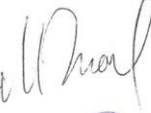
ŐUBAT 2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Orhan BAYRAKTAR'ın **Yüksel Lisans Tezi** olarak hazırladığı '**DeneySEL Sepsis Modeli Oluşturulan Ratlarda S-Alil Sistein'in Transgluteminaz II Üzerine Etkileri**' başlıklı bu çalışma, jürimiz Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

20.02.2013

ÜYE: Prof. Dr. Mine İNAL



ÜYE: Prof. Dr. Ömer ÇOLAK



ÜYE: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCI



ÜYE: Prof. Dr. Sema USLU



ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Fahrettin AKYÜZ



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulu'nun
01.03.2013 Tarih ve 947.446 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR



Enstitü Müdürü

ÖZET

Sepsis, mikroorganizma veya toksinlerinin normalde steril olan dokulara ve kana geçmesi ve vücudun bu invazyona verdiği yanıttır. Bu çalışmada Lipopolisakkarit (LPS) ile sepsis modeli oluşturulan ratlara verilen antioksidan özelliğe sahip S-Allil Sistein (SAC)'in nükleer faktör kapa-B ile indüklenen Transglutaminaz 2 aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. S-allylcysteine antioksidan özelliklere sahip bir sarımsak bileşimidir. Aynı zamanda, oksidatif stres ile ilişkili çeşitli deneysel modellerde sarımsak ekstresinin koruyucu etkisinden sorumlu aktif bileşiklerden biri olduğu gösterilmiştir. SAC'ın antioksidan özelliği ve reaktif oksijen radikallerini kovucu etkisi bilinmesine karşın literatürlerde sepsisteki etkisi bilinmemektedir.

Çalışmamızda 32 adet 3-4 aylık erkek wistar albino cinsi ratlar kullanılarak Kontrol, SAC, SEPSİS ve SEPSİS+SAC olmak üzere dört deneysel grup oluşturuldu. Tek doz LPS(5 mg/kg) ile sepsis modeli oluşturulan ratlara sepsis oluştuktan sonra 12 saatte bir 2 gün boyunca SAC(50mg/kg) gavaj yolu ile verildi. Ratların serumlarında ALT, AST, ALP, hsCRP, karaciğer dokularında ise Miyeloperoksidaz (MPO), DNA Fragmentasyonu, Nitrik Oksit, Transglutaminaz 2 ölçüldü.

Sepsis oluşturulan grubun ALT , AST, ALP, hsCRP, DNA Fragmentasyonu ve TG2 parametrelerinde kontrol grubuna göre artış gözlemlendi. Sepsis grubunun NO ve MPO aktivitelerinde ise kontrol grubuna göre artış görülmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Tedavi amaçlı SAC verildiğinde ise SAC'ın ALT, AST, ALP, hsCRP, DNA Fragmentasyonu üzerinde olumlu azaltıcı etkileri olduğu gözlemlendi. TG2, NO ve MPO aktivitelerinde ise SAC'ın anlamlı olmamasına rağmen azaltıcı etkisi olduğu saptandı.

Çalışmamızda, ratların karaciğer dokusunda LPS ile indüklenen sepsis modelinde özellikle DNA Fragmantasyonu ve TG2'yi arttırdığı, SAC'ın, çalışılan tüm parametreler üzerine olumlu azaltıcı etkileri olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, SAC, MPO, NO, Transglutaminaz 2

SUMMARY

Sepsis is the body's response to this invasion which micro-organisms or toxins through normally sterile tissues and blood. In this experiment, the effects of the S-allyl cysteine (SAC) which has the antioxidant properties, in LPS rats with sepsis model on the activity of transglutaminase 2 is investigated. The S-allylcysteine is a garlic compound which has an antioxidant properties. Also, a variety of experimental models associated with oxidative stress responsible for the protective effect of garlic extracts was shown to be one of the active compounds. SAC known for its antioxidant properties and repellent effect on reactive oxygen radicals, but the effect on sepsis is not known in the literature.

Four experiment groups that called 'Control, SAC, Sepsis and Sepsis+SAC' were created by using 32 male wistar albino rats in this experiment. Sepsis model is created by given single dose LPS(5mg/kg) to rats and after the model is generated, SAC(50mg/kg) was injected by gavaj method per 12 hours during 2 days. ALT, AST, ALP, hsCRP in the rats' blood and Myeloperoxidase, DNA fragmentation, Nitric Oxide, Transglutaminase 2 in liver tissue were measured.

The increase was observed according to the control group in ALT, AST, ALP, hsCRP, DNA fragmentation and TG2 parameters of the Sepsis groups. NO and MPO activities in sepsis group according to the control group the differences were observed in the graphs but there were no statistic differences observed in the parameters that were mentioned. It is observed that SAC has a positive reducing effect on ALT, AST, ALP, hsCRP, DNA fragmentation when it is given as a treatment. According to the graphs SAC has a reducing effect in NO, MPO and TG2 activities but there is no statically reducing effect.

In this study, the liver tissue of rats with LPS-induced sepsis model in particular DNA fragmentation and TG2 increase, SAC, reducing the positive effects on all the parameters studied was observed.

Key Words: Sepsis, SAC, MPO, NO, Transglutaminaz 2

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ.....	xi
TABLO DİZİNİ.....	xii
GRAFİK DİZİNİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 SEPSİS	3
2.1.1 EPİDEMİYOLOJİ	4
2.1.2 ETYOLOJİ.....	5
2.1.3 ENDOTOKSİN.....	6
2.1.4 PATOFİZYOLOJİ	8
2.2 SEPSİSTE NİTRİK OKSİTİN(NO) ROLÜ	10
2.3 SEPSİSTE OKSİDAN SİSTEMLER	11
2.3.1 SERBEST RADİKALLER	11
2.3.1.1 OKSİJEN TÜREVİ SERBEST RADİKALLER	12
2.4 SEPSİSTE TRANSGLUTAMİNAZ 2.....	13
2.5 SEPSİSTE MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİ	14
2.6 SEPSİSTE DNA FRAGMENTASYONU	16

2.6.1	SEPSİSTE APOPTOSİS.....	16
2.7	SEPSİSİN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİ.....	17
2.8	AMİNOTRANSFERAZLAR (ALT VE AST).....	19
2.9	C-REAKTİF PROTEİN.....	19
2.10	SARIMSAK.....	20
2.11	S-ALLİL SİSTEİN (DEOKSİALLİN,SAC).....	21
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1	GEREÇLER	23
3.1.1	DENEY HAYVANLARI	23
3.1.2	KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER	24
3.1.3	KULLANILAN AYGIT VE GEREÇLER	25
3.2	YÖNTEMLER	26
3.2.1	MADDELERİN UYGULAMASI	26
3.2.2	KAN VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ..	27
3.2.3	KARACİĞER DOKUSU DNA FRAGMENTASYONU ÖLÇÜMÜ.....	27
3.2.4	KARACİĞER DOKUSU NİTRİK OKSİT ÖLÇÜMÜ	29
3.2.5	KARACİĞER MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ	30
3.2.6	KARACİĞER DOKUSU TG2 AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ	31
3.2.7	KARACİĞER DOKUSU PROTEİN ÖLÇÜMÜ	32
3.2.8	SERUM ALT, AST, ALP VE hsCRP ÖLÇÜMÜ.....	33
3.2.9	İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	35
4.	BULGULAR	36
5.	TARTIŞMA	44
6.	SONUÇLAR	52
7.	KAYNAK DİZİNİ	54

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİL DİZİNİ

ŞEKİL 1: Gram-negatif bakterinin etki mekanizması	7
ŞEKİL 2: Sepsiste organ yetmezliği gelişimi	9
ŞEKİL 3: Nitrik oksitin L-arginin aminoasitinden sentezi	10
ŞEKİL 4: NO üretimi ve endotel hasar oluşumu	11
ŞEKİL 5: TG2'nin katalizlediği reaksiyonlar	13
ŞEKİL 6: Sepsiste TG2 yolağı.....	14
ŞEKİL 7: Aktive olmuş nötrofillerden salınan miyeloperoksidaz enzimi	15
ŞEKİL 8: Sepsiste apoptosis yolakları.....	17
ŞEKİL 9: Serbest oksijen radikallerinin ve endotoksinin karaciğerdeki apoptosis yolağı.....	18
ŞEKİL 10: AST ve ALT reaksiyonları.....	19
ŞEKİL 11: SAC'ın kimyasal yapısı.....	22

TABLO DİZİNİ

TABLO 1: Serum ALP aktiviteleri	36
TABLO 2: Serum Aspartat amino transferaz (AST) aktiviteleri	37
TABLO 3: Serum ALT aktiviteleri.....	38
TABLO 4: Serum hsCRP düzeyleri	39
TABLO 5: Karaciğer dokusu MPO aktivitesi	40
TABLO 6: Karaciğer dokusu NO düzeyleri	41
TABLO 7: Karaciğer dokusu DNA Fragmantasyonu	42
TABLO 8: Karaciğer dokusu Transglutaminaz 2 aktivitesi	43

GRAFİK DİZİNİ

GRAFİK 1: Serum Alkalen Fosfataz (ALP) aktiviteleri.....	36
GRAFİK 2: Serum Aspartat amino transferaz (AST) aktiviteleri	37
GRAFİK 3: Serum Alanin amino transferaz (ALT) aktiviteleri.....	38
GRAFİK 4: Serum C-reaktif protein (hsCRP) düzeyleri	39
GRAFİK 5: Karaciğer dokusu MPO aktivitesi	40
GRAFİK 6: Karaciğer dokusu NO düzeyleri.....	41
GRAFİK 7: Karaciğer dokusu DNA Fragmantasyonu düzeyleri	42
GRAFİK 8: Karaciğer dokusu TG2 düzeyleri	43

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP: Alkalen Fosfataz

ALT: Alanin Aminotransferaz

AST: Aspartat Aminotransferaz

DNA: Deoksirübönükleik Asid

SAC: S- Allil Sistein

LPS: Lipopolisakkarid

MPO: Miyeloperoksidaz

TG2: Transglutaminaz 2

MODS: Multiple Organ Disfonksiyon Sendromu

CRP: C- Reaktif protein

TNF-alfa: Tümör Nekrosis Faktör Alfa

IL-1: İnterlökin 1

IL-6: İnterlökin 6

LBP: Lipopolisakkarid Bağlayıcı Protein

TLR: Tollike reseptör

NF-κB: Nükleer Faktör Kappa B

ROS: Reaktif Oksijen Radikalleri

SOD: Süperoksid Dismutaz

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

NO: Nitrik Oksit

NADPH: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

CAT: Katalaz

GOT: Glutamat Oksaloasetat Transaminaz

GPT: Glutamat Pirüvat Transaminaz

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis, "konağın enfeksiyona karşı gösterdiği kontrolsüz inflamatuvar yanıt" olarak tanımlanmaktadır. İnfeksiyona karşı vücudun sistemik inflamatuvar yanıtı ile başlayan sepsis, ciddi sepsis, septik şok ve sonunda başlangıçtaki hasar bölgesinden uzaktaki organlarda önce işlev bozukluğuna takiben de organ yetmezliklerinin gelişmesine yol açar ve hastanın kaybedilmesine neden olabilir (19,55). Sepsisin ilerlemesi organizmadaki birçok organ ve sistemi (akciğer, karaciğer, böbrek, kardiyovasküler, hematolojik, gastrointestinal, nörolojik, endokrin ve immün) etkiler (13). Sepsisi tetikleyen moleküllerin başında, gram negatif bakteri hücre duvarı komponentlerinden endotoksin gelir.

Endotoksinin ortaya çıkardığı jeneralize yanıt, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar mediyatörler (sitokinler, adezyon molekülleri) ile birlikte hem hücresel hem de hümmoral yolu kapsar (100). Genellikle inflamatuvar reaksiyonlar, sitokinler aracılığıyla başlatılır (63). İnflamasyon bölgesindeki lökosit birikimi birçok aşamayı kapsayan ardışık olaylar zinciridir. Bu kaskada, çözünmüş ve membrana bağlı faktörler ile endotel hücresi ve lökosit üzerindeki adezyon molekülleri arasındaki ilişki aracılık eder (37,100). Ağır sepsisin pek çok belirti ve bulgusundan sorumlu olan da dolaşımdaki tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) gibi inflamasyon mediatörleridir (53,117). Bunların aktifleşmesi ile dokularda hasarlanma meydana gelir. Sonuç olarak sepsiste enfeksiyonun kendisinden çok, inflamatuvar sonuçları daha büyük bir sorun gibi görünmektedir (100).

Nitrik oksit bir yarı esansiyel aminoasit olan L-argininden sentezlenir. Endotel hücrelerinde damar düz kas hücrelerinde, makrofajlarda, nötrofillerde endotoksin ve IL-1, TNF-alfa gibi sitokinlerce indüklenen nitrik oksit sentaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzim bir kez eksprese olduktan sonra uzun bir süre büyük miktarlarda nitrik oksit yapımını sağlar (26).

Reaktif oksijen türevleri, sepsiste, çapraz bağlantılı hücresel proteinlerin ve lipit membranının peroksidasyonu sonucu DNA ve doku hasarı meydana getirir. Lipit peroksidasyonu sonucunda membran akışkanlığı azalır, geçirgenliği artar, hücre bütünlüğü ve hayati hücre fonksiyonları bozulur. Sonuç olarak, sepsisli olgularda

multiorgan yetmezliği gibi tabloların ortaya çıkması bu mekanizmalar sonucunda olur (30).

Miyeloperoksidaz enzimi ise inflamasyonda n6trofil infiltrasyonunun bir g6stergesi olup savunma sisteminin, hipoklor6z asid (HOCl) üretimini katalizlediğinden 6t6r6 en 6nemli bakterisidal silahıdır.

TG2, h6cre 6l6mlerinde g6rev alan, h6cre iskeleti yenileyen ve ekstraselluler matrix stabilizasyonu yapan multifonksiyonel bir enzimidir. TG2, proteinlerin posttranslasyon modifikasyonlarını, yani 6rnek olarak protein–protein kros bağları, glutamin deamidasyonu ve aminlerin birleşmesini kataliz eden kalsiyum bağımlı bir enzimidir. TG2'nin anormal aktivasyonu ya da TG2 fonksiyonun deregulasyonu çeşitli hastalıklarda bulunur. Buna 6rnek olarak diabet ve romatoid artrit verilebilir. Aynı zamanda sepsiste de TG2 ekspresyonunun birçok doku ve organda LPS ile ind6klendiği bildirilmiştir (41,72,73,99,101,102).

S-Allilsistein (SAC) organo s6lf6r yapıda, suda 6z6nebilen, nontoksik 6zellikte sarımsak bileşenidir. İn-vitro ve in-vivo çalışmalarda antioksidan etkisi g6sterilmiştir. Çalışmalarda S-Allilsistein'in O[•], OH, H₂O₂ ve peroksinitrit radikallerini kovucu etkisi olduğu ve H₂O₂ ind6kl6 NF-kB aktivasyonunu baskıladığı belirtilmiştir. Yine iNOS ekspresyonunu vasıtası ile NO salınımını inhibe ettiği g6sterilmiştir (35).

B6t6n bu verilerin işığı altında, alışmamızda LPS ile sepsis modeli oluşturduğumuz ratların karaciğer dokularında SAC'ın TG2, DNA Fragmantasyonu, NO, MPO aktiviteleri 6zerine etkilerini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SEPSİS

Sepsis; yoğun bakım ünitelerinde en sık karşılaşılan ölüm nedenlerindedir. İskemi, yanık, majör travma gibi konağa zarar veren infeksiyöz veya noninfeksiyöz bir süreç başlatıldığında, konağı korumaya yönelik inflamatuvar yanıt neden olur. Normal koşullarda inflamatuvar yanıt, konakta inflamasyonun zararlı etkilerini inaktive etme yeteneğine sahip bazı antioksidan maddelerin salınımına sebep olur. Bu olayla; hem konağa zarar veren hem de inflamatuvar yanıtla meydana gelen doku hasarı önlenmeye çalışılır. İlk başlarda konağı korumaya yönelik olan bu inflamatuvar yanıt ardından toksik oksijen radikallerinin ve proteolitik enzimlerin salınmasına yol açarak konağa zarar verebilir. İnflamatuvar yanıt, konağın endojen yanıtının başa çıkamayacağı kadar şiddetli ise yayılarak doku hasarına neden olur. Bu progresif inflamatuvar yanıtın klinik akıbeti ise multipl organ disfonksiyon sendromudur (MODS)(114).

Sepsis, sepsis sendromu ve septik şok aynı hastalığın devreleri olarak kabul edilebilir. İnflamatuvar cevabın çeşitli dönemlerini ortaya koymak üzere belli tanımlamalar yapılmıştır.(13,19)

İnfeksiyon: Normal konakta, mikroorganizma invazyonu sonucunda ortaya çıkan inflamatuvar yanıttır.

Bakteriyemi: Kanda canlı bakteri bulunma durumudur. Virüs (viremi), mantar (fungemi), parazit (parazitemi) ve diğer patojenlerin kanda bulunmasına benzer şekilde ifade edilmektedir.

Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIYS): Herhangi bir nedene bağlı olarak gelişen inflamatuvar yanıt ile birlikte aşağıdaki bulgulardan en az iki veya daha fazlasını içermesi durumudur.

- Vücut ısısı $> 38^{\circ}\text{C}$ veya $< 36^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı > 90 vuruş/dakika
- Solunum hızı > 20 /dakika veya $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- Lökosit $> 12000/\text{mm}^3$ veya $< 4000/\text{mm}^3$, $> \% 10$ band formasyonu

SIYS, infeksiyon dışından; yanıklar, iskemi, travma, doku yaralanmaları nedenli organ hasarları sonucunda da gelişebilmektedir.

Sepsis: İnfeksiyona bağlı gelişen inflamatuvar yanıt ile birlikte aşağıdaki bulgulardan en az iki veya daha fazlasının bulunması ile gerçekleşir.

- Vücut ısısı > 38 °C veya < 36 °C
- Kalp hızı > 90 vuruş/dakika
- Solunum hızı > 20/dakika veya PaCO₂ < 32 mmHg
- Lökosit > 12000/mm³ veya < 4000/mm³, > %10 band formasyonu

Septik şok: Yeterli sıvı desteğine rağmen hipotansiyonun mevcut olduğu durumdur; sistolik kan basıncının <90 mmHg olması veya başlangıç değerinin 40 mmHg altına düşmesi söz konusudur.

Multipl Organ Disfonksiyon Sendromu (MODS): Herhangi bir destek tedavisi olmadan organ fonksiyonlarının homeostazı koruyamadıkları durumdur.

2.1.1 EPİDEMİYOLOJİ

Sepsis oluşan hastalarda genellikle altta yatan başka bir hastalık bulunur ve klinik bulgular bu hastalıktan da kaynaklı olabileceği için sepsisin tanısının konması zordur. Bu yüzden insidansı tam olarak saptanamamaktadır (6).

Sepsis insidansı Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl artmaktadır. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Center for Disease Control, CDC) önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden olan sepsisin bakteriyemi ve septisemi kodlarına dayanarak, 1979'dan 1987'ye kadar insidansında %139'luk artış bildirdi. Sepsis ABD'de Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi (National Center for Health Statistic) verilerine göre 1996'da ölüm nedenleri arasında ilk 10'da yer almaktadır. Buna ek olarak koroner dışı yoğun bakım ünitelerinde en sık ölüm sebebi olarak bildirilmiştir (6,70).

ABD'de 1979-2000 yıllarını kapsayan 22 yıllık periyodu içine alan bir çalışmada sepsis insidansının 82/100000'den 240/100000'e çıktığı görülmüştür.

Mortalite oranı 1979-1984 yılları arasında %28 iken 1995-2000 yılları arasında %18'e düşmüştür. Ancak sepsisten dolayı kaybedilen hasta sayısı artmaya devam etmektedir. Türkiye'de bulunan bir yoğun bakım ünitesinde 1997 yılında yapılan bir yılı kapsayan çalışmada nazokomiyal sepsis oranı %33.1, 1999-2002 yılları arasında yapılan çalışmalarda ise nazokomiyal bakteriyemi/sepsis oranı, sırasıyla %12.4, %21.5, %16.7, %17.1 olarak bulunmuştur (11).

1983-1989 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi'nde hastanede yatan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada gram negatif sepsis insidansı 4.2/1000 ve mortalitesi %45 olarak bulunmuştur. Bu oranın sadece gram negatif bakterilerden meydana gelen sepsis olduğu düşünülürse ve bir o kadarda gram pozitif bakterilerden meydana gelen sepsis geliştiği varsayılırsa toplam oran yaklaşık 8/1000 olduğu söylenebilir (116).

Sepsis vakalarının çoğu hastane ortamında gelişmektedir. Tanı ve tedavi amaçlı girişimsel teknikler dış ortama duyarlı olan dokular için zedeleyici ortam oluşturmakta ve sepsise zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle infeksiyon riski taşıyan her türlü girişim sepsis riskinde taşımaktadır. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların en sık rastlanan ölüm nedenleri sepsis olarak bildirilmektedir (21,86).

ABD'de sepsis insidansı, erkeklerde kadınlara göre, beyaz olmayanların beyazlara göre daha sık olduğu bildirilmiştir (70).

2.1.2 ETYOLOJİ

Sepsis tablosu bakteriler, virüsler, mantarlar, parazitlerden kaynaklanabildiği gibi ağır travma veya pankreatit gibi noninfeksiyöz olaylarla da gelişebilir. Sepsis olgularının yarısında etken gösterilmemesine ve bu grubun çoğunluğunun antibiyotik tedavisine yanıt vermesi bu hastalarda etkenin bakteri olduğunu düşündürmektedir. Sepsise neden olan mikroorganizmlardan en sık karşılaşılanlar Escherichia coli (%22), Streptococcus pneumoniae (%16) ve Staphylococcus aureus (%12) olarak saptanmıştır. 1950'li yıllarda hastane içinde sepsise neden olan mikroorganizmalar gram pozitif bakteriler ön sırada olup sıklıkla Streptococcus aureus ve Streptococcus pyogenes olarak gözlenmiştir. Antibiyotiklerin kullanıma girmesi ile gram pozitif bakterilerin

neden olduğu hastalıklar tedavi edilebilir hale gelmiş ve 1960-1980’li yıllarda gram negatif bakteriler sepsis olgularının %50’sinden fazlasında etken rol oynamıştır (15).

1971-1990 yılları arasında sıklıkla Streptococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli ve Klebsiella türleri baskın olarak görülmüştür. 1991-1995 yılları arasında antibiyotiğe dirençli gram negatif mikroorganizmalar Enterococcus türleri, koagülaz negatif Stafilokoklar, Pseudomonas aeruginosa ve Candida türleridir. Bakteriyemili hastalarda 1970’lerden sonra antibiyotik tedavisinde Amoksisilin ve Gentamisin kullanılmaya başlanmıştır fakat 1980’lerin başında bu antibiyotiklerin yerini Sefalosporinler almıştır. Sefalosporinlerin kullanımının artması antibiyotiğe dirençli gram negatif organizmaların görülmesini artırmıştır (39).

Sepsisli hastalarda çoğunlukla kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), kronik böbrek yetmezliği, siroz ve diyabet gibi eşlik eden bir hastalık, zemin hazırlayıcı bir faktör olarak bulunmaktadır (70).

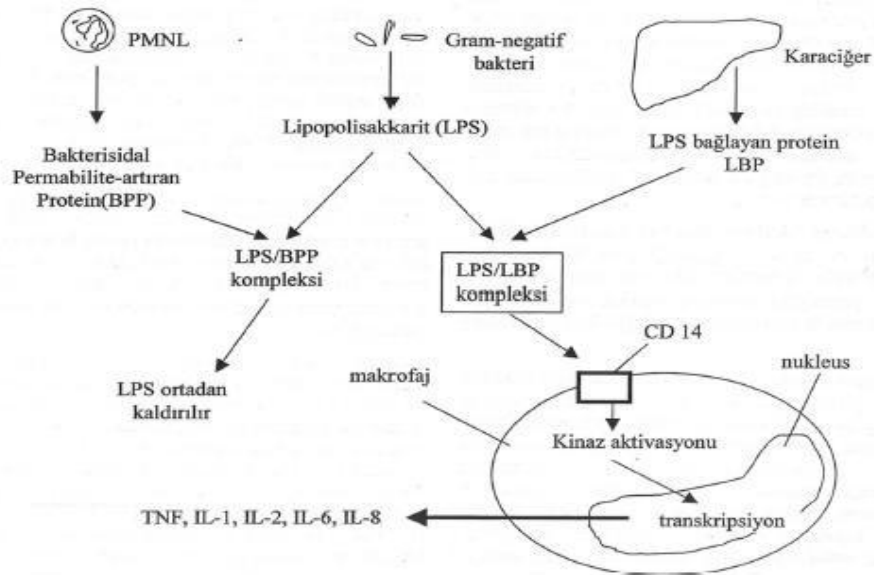
2.1.3 ENDOTOKSİN

Gram negatif bakterilerin hücre duvarı iki tabakadan oluşmaktadır. Dıştaki tabakada proteinlere ilave olarak lipopolisakkarit (LPS) yapı içeren bir bölüm bulunmaktadır. Bu bölüm, bakteriyemide toksisitenin asıl sorumlusu olup polisakkarit O antijeni, Core antijeni ve Lipid A olmak üzere üç bölümden oluşur. Bir polisakkarid yan zincir olan O antijeni, core polisakkaridi aracılığıyla bir fosfolipid olan lipid A’ya bağlanır. O antijeni gram negatif bakteri suşlarına göre değişken yapıdadır. Lipid A bölgesi toksisitenin ana sorumlusu olarak görülmektedir. Pek çok deneysel ve klinik çalışmada, lipopolisakkaridin enjeksiyonunun sitokin kaskadını başlatan ana sorumlu olduğu ve sepsis sendromuna yol açtığı gösterilmiştir (38,98).

Makrofajlar, LPS gibi bakteriyel toksinlerle ve proinflatuar sitokinler aynı zamanda da diğer medyatörlerin salınımı ile de aktive olur. Portal vende LPS, Lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP)’i bağlar (14). LPS-LBP kompleksi karaciğer

sinuzoidlerine ulaşarak makrofaj yüzeyindeki LPS reseptörü olan CD14'e bağlanır (120). Hücre içinde CD14 yokluğunda, LPS'ye karşı hücresel yanıt transmembranda bulunan 'Toll-like receptor'e (TLR) bağlıdır. TLR, sitokin ve diğer medyatörlerin sentez ve salınımına öncülük eden sinyal yollarını indükler(79). TLR sitozol enzimlerini aktive eder, özellikle I-kappaB kinaz enzimi ki bu enzim, "nuclear factorkappaB" yi (NF-κB) aktive eder. p50 ve p65 (NF-κB'nin 2 alt ünitesi) makrofajların nükleusuna geçer. Böylece sitokin sentezi için kopyalama başlamış olur.

NF-κB, İmmün yanıtın düzenlenmesinde bir çok duruma katılan bir B hücre immüoglobulinidir, doğal ve edinilmiş immüniteye katılır. NF-κB inflamasyonda, üstünlüğü olan bir maddedir ve hem proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması olaylarına hem de endotel hücrelerinin masif aktivasyonuna katkıda bulunur. Uyarı sinyallerini alınca nükleusa göç eder ve promoter alandaki DNA dizilerine bağlanarak; sitokin, antimikrobiyal ve antiapoptotik proteinlerin genlerinin aktivasyonunu sağlar.



Şekil 1: Gram-negatif bakterinin etki mekanizması (12)

2.1.4 PATOFİZYOLOJİ

Sepsiste ilk basamak mononükleer lökositte endotoksin bağlanmasıdır. Bu bağlanma nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve çeşitli sitokinlerin salgılanmasına neden olur (8). Erken proinflamatuvar yanıtta ilk rol oynayan primer hücreler ise nötrofillerdir. Bu hücreler, IL-1, TNF- α , kompleman fragmanları (örneğin C5a) veya makrofaj gibi hücrelerden, diğer nötrofillerden, trombositlerden ve PAF (trombosit aktive edici faktör), interferon (IFN- γ), IL-8 ile aktive olurlar. Aktive olan nötrofiller hızla lokal inflamasyon bölgesine göç ederek yerleşirler. Bu nötrofiller, fagositoz ve degranülasyonla patojenleri yok etmeye çalışırlar ancak bu sırada lokal doku hasarında yol açabilirler.

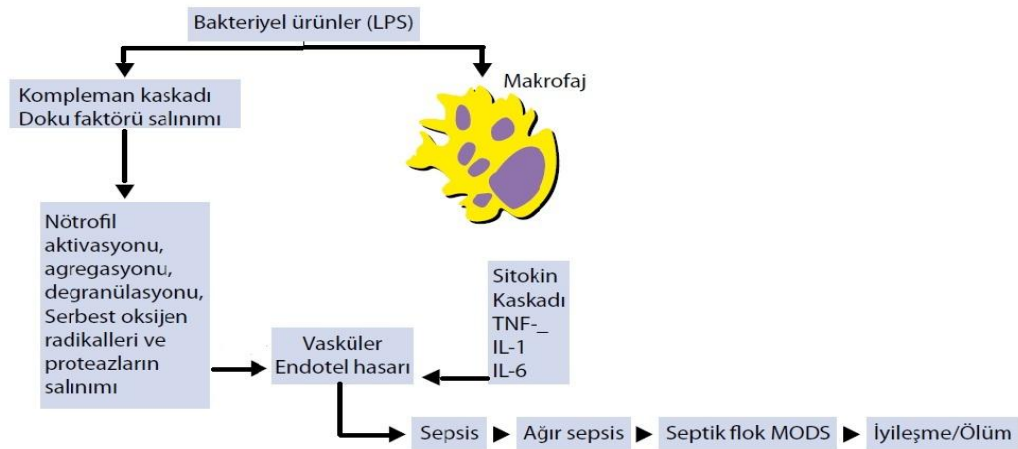
Nötrofilin bakteri öldürmesindeki asıl etki mekanizması içindeki primer ve sekonder granüllerdeki miyeloperoksidaz, lizozim, elastaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimini salgılamasıdır. NADPH oksidaz, bir reaktif oksijen radikali olan superoksidi üreterek mikroorganizmaya direkt öldürücü etki oluşturur. NADPH, moleküler oksijen ve serbest elektronlardan süperoksid üretimini katalizler. Oluşan süperoksidin organizmaya zarar vermemesi için süperoksid dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen perokside dönüştürülür. Miyeloperoksidaz da hidrojen peroksiti güçlü bakteriyal etkili asidik yapıda ajanlara çevirir. Süperoksid üretim hızı ve nötrofillerden salınan reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) miktarı NADPH oksidaz sistemi tarafından regüle edilir. Uyarılan nötrofillerden fazla miktarda salgılanan toksik oksijen metabolitleri, multipl organ sistemlerinde disfonksiyona yol açan otoimmün doku hasarına neden olur. Aynı zamanda aktive nötrofiller pozitif feedback ile IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, makrofaj koloni stimüle eden faktör salınımını artırır (90).

Komplemanın dolaylı ve dolaysız proinflamatuvar etkileri bulunmaktadır. Örneğin C5a dolaşımdaki nötrofiller için temel kemotaktik faktördür ve endotele adezyonlarında rol alır. Nötrofillerden reaktif oksijen türlerinin veya proteolitik enzimlerin salınmasına yol açmaktadır.

Sitokinler, sepsis patofizyolojisinde anahtar rol oynayan başka sistemleri de aktive eder. Normalde nötrofiller, vasküler sistemde endotelle fazla temas etmeden dolaşırlar. İnflamatuvar bir uyarı geliştiğinde nötrofiller inflamasyon bölgesine göç eder,

endotelyal duvarda kümeleşir ve vasküler endotelyal hücelere yapışır. Nötrofilin vasküler endotele adhezyonunu sağlayan integrin ve selektin gibi proteinler vardır. İntegrin, lökositlerin tüm yüzeyinde lokalize olur ve endotelyal hücre yüzeyine protein (intrasellüler adhezyon molekülü ICAM-1 ve ICAM-2) bağlanmasını sağlar. Sitokin salınımını takiben ICAM-1 üretimi artar. Selektin, lökositlerde ve endotelyal hücelerde bulunur ve aktive olduklarında nötrofil ve trombosit adhezyonunu sağlar. Nötrofillerin lokal adhezyonu, konak savunmasının bir parçası olmasına rağmen ağır sepsiste nötrofillerin sistemik aktivasyonu ve adhezyonuna neden olur. Ayrıca hasar yaratan oksidanların, endotelyal hasarı ve mikrovasküler permeabilityi artıran fosfolipaz ve proteazların salınımını artırır. Organ sistem disfonksiyonuna neden olan mekanizmalardan biri de budur (62).

Sistemik IL-1 ve TNF- α düz kas damarlarında dilatasyona neden olur ve vasküler permeabilityi artırır. Dolaşım sisteminde oluşan kollaps ve geniş dağılımlı mikrotrombozis, sepsiste çoklu organ yetmezliğine neden olur. MODS'un nedeni birçok faktöre bağlı olsa da sepsis sendromunda ve organ yetmezliğinde asıl patoloji, özellikle makrofajlardan sitokin salınımının gerçekleşmesidir. Son çalışmalara göre hem proinflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6 ve TNF- α) hem de antiinflamatuvar sitokinler (IL-1ra, IL-10) MODS patogenezinde önemli rol oynamaktadır (103).

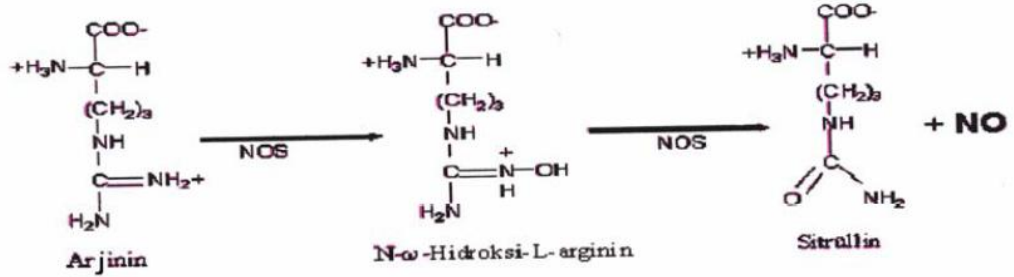


Şekil 2: Sepsiste organ yetmezliği gelişimi (22)

2.2 SEPSİSTE NİTRİK OKSİTİN(NO) ROLÜ

L-Arginin aminoasitinden NOS (Nitrik Oksit Sentaz) katalizi ile L-sitrülin ve nitrik oksit ürünleri meydana gelir. İmmün sistemde belirgin etkileri olan Nitrik Oksit; suda çözülebilen, renksiz, solüsyonda yarı ömrü 0.1-10 saniye olan bir gazdır (65).

NO reaksiyonunu katalizleyen NOS'un indüklenebilir NOS (iNOS), endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) olmak üzere bilinen üç tipi vardır. nNOS ve eNOS birlikte constitutive NOS (cNOS) adını alır. NOS, NO üretiminin yanında süperoksit üretimini de sağlar. L- arginin varlığında süperoksit üretimi inhibe olur yokluğunda ise artar (65). Endotoksin ve proinflamatuvar sitokinlerin (bazı interlökinler, TNF-alfa) iNOS' u indükleyerek NO üretimini artırdığı gösterilmiştir (80,106).

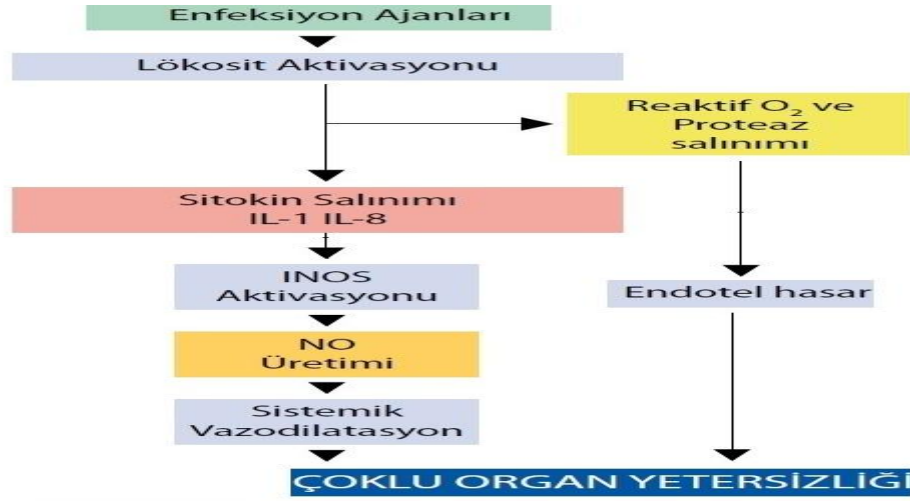


Şekil 3: Nitrik oksitin L-arginin aminoasitinden sentezi (49)

Vazodilatasyon, ekstrasvazasyon, vasküler permeabilite, lökosit migrasyonu ve aktivasyonundan sorumlu olan nitrik oksit inflamasyon esnasında önemli bir rol oynar. Makrofajlar tarafından iNOS aracılığı ile immünolojik uyarı ile sentezlenen NO protozoa ve tümör hücrelerine karşı gelişen nonspesifik sitotoksiteye neden olur. Oluşan sitotoksik aktivitenin mekanizması açıklanamamıştır. Aynı zamanda NO, mitokondrial solunum zincirinde demir sülfidril grubunu bağlayarak apoptoza neden olur (65).

Serbest oksijen radikali olarak NO oldukça reaktiftir ve birçok madde ile etkileşebilir. NO kanda hemoglobinin hem grubu ile etkileşerek hızlı bir şekilde nitrit ve nitrate metabolize olur. Kanda nitrat, NO' in esas stabil biyoreaksiyon ürünüdür.

Hemoglobin olmayan doku kültüründe esas ürün nitrittir. NO ayrıca proteinlerin ve aminoasitlerin tiol (-SH) grupları ile reaksiyona girer ve sonuçta sabit nitrozothioller oluşabilir (80,106).



Şekil 4: NO üretimi ve endotel hasar oluşumu (29)

2.3. SEPSİSTE OKSİDAN SİSTEMLER

2.3.1 SERBEST RADİKALLER

Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron içeren maddeye serbest radikal denir. İçerdiği bu elektronlar, maddenin magnetik bir alana çekilmesine yol açar ve bazen de maddenin reaktif olmasına neden olur (24). Travma, ödem gibi dokuda beslenme ve dolaşım bozukluğu meydana getirebilen durumlarda, oksijen; doku tarafından üretilen bazı metabolitlerle reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini oluşturmakta ve bu serbest oksijen radikalleri dokuda hasar oluşturabilmektedir (52).

İnflamatuvar olaylar, serbest radikallerin hücresel hasar yaptığı en iyi örneklerdendir (24,52).

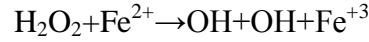
2.3.1.1. OKSİJEN TÜREVİ SERBEST RADİKALLER

a) Süperoksid Radikali

Moleküler oksijene bir elektron bağlanması ile süperoksid serbest radikal anyonu meydana gelir. Milisaniyelik yarı ömürle zayıf bir oksidan olan süperoksid radikali kendi başına önemli bir hücre hasarı oluşturmaz fakat güçlü bir redüktandır. SOD enzimi organizmayı süperoksid radikaline karşı korur. Bu serbest radikalın asıl önemi; geçiş metal iyonlarını redüklemesi, NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturması ve hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır (45,46,97).

b) Hidroksil Radikali

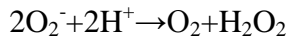
Hidrojen peroksitin geçiş metallerinin iyonları varlığında parçalanmasıyla meydana gelen hidroksil radikali, biyokimyasal sistemlerde bulunan en güçlü radikaldir. Bu parçalanma reaksiyonu Fe^{++} katalizli Haber-Weiss (fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır.



Hidroksil radikali, hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen reaktivitesi yüksek olan bir ajandır. Başlıca etkileri; lipitler, proteinler ve nükleik asitler üzerindedir (24,46,97).

c) Hidrojen Peroksit

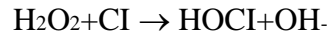
Süperoksidin dismutasyonu veya oksijenin indirgenmesinden meydana gelir.



H_2O_2 , son derece güçlü bir oksitleyicidir. DNA'da zincir kırılmaları meydana getirerek hasar oluşturur. H_2O_2 ile oluşturulan hasar katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile önlenmeye çalışılır (24,46,50,97).

d) Hipokloröz Asit (HOCl)

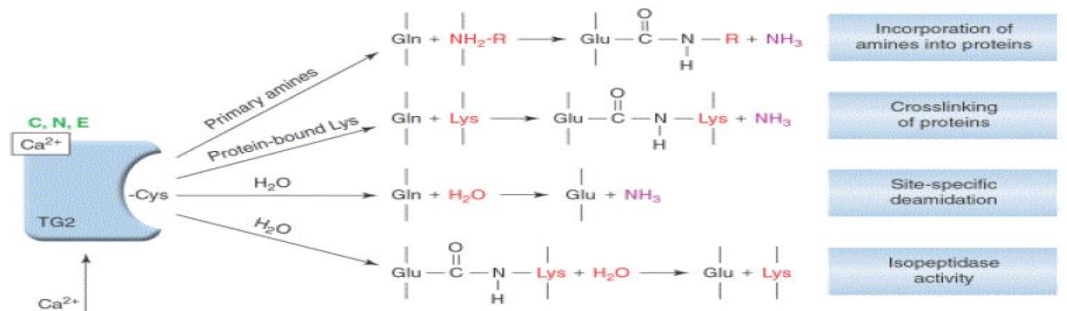
Aslında bir radikal olmamasına rağmen SOR içinde yer almaktadır. HOCl, fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde önemli rol oynar. Aktive edilen monositler, nötrofiller ve tüm makrofajlar O₂ üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde çok önemlidir. Özellikle nötrofiller miyeloperoksidaz enzimi ile O₂'nin dismutasyonu sonucu oluşan H₂O₂ molekülünü, klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür (51).



2.4. SEPSİSTE TRANSGLUTAMİNAZ 2

Transamidasyon reaksiyonu ilk kez 1957 yılında Clarke ve Waelsch tarafından domuzların karaciğerinde gözlemlendi. Daha sonra bu transamidasyonun enzimler tarafından, bir açıl-transfer reaksiyonu yoluyla yapılan proteinlerin çapraz bağ reaksiyonu olduğu ortaya çıktı. Bu bulgulardan bu yana çalışmalar giderek artmış ve transglutaminazın memelilerinde ötesinde, mikro-organizmalar, bitkiler, omurgasızlar, balıklar, ve kuşlarda da mevcut olduğunu gösterilmiştir.

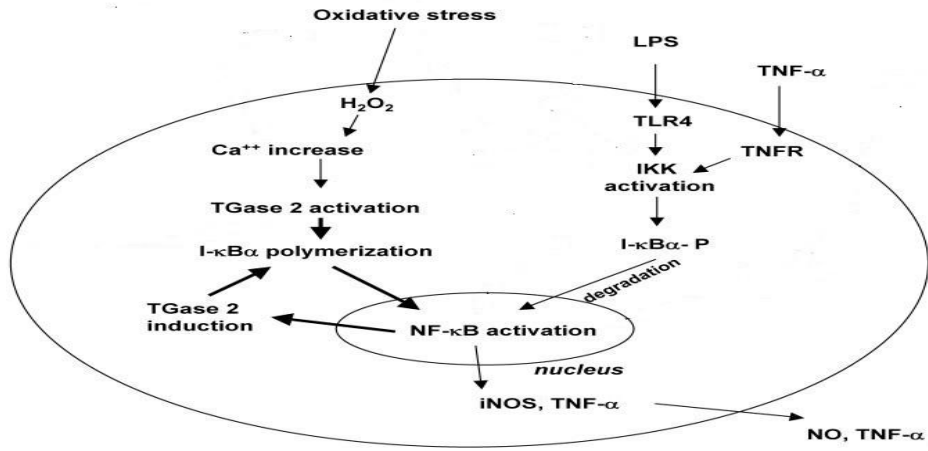
Transglutaminazlar (TG) tiyol ve Ca²⁺ bağımlı açıl-transferaz olup bazı proteinlerin γ -glutamil ve ϵ -lizil grupları arasında kovalent çapraz bağlanmayı kataliz eder. Transglutaminaz 2 (TGase 2; E.C. 2.3.2.13) aynı zamanda proteinlere mono-veya poliaminler dahil edebilmektedir (33).



Şekil 5: TG2'nin katalizlediği reaksiyonlar (43)

TG2 normalde birçok farklı dokuda düşük seviyelerde bulunurken çeşitli patolojik olaylarla artar. Ancak TG2' nin hastalıklardaki etyolojisi açık değildir. İnflamatuvar olaylarda ve çölyak hastalığında TG2 ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir.

Karaciğer hücrelerinde TG2, TNF-alfa gibi inflamatuvar sitokinlerce indüklenebilmesine karşın NF-kappa B aktivasyonu ile de doğrudan indüklenebildiği rapor edilmiştir (72).



Şekil 6: Sepsiste TG2yolağı (72)

2.5. SEPSİSTE MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİ

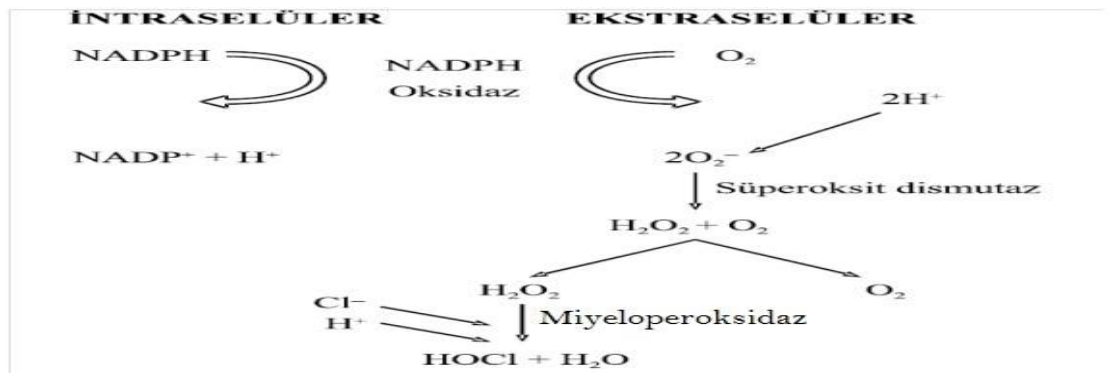
Miyeloperoksidaz (MPO) fagositik hücrelerde bulunan lizozomal bir enzimdir. Polimorfonükleer lökositlerin azurofil granüllerinde fazla miktarda bulunan miyeloperoksidaz diğer inflamatuvar hücreler olan monosit ve makrofajlarda çok az miktarda bulunur veya hiç bulunmaz. Bu nedenle nötrofil sekestrasyonunun kantitatif bir göstergesi olarak ölçülmesinde kullanılan ve duyarlı bir gösterge oluşturan MPO aktivitesi giderek artan bir popülerite kazanmaktadır (69).

MPO'nun görevi nötrofiller tarafından fagosit edilen bakterileri sindirecek ürünleri oluşturan bazı tepkimeleri katalizlemektir (105).

MPO moleküler ağırlığı 140 kDa olan bir kan proteindir. İki çift alt birim içeren bir enzimdir. Oldukça stabil bir yapısı vardır. Alt birimlerinden ikisi ağır (55.000-62.000 Da), ikisi de hafif (10.000–15.000 Da) alt birim olarak adlandırılır. Ağır olanların her birine bir hem prostetik grubu ve bir de karbonhidrat grubu bağlıdır (5).

Nötrofiller savunma sisteminin en önemli bakterisidal silahıdır. Bu etkileri hipokloröz asit (HOCl) üretimini katalize etmeleri sonucu ortaya çıkan hidrojen peroksit ve klor iyonundan gelen güçlü bir antioksidan olmalarından kaynaklıdır. İnflamasyon durumunda MPO ekstrasellüler ortama salınır ve bunun ölçümü nötrofil aktivasyonunun bir göstergesi olarak kullanılır. Bir başka deyişle dokulardaki nötrofillerin çokluğunun bir göstergesi olarak MPO ölçülmektedir (119).

Proinflatuar yanıtta nötrofiller, ilk rol oynayan primer hücrelerdir. Aktive olan nötrofiller inflamasyon bölgesine göç ederler ve yerleşirler, fagositoz yöntemiyle patojenleri yok etmeye çalışırlar primer ve sekonder granüllerinden salgılanan NADPH oksidaz, miyeloperoksidaz, lizozim ve elastaz enzimleri inflamasyon bölgesine yerleşen nötrofillerin bakteri öldürmesindeki asıl etki mekanizmasıdır. Moleküler oksijen ve serbest elektronlardan bir reaktif oksijen radikali olan süperoksit üretimini katalizleyen NADPH oksidaz enzimi, konağa direk öldürücü etki yaratır. Oluşan süperoksidin organizmaya zarar vermemesi için süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Miyeloperoksidaz enzimi de hidrojen peroksit radikalini güçlü bakteriyal etkili asidik yapıda ajanlara çevirir. Uyarılan nötrofillerden fazla miktarda salgılanan toksik oksijen metabolitleri de çoklu organ yetmezliğine neden olur (90).



Şekil 7: Aktive olmuş nötrofillerden salınan miyeloperoksidaz enzimi(111)

2.6. SEPSİSTE DNA FRAGMENTASYONU

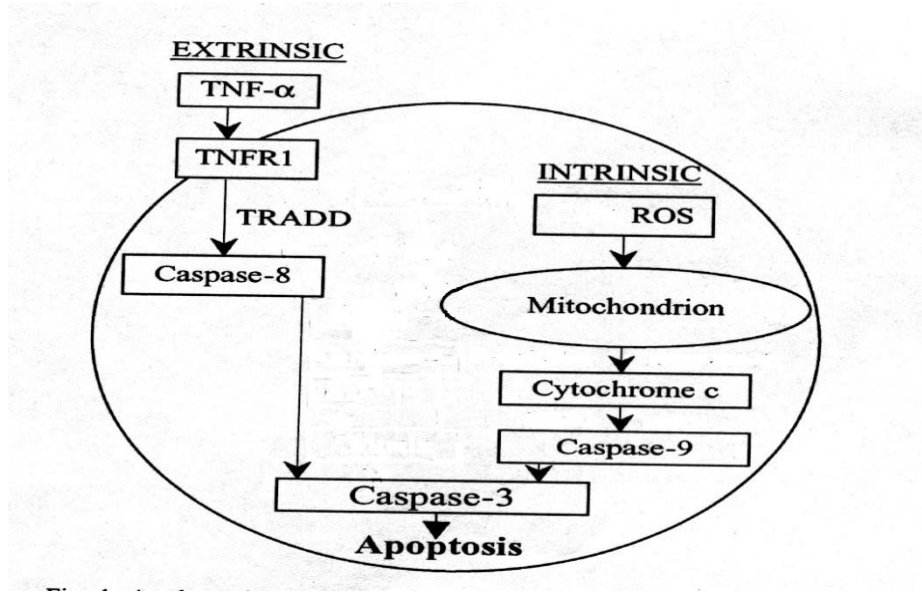
2.6.1 Sepsiste Apoptosis

Apoptosis de MODS'a giden patofizyolojik süreçte, son yıllarda yerini almaktadır. İn vitro ve in vivo alanlarında yapılan pek çok çalışma sepsis modellerinde, immün ve parankimal hücrelerde apoptotik düzensizliklerin meydana geldiğini göstermiştir. Apoptosis, evrimsel olarak muhafaza edilen, karmaşık genetik programların başlatılması ve regülasyonunu gerektiren, enerji bağımlı, programlanmış hücre ölümü şekli olarak tanımlanır (74). İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmış ve organ homeostasisindeki rolü ortaya konmuştur(64). Apoptosis, organizmanın sayıca fazla, hasarlı veya daha fazla ihtiyaç duyulmayan hücrelerden kontrollü bir şekilde kurtulmasına aracılık eden temel yoldur(74).

Apoptosisi başlatan iki büyük yolak bulunmaktadır(104):

- 1- Reseptör başlangıçlı kaspaz-8 aracılı yolak
- 2- Mitokondri başlangıçlı kaspaz-9 aracılı yolak

TNF-alfa ve Fas-Ligand “death” reseptörleriyle sinyal iletiyi başlatır ve kaspaz-8'i uyarır. Reaktif oksijen türevleri, radyasyon ve kemoterapötik ajanları içeren pek çok uyarıcı da kaspaz-9 aracılı mitokondriyal yolağı aktive eder. Kaspaz-8 ve kaspaz-9, hücre ölümünün ortak yolunda bulunan kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3 efektör mekanizmaları devreye sokar; mitokondriyal porların açılması, permeabilite değişiklikleri ile Ca^{+2} akımı ve sitokrom c'nin sitozole redistribüsyonu hücreyi apoptosise sürükler (25).Yıkım evresinde ise apoptosisin ayırıcı morfolojisi ortaya çıkar: hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, nükleer membran yıkımı, DNA parçalanması, sitoplazmik materyel içeren apoptotik cisimcikler, sitoskeletal reorganizasyon(34).



Şekil 8: Sepsiste apoptosis yolları(25)

2.7. SEPSİSİN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİ

Sepsiste olayı başlatan mikroorganizmalar veya toksinler olsalar da, esas olan organizmanın aşırı yanıtı sonucu inflamasyon, çoklu organ yetmezliği ve organ yetersizlikleri gerçekleşmesi olayıdır. Sepsis seyrinde endotel disfonksiyon, kardiyovasküler bozukluklar, hemostatik balans bozukluğu ve intrasellüler hemostazda bozulma olayları gerçekleşmektedir (93).

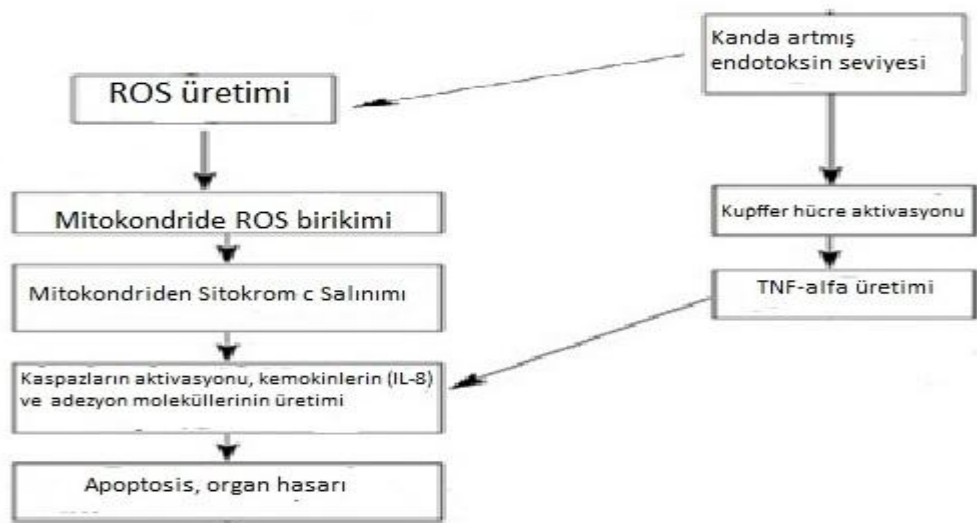
Mikroorganizmaların direk veya sitokinlerin indirek etkisine maruz kalan endotel hücrelerinden adezyon moleküllerinin etkinliği artar, vazoaktif maddeler ve inflamatuvar mediyatörler salınır. Aşırı aktive olan endotel hücrelerden dolayı mikrosirkülasyonun bozulması, kapiler geçirgenliğin artması, toksik oksijen radikalleri, nötrofillerden salınan süperoksit ve proteazlar bir süre sonra konağa zarar verir (93).

Sepsiste karaciğer; MODS'nun başlaması ve ilerlemesinde önemli bir yere sahiptir. Sepsisin oluşumu ile indüklenen karaciğer hasarı primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır (77).

Primer karaciğer disfonksiyonu; şok ve resüsitasyon sonrası gelişir ve sistemik veya mikrosirkülatuar bozuklukla ilişkili olarak ortaya çıkar. Hipoperfüzyon ve endotoksemi primer karaciğer hasarına neden olur. Hepatositlerdeki akut hücresel ve mitokondrial hasar serum aminotransferaz enziminde artışla belli olur(77).

Sekonder karaciğer disfonksiyonu ise endotoksinin tetiklediği inflamatuvar sitokinlerin aktifleşmesi sonucu gelişmektedir. Bakteriyemi ve sepsis olmadan da makrofajlardan salınan sitokinler yoluyla kolestaz gelişebilir. Kupffer hücreleri, polimfonükleer hücreler ve endotel hücrelerin agregasyonu sinüzoid lümeninin obstrüksiyonuna neden olur. Sinüzoidlerde hipoperfüzyonuna neden olan bu durum, disse aralığını genişletir, kemotaktik faktörlere ek olarak lipopolisakkaritin indüklemesi ile hepatosit ve kupffer hücrelerinden nötrofil kemotaksisine neden olan sitokinler salgılanır. Bunun sonucunda nötrofil marjinasyonu ve adezyon gerçekleşir. Bunu takiben serbest oksijen radikallerindei proteazlarda artış ve hepatosit hasarı oluşur (77).

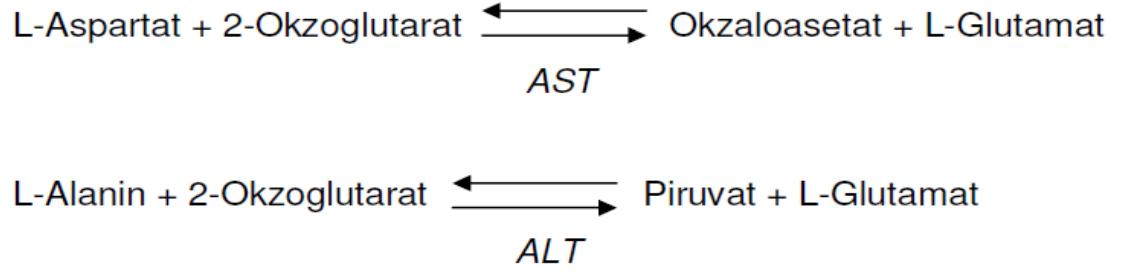
Sepsisli karaciğerde en sık rastlanan bulgu intrahepatik kolestazdır. Ayrıca kupffer hücre hiperplazisi, portal mononükleer hücre infiltrasyonları, fokal hepatosit değişiklikleri ve steatoz görülür. Klinik tabloda karaciğer tutulumu sık olup mortaliteyi olumsuz yönde etkilemektedir (77).



Şekil 9: Serbest oksijen radikallerinin ve endotoksinin karaciğerdeki apoptosis yolu

2.8. Aminotransferazlar (ALT ve AST)

Aminotransferazlar, Amino gruplarının transferi yolu ile, Amino asitler ile 2-okzo-asitlerin birbirine çevrilmesini gerçekleştiren enzimlerdir. Aspartat ve alanin transferazlar klinik önem taşıyan aminotransferaz örnekleridir. Aspartat aminotransferaz; aspartat transaminaz, L-aspartat:2-okzoglutarat aminotransferaz, AST olarak da bilinir. AST, önceleri glutamat oksaloasetat (GOT) olarak adlandırılmıştır. Alanin aminotransferaz; alanin transaminaz, L-alanin:2-okzoglutarat aminotransferaz, ALT olarak bilinir. Bu enzim önceleri glutamat piruvat olarak (GPT) olarak adlandırılmıştır.



Şekil 10: AST ve ALT reaksiyonları (113)

Amino grubu transferlerinin gerçekleştirildiği tüm tepkimelerde 2-okzoglutarat/L-glutamat çifti, amino grubu alıcısı ve vericisi olarak kullanılır. Geri dönüşümlü olan AST ve ALT reaksiyonlarında denge sırasıyla aspartat ve alanin oluşumu yönündedir.

Transaminazlar hayvan dokularında yaygın olarak bulunur. İnsan plazması, safrası, beyin-omurilik sıvısı ve tükürüğünde normal olarak bulunan ALT ve AST böbrek lezyonu bulunmadıkça idrarda görülmez. Karaciğerin bütünlüğünü etkileyen hastalıklarda serum AST ve ALT düzeylerinin arttığı görülür(113).

2.9. C-Reaktif Protein (hsCRP)

Tillet ve Francis adlı iki araştırmacının 1930 yılında S.pneumoniae'nın C polisakkaridine bağlanarak agglutinasyon yapan bir "etmen" saptadıkları ve buna C-Reaktif protein (CRP) adını verdikleri bildirilmektedir. CRP karaciğerden sentezlenen

11800 dalton ağırlığında bir proteindir. İnflamasyonda IL-1, IL-6, TNF-alfa gibi sitokinlerce uyarılır.

hsCRP'nin diğer fizyolojik rolü; makrofaj uyarımıyla tümör inhibe edici aktivite göstermesidir. hsCRP akut faz proteinleri içinde en çabuk yükselen ve 48-72 saatte maksimuma ulaşan yapıdır. İnflamatuvar uyarınları izleyen sekiz saat içinde hsCRP hepatositler içinde gösterilir. hsCRP düzeyinin ölçümü bakteriyel enfeksiyonların saptanmasının önem taşıdığı sepsiste, özellikle önemlidir (76,115).

2.10. SARIMSAK

Eski çağlardan beri bilinen sarımsak, hem baharat hem ilaç olarak kullanılan, kaynağı Orta Asya olan bir bitkidir. Özellikle salgın hastalıklar için antiseptik, idrar artırıcı ve iştah açıcı olarak kullanılmıştır (4,40). İçeriğinde; %65 su, serbest aminoasitler, fruktoz içeren karbonhidratlar, proteinler, çeşitli mineraller, çeşitli vitaminler(B kompleks ile A ve C vitaminleri) ve sülfür bileşikleri bulunur (40).

Sarımsağın, immün bozukluk intestinal düzensizlik, arteroskleroz, kanser, artrit, respiratuvar infeksiyon, yaşlanma karşıtı, hipolipidemik, antihipertansif ve antitrombolitik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (4,9,121,125). Araştırmalarda kanser olgularının azalması ile sarımsak tüketiminin artmasının ilişkili olduğu bulunmuştur (9). Ayrıca sarımsak insanda; kolon, akciğer ve deri kanserinde, kanserli hücrelerin artışını inhibe ettiği, lipid peroksidasyonunu azaltıp antioksidan kapasiteyi arttırarak kimyasal koruyucu bir rol oynadığı bildirilmiştir (9).

Son yıllarda bitkisel ilaç sanayinin önemli bir maddesi olan sarımsak tansiyonu ve kolesterolü düşürmek için tüketildiği rapor edilmiştir (9,40).

Sarımsağın en önemli biyokimyasal özelliklerinden birisi de çeşitli patolojik süreçlere karşı savunmayı sağlayan antioksidan etkisinin olmasıdır. Sarımsak, antioksidant etkisini reaktif oksijen türlerini temizleyerek, lipid peroksit oluşumunu ve LDL oksidasyonunu inhibe ederek gerçekleştirir (9,107).

Kuru sarımsak ekstrelerinin antioksidan aktivitesinden S-allil-sistein, alil-merkapt-L-sistein ve N:(alfa)-fruktosil arginin gibi organosülfür bileşiklerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir (9).

Yapılan çalışmalarda süperoksid radikallerini ve hidrojen peroksiti baskılayarak, süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir (3).

Şener ve ark. Süperoksid radikali üretimini artıran nikotin toksisitesine karşı sarımsağın nötrofil infiltrasyonunu azalttığını ve lipid peroksidasyonunu engellediğini rapor etmişlerdir (107).

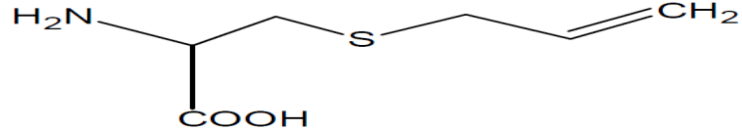
2.11. S-Allil Sistein (Deoksiallin,SAC)

S-allylcysteine (SAC), organo sülfür yapıda bir aminoasit olup, suda çözülebilen antioksidan özelliklere sahip bir sarımsak bileşiğidir. Sarımsağın içerisinde 30 µg/g kadar SAC bulunmaktadır. Oksidatif stres ile ilişkili çeşitli deneysel modellerde sarımsak ekstresinin koruyucu etkisinden sorumlu aktif bileşiklerden biri olduğu rapor edilmiştir (57,58,60,61, 66-89).

SAC'ın antioksidan özelliklere sahip olduğu hem in vivo (88-81) hem de in vitro (54-61,66,123) çalışmalarda gösterilmiştir. In vivo çalışmalarda SAC, lipid peroksidasyonun inhibisyon mekanizması ile iskemik rat beyinde ödem oluşumunu azaltmış ve doksorubisin ile tedavi edilen farelerde kalp ve karaciğer histolojik hasarını engellemiştir (81,88,89).

In vitro çalışmalarda ise SAC, süperoksid anyonunu, H₂O₂ ve hidroksil radikalini temizleyebildiği (66,59), ayrıca H₂O₂ radikaline bağlı endotel hücre hasarını, lipid peroksidasyonunu ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu önlediği bildirilmiştir (54-59,60,123). NO endotel hücrelerde artarken, SAC makrofajlarda nitrik oksit sentazı inhibe ederek nitrik oksit (NO) üretimini düzenler (66).

SAC'ın bilinen antioksidan, antikanserojen(109), nörotrofik (87) ve antihepatopatik(84,85) etkilerine karşın literatürlerde sepsisteki etkinliği ve biyokimyasal yolları bilinmemektedir.



Şekil 11: SAC'ın kimyasal yapısı (32)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Klinik Laboratuvarı ve Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi Deney Hayvanları laboratuvarında yapıldı. Deney hayvanları Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlandı. Çalışma için gerekli olan etik kurul onayı alındı.

3.1 GEREÇLER

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda, 32 adet 3-4 aylık erkek Wistar türü rat kullanıldı. Deney hayvanları deney süresince 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık ışıklandırması olan, ortalama 22 ± 2 °C ısı ve %45- 50 nem koşullarında bakıldı. Hayvanlara standart rat pellet yemi ve su verildi. Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde n=8 rat olmak üzere toplam 4 grupta 32 adet rat kullanıldı. Bu gruplar;

GRUP 1(n=8) Kontrol Grubu

GRUP 2(n=8) SAC Grubu (S-Allil-Sistein)

GRUP 3(n=8) Sepsis Grubu (LPS)

GRUP 4(n=8) Sepsis+SAC Grubu

Sepsis ve Sepsis+SAC gruplarına kimyasal olarak tek doz LPS (5 mg/kg i.p 0.1 ml NaCl) enjeksiyonu yapıldı. E.coli enjeksiyonundan 6 saat sonra grup 2 ve 4'e 50 mg/kg S-Allilsistein gavaj yolu ile 2 gün boyunca 12 saat arayla verildi (83). 48 saat sonra kanlar alınıp hayvanlara anestezi uygulanarak diseksiyon yapıldı ve karaciğer dokuları alındı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Lipopolisakkarit	(Sigma)
SAC	(Sigma)
EDTA	(Merck)
TRİS HCl	(Sigma)
TRİTON-X	(Sigma)
Perklorid asid	(Merck)
Difenilamin	(Merck)
Asetikasit	(Merck)
Asetaldehit	(Sigma)
Potasyum Fosfat	(Merck)
Guaiacol	(Sigma)
KOH	(Merck)
Hidrojen Peroksit	(Merck)
Hexadecyltrimethyl ammonium Bromide	(Merck)
Hidroksilamin	(Sigma)
Karbobenzoksi-Z-Glutaminilglisin	(Sigma)
Tris Asetat	(Merck)
Sükroz	(Sigma)
CaCl ₂	(Sigma)
FeCl ₃	(Merck)

TCA (Merck)

HCl (Sigma)

3.1.3 Kullanılan Aygıt Ve Gereçler

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1238)

Sogutmalı Santrifüj (Jouan MR-22)

Ph Metre (Hanna-HI-932)

Su Banyosu (Nüve BM 402)

Derin Dondurucu (Thermo ULT 1386-5-V40)

Hassas Terazî (Sartorius BP 121S)

Homojenizatör (Janke&Kunkel, Ultra-Turrax T25)

+4 Soğuk Oda (Carel Master Cella)

Plastik ve Cam Tüpler

Enjektörler

Otomatik Pipetler

Operasyon Takımı

3.2 Yöntemler

3.2.1 Maddelerin Uygulanması

Grup 1 (S.F i.p) (n=8): Bu grup deney hayvanlarına intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi. Uygulamadan 2 gün sonra ketamine–xylazine anestezisi uygulanarak diseksiyon yapıldı.

Grup 2 (50 mg/kg S-allil-sistein) (n=8): Bu grup deney hayvanlarına intragastrik olarak gavaj yöntemi ile 50 mg/kg S-Allilsistein saf su içerisinde çözülerek 2 gün boyunca, 12 saat arayla uygulandı. Uygulama sonunda ketamine–xylazine anestezisi uygulanarak diseksiyon gerçekleştirildi.

Grup 3 (5 mg/kg LPS i.p) (n=8): Bu grup deney hayvanlarına deney başlangıcında 1 doz LPS 5 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Uygulamadan 2 gün sonra ketamine–xylazine anestezisi uygulanarak diseksiyon yapıldı.

Grup 4 (5 mg/kg LPS i.p+50 mg/kg, S-allilsistein) (n=8): Bu grup deney hayvanlarına deney başlangıcında 1 doz LPS 5 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandıktan sonra, intragastrik olarak gavaj yöntemi ile 50 mg/kg S-Allilsistein saf su içerisinde çözdürülerek 2 gün boyunca 12 saat arayla uygulandı. Uygulama sonunda ketamine–xylazine anestezisi uygulanarak diseksiyon gerçekleştirildi(83).

Yaptığımız deneysel sepsis çalışmasında 5 mg/kg LPS i.p. verilen gruptaki ratların hareketlerinde azalma, vücut sıcaklıklarını korumak için bir arada toplanma, tüylerde dikleşme, dışarıdan gelen uyarılara cevap vermekte güçsüzlük ve halsizlik belirtileri gözlemlendi. Deneklerde, bu belirtilerinin görülmesi sepsis lehine değişikliklerin olduğunun bir göstergesidir (Akın ve ark. 126).

3.2.2. Kan ve Doku Örneklerinin Elde Edilmesi

Deney bitiminde kanlar hafif anestezi altında biyokimya tüplerine alındı.

Tüplere alınan kanlar 3500g'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumda ALT, AST, ALP, hsCRP parametreleri ölçüldü.

Deney hayvanlarından alınan karaciğer dokuları 3 kez serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra MPO, TG2, NO, DNA Fragmentasyonu ölçümleri için -80°C'de saklandı.

3.2.3 Karaciğer Dokusu DNA Fragmentasyonu Ölçümü

DNA fragmentasyonu ölçümünde spektrofotometrik bir ölçüm metoduna dayanan difenilamin reaksiyonu kullanılmıştır (10).

Ölçüm Prensibi:

Temel olarak DNA'nın hidrolizi esasına dayanır. Açığa çıkan 2-deoksi-riboz'lar dehidrasyonla aldehite dönüştüğünde ortama eklenen difenilamin ile mavi renkli bileşikler oluşur (10). DNA konsantrasyonu arttıkça mavi renk koyulaşır.

Örnek hazırlanması:

a.Doku homojenatının hazırlanması

Dokular -80°C derin dondurucudan çıkarıldı ve her biri 0,3 gram tartıldı. Üzerlerine 2.7 mL lizis buffer (5mM Tris-HCl, 20mM EDTA, %0,5 Triton X-100, pH 8) eklenerek homojenize edildi. Homojenat, +4 C°'de, 26000 x g'de 25 dakika santrifüj edildi. Süpernatant fragmante DNA içeren kısımdı, dikkatlice alındı ve başka bir tüpe aktarıldı. Pellet ise bozulmamış DNA içeren kısımdı. Süpernatantın ve pelletin DNA içerikleri difenilamin reaksiyonu kullanılarak ölçüldü (10).

b.Çözeltiler

1. 0.5 N Perklorik asit: 43 µL perklorik asit alındı ve distile su ile son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.
2. Solüsyon A: 1.5 gram difenilamin, 100mL glasiyel asetik asitte çözüldü. Üzerine 1,5 mL sülfürik asit eklendi. Bu solüsyon karanlıkta saklanır.
3. Solüsyon B: 50mL deiyonize su ile 1mL asetaldehit karıştırılarak hazırlandı. Bu solüsyon taze kullanılır.

c.Spektrofotometrik ölçüm

1. Süpernatantların DNA içeriğinin ölçümü

Numaralandırılan örnek tüplerine 1914 µL süpernatant alındı, üzerlerine 86 µL konsantre perklorik asit eklendi. Kör olarak 0,5 N perklorik asit kullanıldı. Kör ve örnek tüpleri 90 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 0.75 mL alındı, 0.75 mL Solüsyon A ve 3.75 µL Solüsyon B eklendi. Oda ısısında 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbanları 600 nm'de okundu (48).

2. Pelletlerin DNA içeriğinin ölçümü

Numaralandırılan Pelletlerin üzerine 6 mL 0.5 N perklorik asit eklendi. Kör olarak 0,5 N perklorik asit kullanıldı. Kör ve pellet tüpleri 90 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelletten 0.75 mL alındı, 0.75 mL Solüsyon A ve 3.75 µL Solüsyon B eklendi. Oda ısısında 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbanları 600 nm'de köre karşı okundu (48).

d.Sonucun hesaplanması

Sonuçlar yüzde süpernatant/pellet $\times 100$ olarak verildi.

3.2.4 Karaciğer Dokusu Nitrik Oksit Ölçümü

a. Ölçüm Prensipleri:

Günümüzde, örneklerdeki nitrit ve nitrat miktarları iki aşamalı bir yöntem ile ölçülmektedir. Öncelikle nitrat enzimatik dönüşüm veya metalik kadmiyum ile nitrite indirgenir. Griess reaksiyonu nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit (NED) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanmaktadır. Griess reaksiyonu, nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi *in vivo* olarak oluşan NO'nun ölçümüne olanak tanımaktadır (2,31).

b. NO ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. Çinko sülfat (.7H₂O), 75 mM
2. Sodyum Hidroksit, 55 mM
3. Glisin – NaOH Tamponu; pH:9,7
4. Sülfanilamit, 5 gr
5. N-(1-naftil) etilendiamin (NED), 50 mg
6. Bakır (II) Sülfat (.5H₂O), 5 mM
7. Stok Sodyum Nitrit Standardı, 1 mM
8. Sodyum Tetraborat (.10H₂O), 10 mM
9. Sülfürik Asit, 0,1 M
10. Kadmiyum Granülleri
11. Hidroklorik Asit, 3 M

c. Doku homojenizasyonunun hazırlanması ve spektrofotometrik ölçüm

Karaciğer dokuları 1 mM fosfat tamponu (pH:7.4) içerisinde homojenize edildi. 12000 g'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant ölçüm için kullanıldı. Örneklerin deproteinizasyonu: 125 µL örnek 500 µL çinko sülfat ve 625 µL sodyum hidroksit ile muamele edildi. Daha sonra bu karışım 3500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Santrifüj işleminden sonra üste kalan süpernatant kısımdan 250 µL alınarak üzerine 250 µL glisin – NaOH tamponu ilave

edildi. Daha sonra tüm tüplere yaklaşık ağırlığı 0.75 gr olan kadmiyum granüllerinden atılarak oda ısısında 90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminden sonra numune tüplerinden 500 µL alınarak 250 µL NED ve 250 µL sülfanilamit ilave edildi. Absorbanslar 545 nm’de okundu.

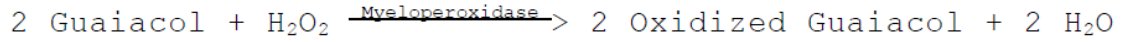
d. Sonucun hesaplanması

Standartın konsantrasyonundan yararlanılarak ve dilüsyon faktörü de göz önüne alınarak NO değerleri doku örneği için µmol/mg protein olarak hesaplandı (2,31).

3.2.5 Karaciğer Dokusu Miyeloperoksidaz Aktivite Ölçümü:

a. Ölçüm prensibi

Yöntem, MPO’nun katalizlediği reaksiyonda guaiacol ve hidrojen peroksit’ten oluşan okside guaiacol’un ölçümüne dayanmaktadır (36).



b. Miyeloperoksidaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 50 mM Potasyum Fosfat Buffer (pH 7.0)
2. 0.02 M EDTA
3. % 0.5 hekzadesiltrimetil amonyum bromit
4. 100 mM Guaiacol
5. 0.0017% (w/w) Hidrojen Peroksit

c. Doku homojenatının hazırlanması ve spektrofotometrik ölçüm

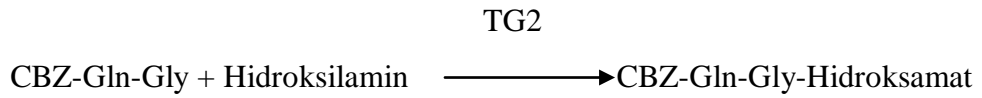
50 mM Potasyum Fosfat Buffer ile 100 mM Guaiacol ve 0.0017% (w/w) Hidrojen Peroksit 100 mL deiyonize suda çözülecek ve 25⁰C’de 1M KOH ile pH 7.0’a ayarlandı. 300 mg doku, 5 ml 0.02 M EDTA tamponu içerisinde homojenizasyondan sonra 20000’g de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılıp pellet, eş hacimdeki 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide içerisinde resüspanse edildi ve aynı devirde tekrar santrifüj edildi. Supernatant, MPO ölçümü için kullanıldı. 470 nm de 1 dakika boyunca oluşan absorbansdaki değişim spektrofotometrede gözlemlendi. Sonuçlar dilüsyon

faktöründe göz önüne alınarak U/mg protein olarak hesaplandı. Süpernatantta total protein ölçümü Bradford metoduna göre yapıldı (23,36).

3.2.6 Karaciğer dokusu TG2 aktivite ölçümü

Ölçüm Prensipleri:

TG2 aktivitesi kolorimetrik olarak ölçüldü.



Yöntem, TG2'nin katalizlediği reaksiyonda Hidroksilamin ve karbobenzoksi-Z-glutaminilglisin (CBZ-Gln-Gly)'den oluşan γ -glutamilhidroksamat'ın ölçümüne dayanmaktadır(44).

Örnek hazırlanması:

a.Doku homojenatının hazırlanması

0,25 M süzkroz çözeltisi hazırlandı. Örnek tüplerine 1 gram doku için 2,5 mL süzkroz çözeltisi eklendi. Örnekler orta hızda 2 dakika homojenize edildi. Homojenatlar, +4°C'de 105.000 x g'de 1saat santrifüj edildi. Süpernatant alınarak ölçüm için kullanıldı.

b.Çözeltiler

1. Reaktif I (0,2 M Tris asetat içinde, pH:6, 37°C):
 - a. 30mM CBZ-Gln-Gly
 - b. 1mM EDTA
 - c. 5mM CaCl₂
 - d. 0,1M Hidroksilamin
2. Ferrik klorid reaktifi(eşit hacimlerde):
 - a. %15 TCA
 - b. %5 FeCl₃

c. 2,5 N HCl

c. Spektrofotometrik ölçümü

Kör ve örnek tüpleri hazırlandı. Kör ve örnek tüplerine 0,4 mL reaktif I pipetlendi. Tüpler su banyosunda 37⁰C'ye ısıtıldı. Kör tüpüne 0,1 mL distile su, örnek tüplerine 0,1 mL süpernatant eklendi, karıştırıldı ve 37⁰C'deki su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüplere 0,5 mL ferrik klorid reaktifi eklendi. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ölçüm için kullanıldı. Örneklerin absorbanları 525 nm'de köre karşı okundu.(124,125) Süpernatantların protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlendi. (23).

d. Sonucun hesaplanması

1. Bir U, bir dakikada 1 µmol γ-glutamihidroksamat oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. Sonuçlar U/mg protein olarak verildi.
2. Ürün için 525 nm'deki absorpsiyon katsayısı 340 M⁻¹ cm⁻¹'dir.(44,112).

3.2.7. Karaciğer Dokusu Protein Ölçümü

Ölçüm Prensipleri:

Ölçüm, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasına dayanan Bradford yöntemine göre yapıldı (23).

Örnek hazırlanması:

a. Doku homojenatının hazırlanması

MPO, TG2 ve NO ölçümlerinde kullanılan homojenatlar kullanıldı ve ölçümlerin yapıldığı fraksiyonlarda protein değerleri belirlendi.

b. Çözeltiler

Belirteç: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartıldı. 12.5 mL %95'lik etanolde çözdürülüp üzerine 25 mL %85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı. Bu derişik çözeltilerdir. Kullanılacağı zaman 5 kat sulandırıldı. Whatman no 1 filtreden geçirildikten sonra kullanıldı.

c. Spektrofotometrik ölçüm

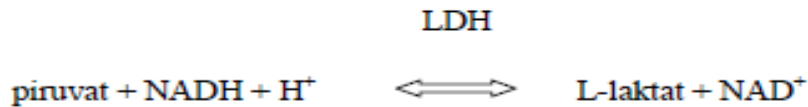
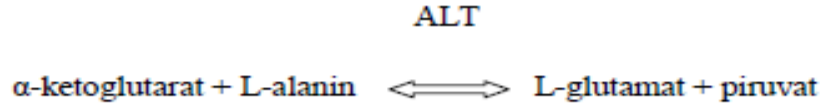
Kör, örnek ve standart tüpleri hazırlandı. Kör tüpüne 0,1 mL distile su ve 5 mL belirteç eklendi. Örnek tüplerine 0,1 mL homojenat ve 5 mL belirteç eklendi. Tüpler vortekslendikten sonra 5 dakika beklendi ve 595 nm'de absorbanları köre karşı okundu.

3.2.8 Serum ALT, AST, ALP ve CRP Ölçümü

Serum örnekleri Roche D,P Module otoanalizöründe çalışıldı.

3.2.8.1 ALT ölçüm prensibi:

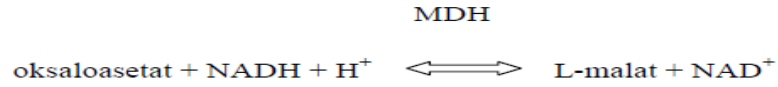
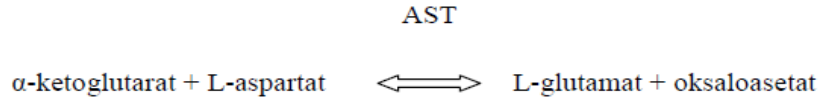
ALT tarafından katalizlenen aşağıdaki reaksiyon ile artan piruvat, Laktat Dehidrojenaz'ın (LDH) katalizlediği reaksiyon ile laktata dönüşürken NADH da oksitlenerek NAD⁺'ye dönüşür.



Piruvatın oluşum hızı ve dolayısıyla ALT aktivitesindeki artışla direkt orantılı olarak NADH miktarındaki azalma fotometrik olarak ölçülür.

3.2.8.2 AST ölçüm prensibi:

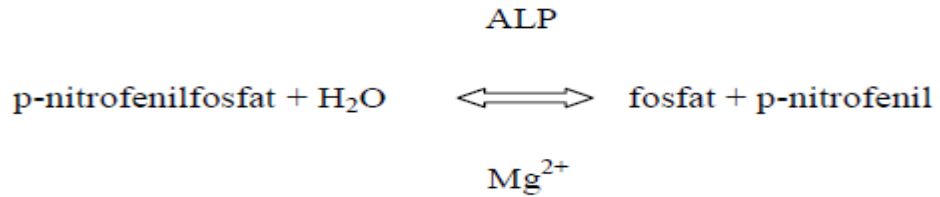
AST tarafından katalizlenen aşağıdaki reaksiyon ile artan oksaloasetat, Malat Dehidrojenaz'ın (MDH) katalizlediği reaksiyon ile malata dönüşürken NADH da oksitlenerek NAD⁺'ye dönüşür.



Oksaloasetatın oluşum hızı ve dolayısıyla AST aktivitesindeki artışla direkt orantılı olarak NADH miktarındaki azalma fotometrik olarak ölçülür.

3.2.8.3 ALP ölçüm prensibi:

p-nitrofenil fosfat, magnezyum ve çinko iyonları varlığında ALP tarafından hidrolize edilir ve ürünler fosfat ile p-nitrofenildir. ALP aktivitesi ile orantılı olarak salınan p-nitrofenil, kolorimetrik olarak ölçülür.



3.2.8.4 hsCRP ölçüm prensibi:

Partikül yüzeyi genişletilmiş immünötürbidimetrik bir testtir. Lateks mikropartiküllerine bağlanmış anti-CRP antikorları numune içindeki antijenle reaksiyona girip, bir antijen/antikor kompleksi oluşturmuştur. Aglütinasyonun ardından bu türbidimetrik olarak ölçülmüştür.

3.2.9 İstatistiksel Analiz

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından yapıldı. Analizlerde SPSS for Windows 20,0 yazılımı kullanıldı.

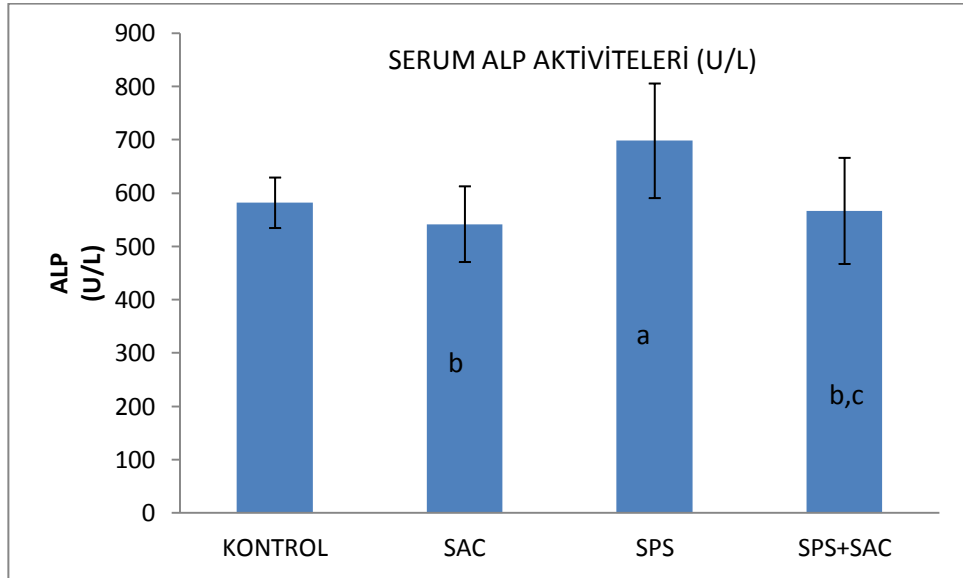
Değişkenlere ilişkin dağılım formlarının belirlenmesinde normallik testlerinden Shapiro Wilk's testi uygulandı ve normal dağılan verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında ANOVA testi, farklı grupların belirlenmesinde ise post hoc testlerden tukey testi kullanıldı. Normal dağılmayan verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında ise Kruskal Wallis testi uygulandı .

4. BULGULAR

Serum ALP aktiviteleri kontrol grubunda $581,88 \pm 47,35$, S-Allilsistein grubunda $541,78 \pm 70,99$, Sepsis Grubunda $698,13 \pm 107,47$, Sepsis+SAC Grubunda $566,63 \pm 99,54$ olarak bulundu. Serum ALP aktivitelerinde Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda anlamlı derecede fark bulundu ($p < 0,05$). Kontrol Grubuna göre serum ALP aktivitelerinde SAC ve Sepsis+SAC gruplarında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p > 0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubu ALP aktivitelerinde arasında anlamlı derecede fark bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 1: Serum ALP aktiviteleri (U/L)

GRUPLAR	KONTROL	SAC	SEPSİS	SEPSİS+SAC
	$581,88 \pm 47,35$	$541,78 \pm 70,99^b$	$698,13 \pm 107,47^a$	$566,63 \pm 99,54^{b,c}$



Grafik 1: Serum Alkalen Fosfataz (ALP) aktiviteleri (U/L)

a: Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$

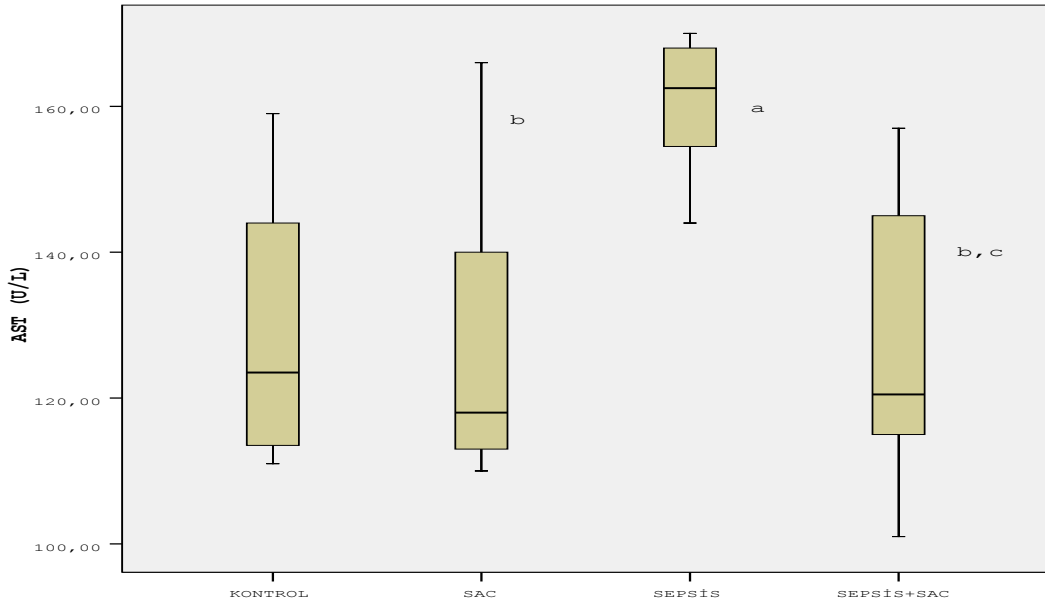
b: Kontrol grubuna göre fark $p > 0,05$

c: SPS grubuna göre fark $p < 0,05$

Serum AST aktiviteeri Kontrol grubunda 123,5, SAC grubunda 118, Sepsis Grubunda 162,5, Sepsis+SAC grubunda ise 120,5 olarak bulundu. Serum AST aktiviteeri kontrol grubuna göre Sepsis grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının serum AST aktiviteeri arasında fark bulunmadı ($p>0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun AST aktiviteeri arasında anlamlı derecede fark bulundu ($p<0,05$).

Tablo 2: Serum AST aktiviteeri (U/L)

	KONTROL	SAC	SEPSİS	SEPSİS+SAC
Median	123,5	118 ^b	162,5 ^a	120,5 ^{b,c}
25%	113,5	112,75	154,5	115
75%	144	146,25	168	145



Grafik 2: Serum Aspartat amino transferaz (AST) aktiviteeri (U/L)

a: Kontrol grubuna göre fark $p< 0,05$

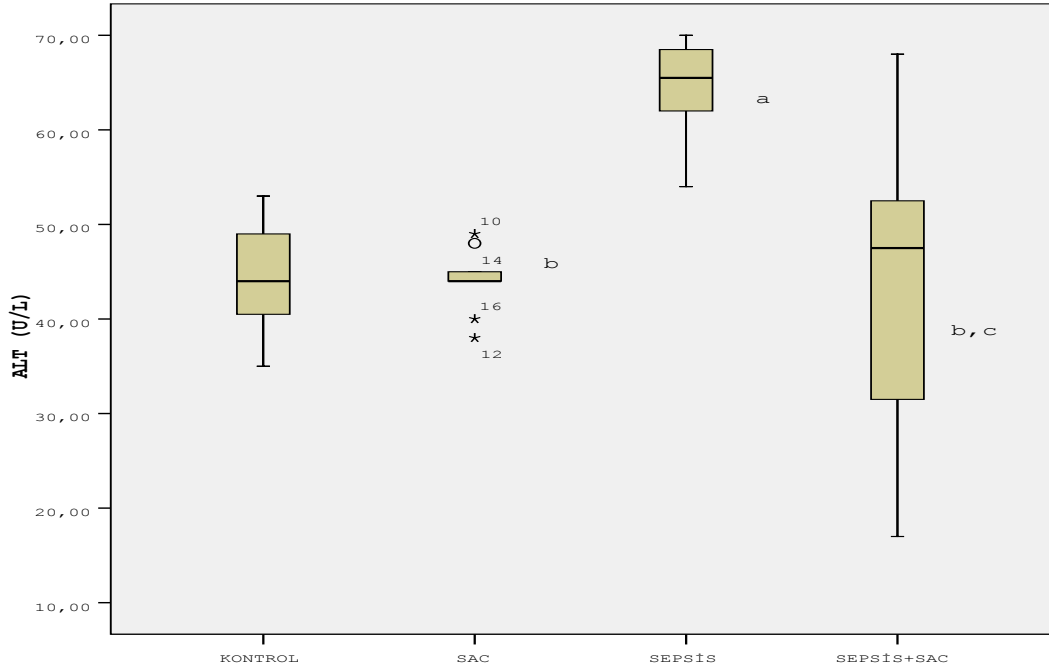
b: Kontrol grubuna göre fark $p>0,05$

c: SPS grubuna göre fark $p< 0,05$

Serum ALT aktiviteleri Kontrol grubunda 44, SAC Grubunda 44, Sepsis Grubunda 65,5, Sepsis+SAC 47,5 olarak bulundu. Serum ALT aktiviteleri kontrol grubuna göre Sepsis grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının serum ALT aktiviteleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun ALT aktiviteleri arasında anlamlı derecede fark bulundu ($p<0,05$).

Tablo 3: Serum ALT aktiviteleri (U/L)

	KONTROL	SAC	SEPSİS	SEPSİS+SAC
Median	44	44 ^b	65,5 ^a	47,5 ^{b,c}
25%	40,5	43	62	31,5
75%	49	45,75	68,5	52,5



Grafik 3: Serum Alanin aminotrasferaz (ALT) aktiviteleri (U/L).

a: Kontrol grubuna göre fark $p< 0.05$

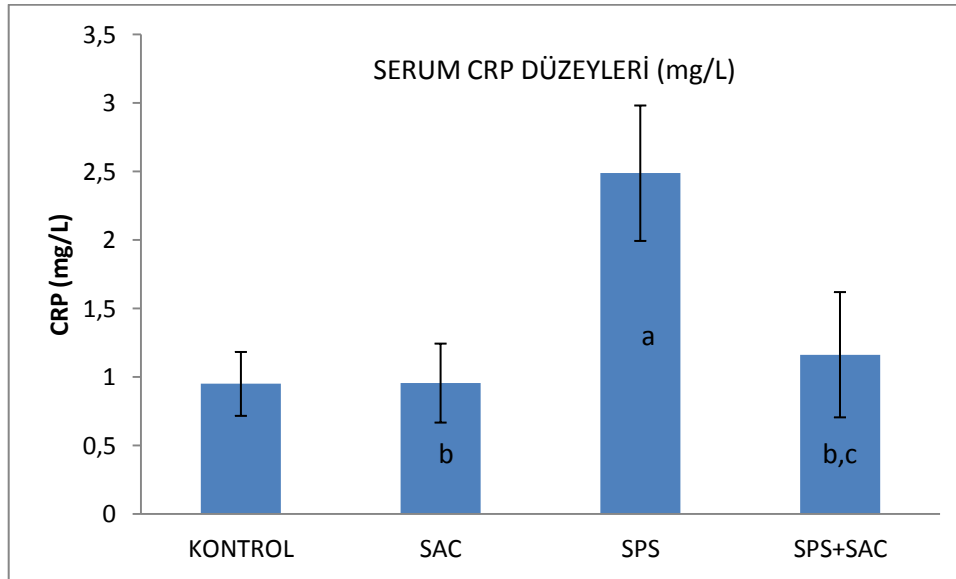
b: Kontrol grubuna göre fark $p>0.05$

c: SPS grubuna göre fark $p< 0.05$

Serum hsCRP Düzeyleri Kontrol grubunda $0,95\pm0,23$, SAC grubunda $0,96\pm0,29$, Sepsis grubunda $2,49\pm0,49$, Sepsis grubunda $1,16\pm0,46$ olarak bulundu. Serum hsCRP düzeylerinde Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda ileri derecede yüksek fark bulundu ($p<0,001$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının serum hsCRP seviyeleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun hsCRP düzeyleri arasında ileri derecede fark bulundu ($p<0,001$).

Tablo 4: Serum hsCRP düzeyleri (mg/L)

GRUPLAR	KONTROL	SAC	SEPSİS	SEPSİS+SAC
	$0,95\pm0,23$	$0,96\pm0,29^b$	$2,49\pm0,49^a$	$1,16\pm0,46^{b,c}$



Grafik 4: Serum C-reaktif protein (hsCRP) düzeyleri.

a: Kontrol grubuna göre fark $p<0,001$

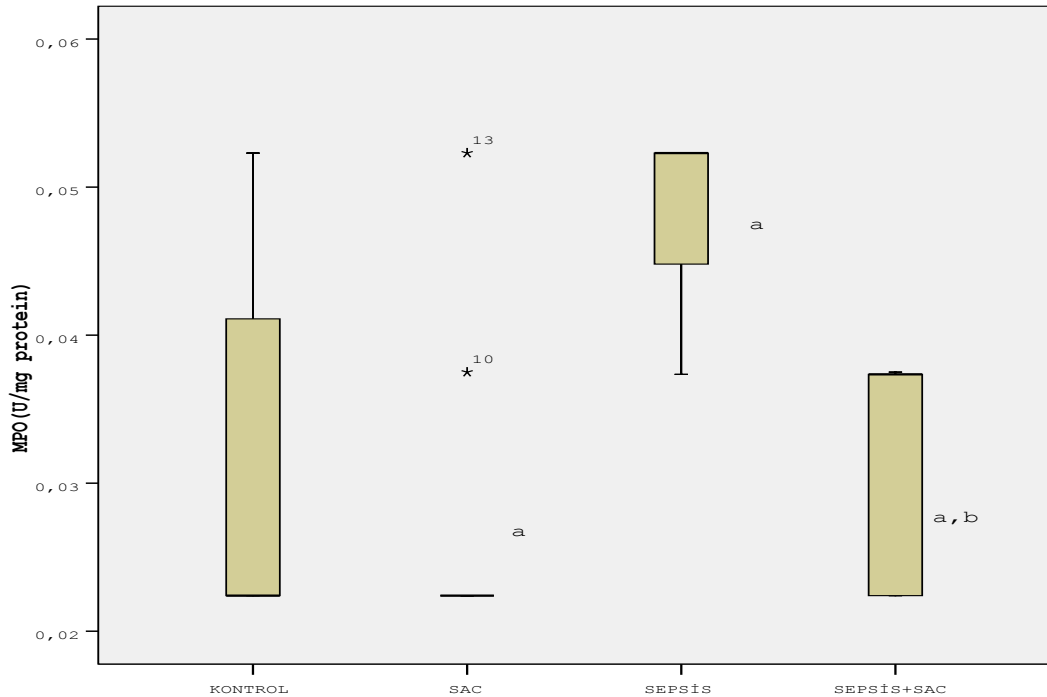
b: Kontrol grubuna göre fark $p>0,05$

c: SPS grubuna göre fark $p<0,001$

MPO Aktivitesi Kontrol grubunda 0,0224, SAC grubunda 0,0224, Sepsis grubunda 0,0523, Sepsis+SAC grubunda 0,0374 olarak bulundu. Karaciğer MPO düzeyleri Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının karaciğer MPO aktiviteleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun karaciğer MPO aktivitesi arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 5: Karaciğer dokusu MPO aktivitesi (U/mg protein)

	KONTROL	SAC	SEPSİS	SEPSİS+SAC
Median	0,0224	0,0224 ^a	0,0523 ^a	0,0374 ^{a,b}
25%	0,0224	0,0224	0,0448	0,0224
75%	0,0411	0,0262	0,0523	0,0374



Grafik 5: Karaciğer dokusu MPO aktivitesi (U/mg protein).

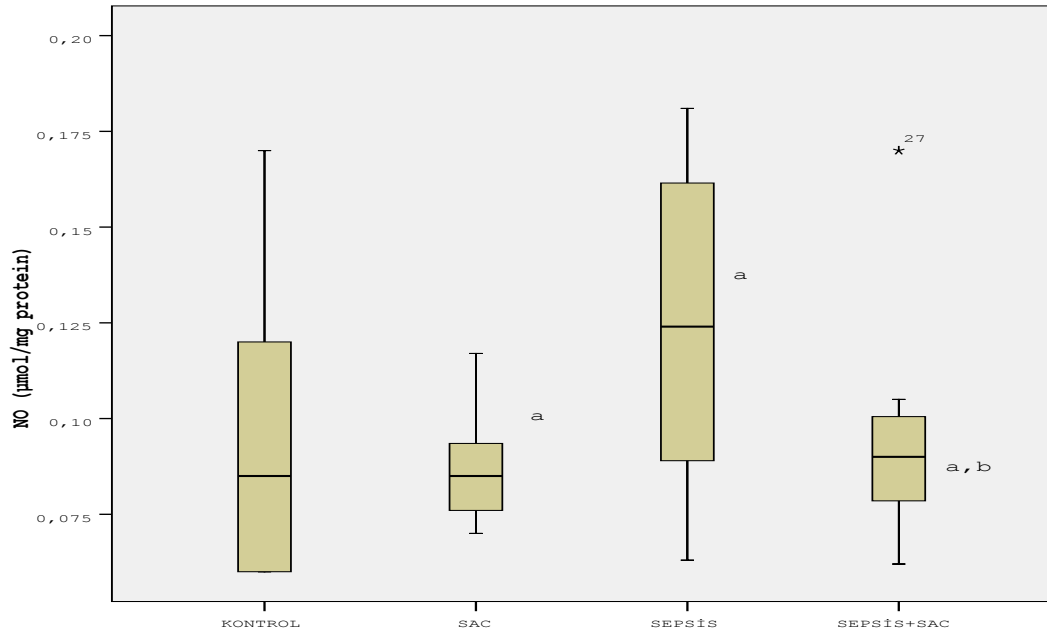
a: Kontrol grubuna göre fark $p>0.05$

b: SPS grubuna göre fark $p>0.05$

NO düzeyleri kontrol grubu 0,085, SAC grubu 0,085, Sepsis grubu 0,124, Sepsis+SAC grubu 0,09 olarak bulundu. . Karaciğer NO düzeyleri kontrol grubuna göre Sepsis grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının karaciğer NO aktiviteleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun karaciğer NO aktivitesi arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 6: Karaciğer doksu NO düzeyleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)

	KONTROL	SAC	SEPSİS	SEPSİS+SAC
Median	0,085	0,085 ^a	0,124 ^a	0,09 ^{a,b}
25%	0,06	0,076	0,089	0,0785
75%	0,12	0,0935	0,1615	0,1005



Grafik 6: Karaciğer dokusu NO düzeyleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein).

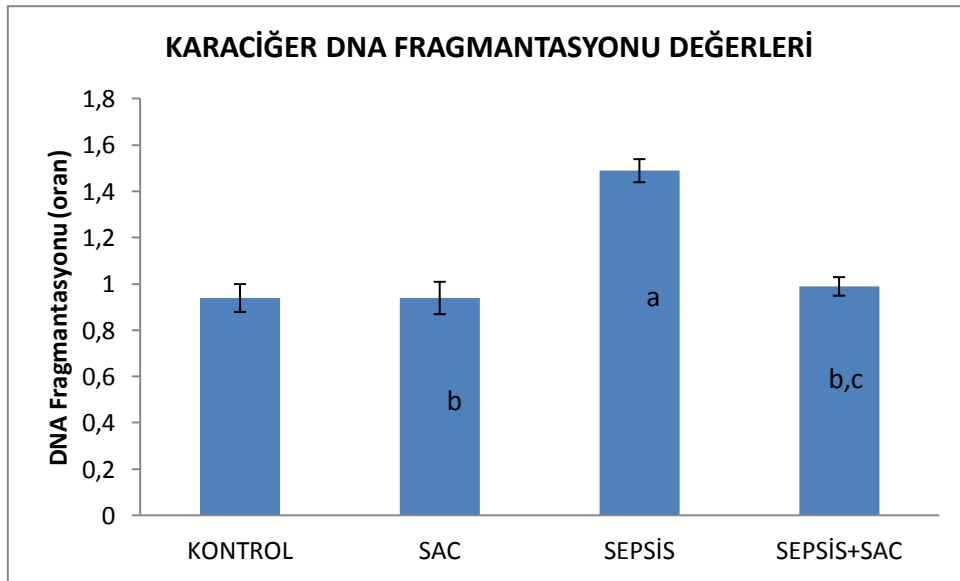
a: Kontrol grubuna göre fark $p>0.05$

b: SPS grubuna göre fark $p>0.05$

DNA Fragmentasyonu kontrol grubunda $0,94\pm0,06$, SAC grubunda $0,94\pm0,07$, Sepsis grubunda $1,49\pm0,05$, Sepsis+SAC grubunda $0,099\pm0,04$ olarak bulundu. Karaciğer DNA Fragmentasyonu değerleri Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda ileri derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının Karaciğer DNA Fragmentasyonu değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun Karaciğer DNA Fragmentasyonu değerleri arasında ileri derecede fark bulundu ($p<0,001$).

Tablo 7: Karaciğer dokusu DNA Fragmentasyonu (% süpernatant/pellet)

GRUPLAR	KONTROL	SAC	SEPSİS	SEPSİS+SAC
	$0,94\pm0,06$	$0,94\pm0,07^b$	$1,49\pm0,05^a$	$0,099\pm0,04^{b,c}$



Grafik 7: Karaciğer dokusu DNA Fragmentasyonu düzeyleri.

a: Kontrol grubuna göre fark $p< 0.001$

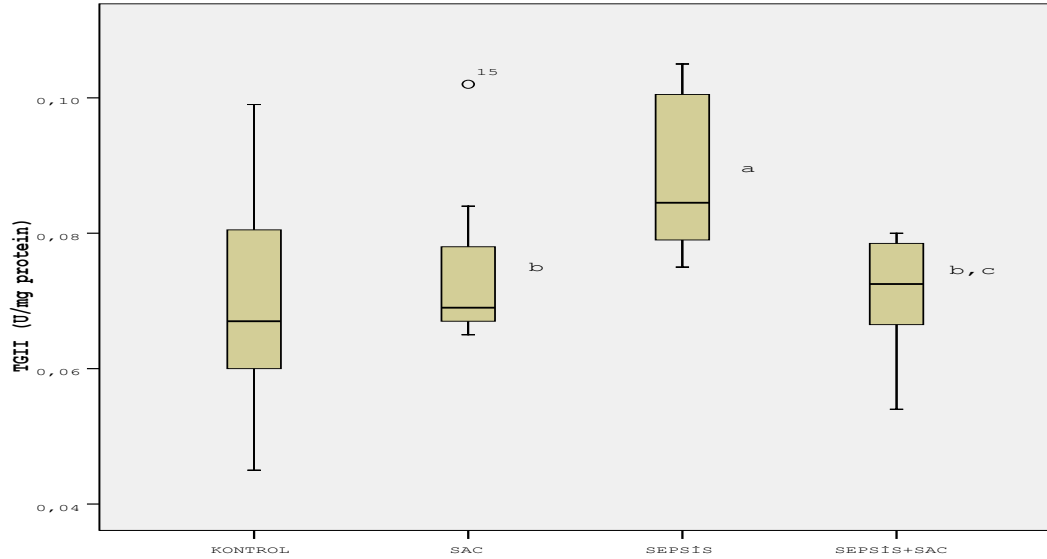
b: Kontrol grubuna göre fark $p>0.05$

c: SPS grubuna göre fark $p< 0.001$

Transglutaminaz 2 aktivitesi kontrol grubunda 0,067, SAC grubunda 0,069, Sepsis grubunda 0,0845, Sepsis+SAC grubunda 0,0725 olarak bulundu. Karaciğer TG2 değerleri Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının Karaciğer TG2 değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun Karaciğer TG2 değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 8: Karaciğer dokusu Transglutaminaz 2 aktivitesi (U/mg protein)

	KONTROL	SAC	SEPSİS	SEPSİS+SAC
Median	0,067	0,069 ^b	0,0845 ^a	0,0725 ^{b,c}
25%	0,06	0,067	0,079	0,066
75%	0,08	0,078	0,101	0,0785



Grafik 8: Karaciğer dokusu TG2 aktiviteleri (U/mg protein).

a: Kontrol grubuna göre fark $p< 0,05$

b: Kontrol grubuna göre fark $p>0,05$

c: SPS grubuna göre fark $p>0,05$

5.TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında LPS ile sepsis modeli oluşturulan ratların karaciğer dokusunda SAC'ın TG2, DNA Fragmantasyonu, NO, MPO ve serumda AST, ALP, ALT, hsCRP parametreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma, LPS ile sepsis modeli oluşturulan ratlarda SAC'ın ALT, AST, ALP, hsCRP, MPO, NO, DNA Fragmantasyonu ve TG2 aktiviteleri üzerine yapılan ilk çalışma olarak özgün niteliktedir.

Çalışmamızda, LPS ile sepsis oluşturulan ratlarda ALT, AST ve ALP değerleri kontrol grubuna göre Sepsis grubunda anlamlı derecede artmış olarak bulundu($p<0,05$).

Karaciğer bir yandan sepsise neden olan bakterilerin, endotoksinlerin, sepsis sırasında oluşan vazoaaktif maddelerin klirensini, detoksifikasyonunu sağlamakta, diğer yandan da konak savunmasında yer alan hücrelerin aktivitelerini düzenlemektedir. Sepsiste karaciğerin içinde olduğu iki karşıt durum vardır. Karaciğer, hem enflamatuvar mediyatörlerin kaynağı olup, hem de bu mediyatörlerden etkilenen hedef organ olmaktadır.

Karaciğerin bu ikili rolünü iki temel mekanizma açıklar. Birincisi, toplam kardiyak debinin % 25' ini alan karaciğer kanlanmasıdır. İkincisi, Kupffer hücreleri, hepatositler ve endotelial sinüzoidal hücrelerden oluşan karaciğerin heterojen hücre yapısıdır. Bu hücrelerin hepsi bağışıklık, antienfeksiyöz ve metabolik rollere sahiptir. Karaciğer, ağır enfeksiyona sistemik yanıtta çok önemli düzenleyici rol oynar, çünkü yapısında çok sayıda bulunan makrofajlar, endotoksin ve bakterileri kandan temizleyebilir ve sistemik enflamatuvar yanıtı başlatabilirler. Sepsisin indüklediği karaciğer disfonksiyonu primer ve sekonder bozukluk olmak üzere iki grupta incelenebilir. Primer karaciğer disfonksiyonu şok ve resüsitasyon sonrası gelişir ve sistemik veya mikrosirkülatuvar bozuklukla ilişkili olarak ortaya çıkar. Primer karaciğer hasarı dolaşım bozukluğunun ilk saatlerinde başlar. Bunun sonucunda sıklıkla hepatik laktat ve aminoasit klirensinde, glikoneogenezde ve glikojenolizde azalma ve bunları izleyen hipoglisemi oluşur. Hepatositlerdeki akut hücresel ve mitokondriyal hasar, serum aminotransferaz enzimlerinde artışla kendini belli eder.

Sekonder karaciğer fonksiyon bozukluğunun (kolestaz) ise bakteri veya endotoksinin tetiklediği enflamatuvar sitokinlerin aktifleşmesi sonucunda geliştiği düşünülmektedir. Etiyolojiye bakmaksızın, enflamasyon aracılı kolestaz tablosu, endotoksinlerin ve/veya endotoksinlerin indüklediği TNF- α ve çeşitli IL'lerin kolestatik etkilerine bağlıdır. Endotoksinler dolaşıma sıklıkla karaciğer dışı periferik enfeksiyon bölgesinden geçerler. Hatta bakteremi ve sepsis olmadan da makrofajlardan sitokin salınımı yoluyla kolestaz gelişebilir.

Lipopolisakkarid, kompleman, immün kompleks ve bakteriler tarafından uyarılan Kupffer hücrelerinden sitokin salınması (IL-1, IL-6, IL-12, TNF α) sonucu lokal sitokin konsantrasyonu artar. Kupffer hücrelerinden salınan sitokinler yoluyla endotelial hücreler, polimorfonükleer lökositler, trombositler, lenfositler uyarılır ve sitokin salınımına katkıda bulunurlar. Lokal sitokin salınımına aynı zamanda hepatositler de katılır. Salınan sitokinler ise hepatosit ve endotelial hücre hasarına yol açar.

Kupffer hücreleri, polimorfonükleer hücreler, eozinofiller, trombositler ve endotel hücrelerinin agregasyonu sinüzoid lümeninin obstrüksiyonuna neden olur. Sinüzoidlerin hipoperfüzyonuna neden olan bu durum, Disse aralığını genişletir. Diğer taraftan kemotaktik faktörlere ek olarak, LPS'in indüklemesiyle hepatosit ve Kupffer hücrelerinden nötrofil kemotaksisine neden olan IL-8 salınımı olur. Bunun sonucunda adezyon moleküllerinde artış yoluyla nötrofil marjinasyonu ve adezyonu gerçekleşir. Bunu takiben serbest oksijen radikallerinde, proteazlarda artış ve hepatosit hasar meydana gelir.

Özetle, uyarılmış enflamatuvar sitokinler aracılığıyla gelişen yukarıda belirtilen süreç sonucunda, hepatosit dejenerasyonu ve/veya apoptozu, endotel hücre hasarı ve sinüzoidal değişiklikler ortaya çıkar. Hepatositlerdeki işlev bozukluğuna bağlı olarakta ciddi sepsis hastalarında alkaline fosfatase, bilirubin ve aminotransferaz düzeyleri sıklıkla yüksek olarak saptanır (77).

Ahmed ve arkadaşları (1) LPS (10 mg/kg, i.p.) ile sepsis modeli oluşturdukları Sprague-Dawley (210-225 g) cinsi ratlardan aldıkları kan örneklerinde alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase enzimlerini kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulmuşlar ve bu aktivite artışının LPS'nin

karaciğerde proteazlar ve serbest oksijen radikallerinin salınımını artırarak karaciğer hasarı oluşturmasından kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir. Öter ve ark. (92) ise farelere intraperitoneal E. coli vererek yaptıkları çalışmalarında E. coli bakterisinin karaciğer harabiyatı oluşturduğunu rapor etmişler ve ALP, AST, ALT enzimlerini sepsis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulmuşlardır.

Deneyimiz, yapılan diğer çalışmalarla korele olup LPS ile oluşturulan sepsis modelinde ratların serumlarında ALT, AST ve ALP enzimleri kontrol grubuna göre sepsis grubunda artmış olarak bulundu. Artışın sebebinin; LPS ile karaciğer dokusunda indüklenen proteazlar ve serbest oksijen radikallerinin karaciğer hasarı meydana getirdiği için olabileceği düşünülmektedir.

Hsu ve ark. (56) yaptıkları deneyde farelere verilen SAC'ın karaciğer hasarı engelleyici etkisinden dolayı ALT, AST, ALP aktivitelerini düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da SAC ile tedavi edilen SEPSİS+SAC grubunda SAC'ın karaciğer hasarını engelleyici etkisinden(81,88,89) dolayı ALT, AST ve ALP düzeylerinin kontrol grubuna yakın bir hal aldığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Serum hsCRP Düzeyleri Kontrol grubunda $0,95\pm 0,23$, SAC grubunda $0,96\pm 0,29$, Sepsis grubunda $2,49\pm 0,49$, Sepsis+SAC grubunda $1,16\pm 0,46$ olarak bulundu. Serum hsCRP düzeyleri Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda ileri derecede artmış bulundu ($p<0,001$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının serum hsCRP seviyeleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun hsCRP düzeyleri arasında ileri derecede fark bulundu ($p<0,001$).

Çalışmamızda LPS ile indüklenen sepsis modelinde, kontrol grubuna göre sepsis grubunda artan hsCRP düzeyi; hsCRP'nin vücutta inflamatuvar olaylara karşı oluşan bir akut faz proteini olduğuyla ilişkilendirilmiştir (95). Hsu ve ark. (56) yaptıkları deneysel çalışmada SAC'ın serum hsCRP aktivitesini düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Bu bulgular çalışmamızla uyumlu olup SEPSİS+SAC grubunda, SAC uygulandığında hsCRP düzeylerinin kontrol grubuna yakın bir hal alması, inflamasyonda TNF-alfa ile indüklenen hsCRP düzeyinin, SAC'ın TNF-alfa kovucu(56) etkisinden dolayı olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda MPO Aktivitesi Kontrol grubunda 0,0224, SAC grubunda 0,0224, Sepsis grubunda 0,0523, Sepsis+SAC grubunda 0,0374 olarak bulundu. Karaciğer MPO düzeyleri Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı($p>0.05$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının karaciğer MPO aktiviteleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun karaciğer MPO aktivitesi arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sepsiste nötrofil sekresyonunun kantitatif bir göstergesi olarak kullanılan MPO aktivitesi fagositik hücrelerde bulunan lizozomal bir enzimdir (69).

Ahmed ve ark. (1), Şener ve ark. (110), Murat ve ark. (82) çalışmalarında karaciğerde MPO aktivitesinin LPS ile oluşturdukları sepsis modelinde kontrol grubuna göre sepsis grubunda arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda LPS ile sepsis modeli oluşturulan ratların sepsis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak MPO aktivitelerinde fark bulunmadı. Fakat grafiklerde gözlenen farkın; inflamasyon durumunda dokularda MPO'un ekstrasellüler ortama salınmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir (119). SAC verildiğinde ise istatistiksel anlamda bir fark bulunmamasına rağmen grafikte farklılık olmasının sebebi SAC'in süperoksit anyonunu, hidroksil radikalini ve en önemlisi hidrojen peroksit radikalini kovucu etkisinden dolayı olduğu düşünülmektedir (59, 66).

Çalışmamızda karaciğer NO düzeyi kontrol grubu 0,085, SAC grubu 0,085, Sepsis grubu 0,124, Sepsis+SAC grubu 0,09 olarak bulundu. . Karaciğer NO seviyeleri Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı($p>0.05$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının karaciğer NO aktiviteleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun karaciğer NO aktivitesi arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$).

NO, bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftlenmemiş elektron vererek birleşmesinden oluşmuştur (50). Bir serbest radikal olan NO, kolaylıkla biyokimyasal reaksiyonlara giren ve biyolojik membranları hızla geçebilen çok kısa ömürlü bir

gazdır. Oksijen ve su tarafından nitrat ve nitritlere dönüştürülür veya süperoksit ile birleşerek peroksiti oluşturur. NO üretimini katalizleyen NOS'lar başlıca, yapısal (constitutively) NOS (cNOS) ve uyarılabilen (inducible) NOS (iNOS) olarak iki gruba ayrılır. iNOS lipopolisakkarid ile indüklenmekte, çok yüksek ve toksik miktarda NO sentezini katalizlemektedir (75).

Sepsisteki oksidatif stres gelişmesindeki birinci basamak mitokondriyal bozulmadır ve ilk adım nitrik oksitteki artıştır. NO, süperoksitin oluşumunu bu da peroksinitrit oluşumunu artırır (17). İnflamasyon sırasında NO önemli bir rol oynar. Makrofajlar tarafından sentezlenen NO, konak savunmasının en önemli parçalarından biri olup protozoa ve tümör hücrelerine karşı gelişen nonspesifik sitotoksositeye neden olur (65).

Yoshimura ve ark. (124), Bergamini ve ark. (17), Murat ve ark. (82) LPS ile indüklenen sepsis modelinde karaciğer NO düzeylerinin sepsis grublarında kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarla korele olan çalışmamızda LPS ile oluşturulan sepsis modelinde NO seviyeleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamasına karşın NO grafiğine bakıldığında NO seviyesinin sepsis grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebi makrofajlarda ve damar düz kaslarında bulunan iNOS'ın lipopolisakkarid ile indüklenmesinden, çok yüksek ve toksik miktarda NO sentezini katalizlemesinden kaynaklanmaktadır(75). Kleschyov ve ark. (67)'nin yaptığı deneysel çalışmada LPS verilmesini takiben damar adventisiasında iNOS'un aktive olduğu saptanmıştır. Kı-mo ve ark (66) ise LPS ile yaptıkları kültür çalışmasında SAC'ın NF-kB aktivasyonunun baskılanma yoluyla iNOS ekspresyonunu inhibe ettiğini saptamışlardır. Yaptığımız deneysel sepsis çalışmasında SAC ile tedavi edilen SEPSİS+SAC grubunda ise SAC'ın makrofajlarda nitrik oksit sentezi inhibe ederek NO üretimini düzenlemesinden(66) ve peroksinitriti kovucu etkisinden dolayı NO seviyesinin kontrol grubuna yaklaştırdığını düşünmekteyiz.

DNA Fragmentasyonu kontrol grubunda $0,94\pm 0,06$, SAC grubunda $0,94\pm 0,07$, Sepsis grubunda $1,49\pm 0,05$, Sepsis+SAC grubunda $0,099\pm 0,04$ olarak bulundu. Karaciğer DNA Fragmentasyonu değerleri Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda ileri derecede

yüksek bulundu ($p<0,001$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının Karaciğer DNA Fragmentasyonu değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun Karaciğer DNA Fragmentasyonu değerleri arasında ileri derecede fark bulundu ($p<0,001$).

Endotoksinle indüklenen sepsis modellerinde oluşan reaktif oksijen türleri hücrel komponentlerdeki protein, karbonhidrat, lipid ve nükleik asitlerde morfolojik değişikliğe yol açmaktadır (110). Serbest oksijen radikalleri DNA'da hasara, hücrel proteinlerde denatürasyona ve membran lipidlerinde peroksidasyona yol açarak doku hasarına neden olur (20,91). DNA'yı etkileyen serbest radikaller tek ya da çift dal kırıklarına neden olurlar. DNA üzerinde yaptıkları etki ile hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Aktive olmuş nötrofillerden salınan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına ve hatta hücre ölümüne yol açabilmektedir (16).

Sağlıklı bireylere endotoksin enjeksiyonundan sonra 60–90 dakika içinde yükselen TNF-alfa'nın plazma ve serum düzeylerinin sepsisli hastalarda yükseldiği ve TNF-alfa düzeyiyle yaşam oranı arasında ters bir ilişki olduğu saptanmıştır (78). Artan TNF-alfa düzeylerinin TNFR1 reseptörü aracılığı ile kaspaz 8'i aktive ettiği ve kaspaz 8'in kaspaz 3 aktivasyonunun DNA fragmentasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (34).

Ebach D.R. (122) ve arkadaşları, Ahmed ve arkadaşları (1) oluşturdukları sepsis modelinde TNFR1(TNF-alfa reseptör-1)'nin rolünü araştırmışlar ve farelerde TNFR1 yokluğunda yaşam süresinin uzadığını tesbit etmişlerdir. TNFR1 yokluğunda yaşam süresinin uzamasını, sepsiste TNF-alfa'nın apoptosis kaskadını başlatmasıyla ilişkilendirmişlerdir. Bohlinger ve ark.(18) ise fareye endotoksinin enjeksiyonu ile oluşturdukları septik şok modelinde, endotoksin uygulamasının karaciğer, akciğer, böbrek ve barsakta TNF-alfa'nın aktivasyonunun ve serbest oksijen radikallerinin DNA parçalanmalarına neden olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmalarla uyumlu olan çalışmamızda, LPS ile sepsis modeli oluşturulan ratların sepsis grubunda kontrol grubuna göre DNA Fragmentasyonunun ileri derecede yüksek bulunmasının sebebi TNF-alfa'nın ve serbest oksijen radikallerinin apoptosisi tetiklemesinden (34) kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Hsu ve ark. (56) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada TNF-alfa düzeyinin SAC verildikten sonra azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu bulgular ışığında

çalışmamızda Sepsis+SAC grubuna SAC verildiğinde DNA fragmantasyonundaki azalma SAC'ın TNF-alfa azaltıcı etkisiyle ilişkilendirilebilir(56) .

Çalışmamızda Transglutaminaz 2 aktivitesi kontrol grubunda 0,067, SAC grubunda 0,069, Sepsis grubunda 0,0845, Sepsis+SAC grubunda 0,0725 olarak bulundu. Karaciğer TG2 değerleri Kontrol grubuna göre Sepsis grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubuna göre SAC ve Sepsis+SAC gruplarının Karaciğer TG2 değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Sepsis grubuna göre Sepsis+SAC grubunun Karaciğer TG2 değerleri arasında fark bulunmadı ($p>0,05$).

Transglutaminaz 2 (TGase 2; E.C. 2.3.2.13, protein-glutamine glutamyltransferase) kalsiyum bağımlı multi fonksiyonel bir enzimdir (108). Normal olarak birçok doku tarafından düşük seviyelerde üretilen TG2, çeşitli patolojik durumlarda aktive edilmektedir. Bununla birlikte transglutaminaz 2'nin hastalıklardaki etiyolojisi henüz açık değildir (91). Hücre farklılaşması, sinyal transdüksiyonu, apoptosis ve dış ve iç uyaranlar tarafından oluşturulan strese hücrenin cevabı gibi çeşitli fizyolojik olaylarda transglutaminaz 2'nin upregülasyonu ve aktivasyonu rapor edilmiştir (27). İnflamatuar hastalıklarda transglutaminaz 2 ekspresyonu artmaktadır. TG2 ekspresyonun birçok organ ve dokuda LPS ile indüklendiği rapor edilmiştir. İn-vitro hücre kültürü çalışmaları TG2'nin NF- κ B aktivasyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. NF- κ B'nin hem hayvan septik şok çalışmalarında hem de sepsisli insan örneklerinde her organda arttığı gösterilmiştir (42). Ayrıca TG2 enziminin inhibisyonu ile beyin hasarı, alerjik konjunktivit ve akciğer fibrozis modellerinde inflamatuvar prosesi tersine çevirdiği düşünülmektedir (28,108). Bunun yanı sıra, apoptosiste aktivitesi artan transglutaminaz enzimi apoptotik hücrelerin diğer hücrelerle bağlantılar oluşturabilme yeteneğinin bozulmasında rol oynamaktadır (94).

Bu bilgilere ek olarak Geng ve ark. SAC'ın H₂O₂ ve TNF-alfa ile indüklenen nükleer faktör kappa B aktivasyonunu engellediğini yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (47). Aynı zamanda yapılan hücre kültürü çalışmalarında TG2 aktivitesindeki artış NF- κ B aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (102). Bu bilgiler ışığında LPS ile sepsis modeli

oluşturduğumuz çalışmamızda sepsis grubunda kontrol grubuna göre TG2 aktivitesindeki yükselişin diğer çalışmalarda da vurgulanan NF-kB ile alakalı olduğunu düşünmekteyiz. SEPSİS+SAC grubunda ise TG2 aktivitesinde Sepsis grubuna göre istatistiksel olarak fark bulunmamasına rağmen grafikte fark görülmesinin sebebi SAC'ın TNF-alfa ve H₂O₂ radikali kovucu etkisinden dolayı olabilir (47,56,59).

Sonuç olarak alışmamızda, SAC uygulanan sepsis grubunda ALT, AST, ALP, hsCRP aktivitelerinde ve DNA Fragmantasyonunda azalma gözlendi. SAC ile tedavi edilen sepsis grubunun MPO, NO ve TG2 enzim aktivitelerinde ise anlamlı olmamakla birlikte azalma saptandı. Literatürlerde sepsiste SAC'ın etkinliği araştırılmadığından, enzim aktivitelerindeki ve diğer parametrelerdeki değişikliklerin biyokimyasal mekanizmaların anlaşılması için daha fazla araştırmaya yapmaya gerek vardır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda LPS ile sepsis modeli oluşturduğumuz ratların karaciğer dokusunda SAC'ın TG2 aktivitesi üzerine etkilerini araştırdık. Bununla birlikte karaciğer dokusunda DNA Fragmantasyonu, NO aktivitesi, MPO aktivitesi ve serum ALT, AST, ALP, CRP enzimlerini ölçtük.

Sonuç olarak;

1. Serum ALP, AST ve ALT aktiviteleri sepsis grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Tedavi amaçlı SAC verildiğinde ise serum ALP, AST ve ALT aktivitelerinde SAC'ın düşürücü etkisi gözlemlendi.
2. Serum hsCRP seviyeleri sepsis grubunda artarken, SAC uygulanan grupta sepsis grubuna göre hsCRP düzeyleri azaldı.
3. Karaciğer dokusu MPO enzim aktivitelerinde ve NO düzeylerinde, sepsis grubunda kontrol grubuna göre grafiklerde artış gözlenmesine rağmen istatistiksel bir farklılık bulunmadı. Aynı şekilde SAC uygulanan grupların MPO aktivitelerinde ve NO düzeylerinde azalma gözlenmesine rağmen SAC'ın bu azaltıcı etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
4. Karaciğer dokusu DNA Fragmantasyonu sepsis grubunda artarken, SAC uygulanan grupta DNA Fragmantasyonu'nun azaldığı gözlemlendi.
5. Karaciğer dokusu TG2 enzim aktivitesi sepsis grubunda artarken, SAC uygulanan grupta TG2 aktivitesinde azalma gözlenmesine rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, sepsisin karaciğerde ALT, AST, ALP, MPO, TG2 enzimlerinin aktivitelerini ve CRP, NO düzeylerini artırdığı ve bunun yanında karaciğer dokusunda DNA Fragmantasyonuna sebep olduğu

belirlendi. SAC uygulamasının sepsisin artırdığı enzim aktivitelerine ve DNA Fragmantasyonuna olumlu etkileri saptandı.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Ahmed M. Mohamadin, Ahmed A. Elberry , Mohamed A. Elkablawy, Hala S. Abdel Gawad , Fahad A. Al-Abbasi Montelukast, A leukotriene receptor antagonist abrogates lipopolysaccharide-induced toxicity and oxidative stress in rat liver. *Pathophysiology* 2011 ;18:235–242
2. Altıntaş, S., Kahramanmaraş'ta Bazı İş Kollarında Çalışan Boya İşçilerinde Plazma Ve Eritrosit Membran Siyalik Asit, Glutasyon, Plazma Nitrik Oksit ve Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, (2006).
3. Amagase, H., Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr* 2006; 136:716-25.
4. Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., Kasuga, S., Itakura, Y., Intake of garlic and bioactive compounds. *J Nutr* 2001;131:955-62.
5. Andrews, P.C., Krinsky, N.I., Human myeloperoxidase and hemimyeloperoxidase. *Methods Enzymol* 1986; 132:369–78.
6. Angus, D.C., Wax, R.S., Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29:109-16.
7. Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guinestre, M.C., Guidet, B., Current Epidemiology of Septic Shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168: 165.
8. Arndt, P., Abraham, E., Immünological therapy of sepsis: experimental therapies. *Intensive Care Med* 2001; 27: 104-15.
9. Atmaca, G., Sarımsağın ve tiol içeren bazı bileşiklerin antioksidatif etkileri. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg* 2003; 20(1-3):54-60.
10. Atroshi, F., Rizzo, A., Biese, I., Veijalainen, J., Saloniemi, H., Sankari, S., Andersson, K., Fumonisin B -Induced DNA Damage In Rat Liver And Spleen: 1 Effects Of Pretreatment With Coenzyme Q , L-Carnitine, 10 A-Tocopherol And Selenium, *Pharmacological Research*, 40:6, 459-467, 1999.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

11. Aygen, B., Kayabaş, Ü., Güven, M., Doğanay, M., Sümerkan, B., Yıldız, O., Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yoğun Bakım Üniteleri nazokomiyal infeksiyonları sürveyansı: Epidemiyoloji, risk faktörleri ve prognozu etkileyen faktörler. Yoğun Bakım Dergisi 2001;1:122-30.
12. Badley, A.D., Steckelberg, J.M., Sepsis Syndrome. In: Wilson WR, Sande MA (eds): Current Diagnosis and Treatment In Infectious Diseases. McGraw-Hill, New York, 2001:231-9.
13. Balk, R.A., Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock. Crit Care Clin 2000;16: 337-52.
14. Bannerman, D.D., Goldblum, S.E., Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury, Lab Invest 1999;79(10):1181-99.
15. Başak, M., Coşansel, S., Çankır, Z., Keskin, O., Yazgan, Y., Koçak, N., Sepsis, septik şok ve tedavide son yaklaşımlar. Sendrom 1998;10:54-61.
16. Bender, D.A., Mayes, P.A., Vitamins & Minerals, Harper's Illustrated Biochemistry, twenty-sixth edition. McGraw-Hill Companies, 2003:481-98.
17. Bergamini, S.C., Rota, R., Canali, M., Stafieri, F., Daneri, A., Bini, F., Giovannini, A., Tomasi & A.Iannone: N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. Nitric Oxide. 2001; 5: 349-360.
18. Bohlinger, I., Leist, M., Gantner, F., Angermuller, S., Tiegs, G., Wendel, A., DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. Am J Pathol. 1996 Oct;149(4):1381-93.
19. Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., et al. American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure guidelines for the use innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992; 101: 1644-55.
20. Bone, R.C., Gram-negative sepsis: Background, clinical features and intervention. Chest 1991;100(3):802-8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

21. Bone, R.C., Grodzin, C.J., Balk, R.A., Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997;112:235-43.
22. Bone, R.C., The patogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457.
23. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*1976, 72, 248.
24. Brent, J.A., Rumack, H.H., Role of free radicals in toxic hepatic injury. *Free Radicals Biochemistry, Clin Toxicol* 1993; 31: 139-71.
25. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X., Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:269-90.
26. Busse, R., Mulsch, A., Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle. *FEBS Lett* 1990;275:87-90.
27. Caccamo, D., Curro, M., Ferlazzo, N., Condello, S., Ientile, R., Monitoring of Transglutaminase 2 Under different Oxidative Stress Conditions, *Amino Acids*, 2011, DOI 10.1007/s00726-011-1018-8
28. Choi, Y.C., Park, G.T., Kim, T.S., et al. Sporadic inclusion body myositis correlates with increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2. *J Biol Chem* 2000;275:8703-10.
29. Cinel, I., Opal, S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis. *Crit Care Med* 2009;37:291-304.
30. Closa, D., Folch, P.H., Oxygene free radicals and systemic inflammatory reponse. *IUBMB Life.* 2004, 56(4); 185-91.
31. Cortas, N.K., Wakıd, N.W., Determination of Inorganic Nitrate in Serum And Urine By a Kinetic Cadmium-Reduction Method, *Clin. Chem*, 36(8): 1440-1443, (1990).
32. Corzo-Martínez, M., Nieves Corzo, N., Villamiel, M., 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 609–625.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

33. Cosmos K., Transglutaminase 2 as an essential regulatory factor of neutrophil granulocyte differentiation, University of debrecen doctoral school of molecular cell and immune biology (2010).
34. Cotron, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L., Robbins Basic Pathology, Philadelphia 2002. 1. Cell Injury, Adaptation and Death: 3-31.
35. Cristino, C., Ricardo, C., Dolores, J.S., Rogelio, H., Perla, D., Claudia, M.M., Omar, N.M., Edilia, T., Diana, A., Yolanda, C., Jose, P., Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats Am J Physiol Renal Physiol 2007;293:1691-1698
36. Desser, R.K., Himmelhoch, S.R., Evans, W.H., Januska, M., Mage, M., Shelton, E., Arch. Biochem. Biophys.1972, 148, 452-465.
37. Dhainaut, J.F., Yan, B., Cariou, A., et al. Soluble thrombomodulin, plasma-derived unactivated protein C and recombinant human activated protein C in sepsis. Critical Care Med 2002; 30: 318-24.
38. Dunn, D.L., Gram Negative Bacterial Sepsis and Sepsis Syndrome. Surg Clin North. Am. 1994; 74:621–35.
39. Edgeworth, J.D., Treacher, D.F., Eykyn, S.J., A 25-year study of nosocomial bacteriamia in an adult intensive care unit. Crit Care Med 1999;27:1421-8.
40. Erdemir, A., Elçioglu, Ö., Sarımsak ve kyolic. Nobel tıp kitabevleri 1999; 1-95.
41. Facchiano, F., A. Facchiano, and A. M. Facchiano. 2006. The role of transglutaminase-2 and its substrates in human diseases. Front. Biosci. 11: 1758–1773.
42. Falasca, L., Farrace, M.G., Rinaldi, A., Tuosto, L., Melino, G., Piacentini, M., Transglutaminase II is Involved in the Pathogenesis of Endotoxic Shock, The Journal of Immunology, 2008, 180:2616-2624.
43. Fesus, L. and M. Piacentini 2002. Transglutaminase 2 : an enigmatic enzyme with diverse functions. Trends Biochem Sci 27(10): 534-539
44. Folk, J.E., Chung, S.I., Transglutaminases, Methods Enzymol,113,358-75,1985.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

45. Fridovich, L., Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112.
46. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature* 1980; 288: 373-6.
47. Geng, Z., Rong, Y., Lau, B. H., S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic. Biol. Med.* 23:345–350; 1997.
48. Güleçlin, D., Gibberellik asit ve 24-epibrassinolid'in tuz stresi koşullarında çimlendirilen arpa (*hordeum vulgare*) tohumlarında total DNA ve protein içeriğine etkilerinin tespiti, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2008.
49. Güray, A., Türköz, Y., Özerol, H., Nitrik Oksit: Fizyolojisi ve Klinik Önemi.T *Klin J Med Sci.* 1997; 17: 115-119.
50. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free radicals in biology and medicine.* Second Edition Clarendon Press, Oxford, 1989.
51. Halliwell, B., *Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease.* *The Am J Medicine* 1991; 91: 14-22.
52. Harris, R.J., Symon, L., Branston, N.M., et al. Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1: 203-9.
53. Hinshaw, L.B., *Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review.* *Crit Care Med* 1996; 24: 1072-8.
54. Ho, S., Ide, N., Lau, B.H., S-allylcysteine reduces antioxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 8:39–46; 2001.
55. Hotchkiss, R.S., Karl, I.E., *The pathophysiology and threatment of sepsis.* *N Engl J Med* 2003; 348: 138-50.
56. Hsu, CC., Lin, CC., Liao, TS., Yin, MC, Protective effect of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, *Food and Chemical Toxicology*; 2006 Mar;44(3):393-7.
57. Ide, N., Lau, B. H., Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury.*J. Pharm. Pharmacol.* 49:908–911; 1997.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

58. Ide, N., Lau, B. H., S-allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25:619–624; 1999.
59. Ide, N., Lau, B.H., Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J. Nutr.*131:1020S–1026S; 2001.
60. Ide, N., Nelson, A. B., Lau, B. H., Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu^{+2} induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med.* 63:263–264; 1997.
61. Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H.; Itakura, Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* 60:417–420; 1994.
62. Jacobi, J., Pathophysiology of sepsis. *Am Health Syst Pharm.* 2002; 59: 3-8.
63. Kanjii, S., Dewlin, J.W., Piekos, K.A., et al. Recombinant human activated protein C, drotrecogin alfa (activated): a novel therapy for severe sepsis. *Pharmacotherapy* 2001; 21:1389-402.
64. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
65. Kırkeboen, K., Strand, A., The role of nitric oxide in sepsis- an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 275-88.
66. Kim, K.M., Chun, S.B., Koo, M.S., Choi, W.J., Kim, T.W., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Billiar, T.R., Kim, Y.M., Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic. Biol.Med.* 30:747–756; 2001.
67. Kleschyov, A.B., Muller, T., Keravis, M.E., Stoeckel, J.C., Stoclet: Adventitiaderived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin: cell origin and functional consequences. *Amer J Physiol Heart Circ.* 2000; 279: 2743-2751.
68. Klosterhalfen, B., Hörstmann-Jungemann, K., Vogel, P., et al. Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. *Biochem Pharmacol* 1992;43:2103-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

69. Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assesment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984; 87:1344–50.
70. Kurt, C., Sepsisle ilişkili tanımlar, epidemiyoloji, insidans ve klinik. Dikmen Y, Demirkıran O (Editörler). *Güncel bilgiler ışığında sepsis* 2006;51:17-26.
71. Leblanc, A., Day, N., Me'nard, A., and Keillor, J.W. Guinea Pig Liver Transglutaminase: A Modified Purification Procedure Affording Enzyme with Superior Activity in Greater Yiel, *Protein Expr Purif* 17,1,89-95, 1999.
72. Lee, J., Y.-S. Kim, D.-H. Choi, M. S. Bang, T. R. Han, T. H. Joh, and S.-Y. Kim. 2004. Transglutaminase 2 induces nuclear factor- κ B activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J. Biol. Chem.* 279: 53725–53735.
73. Leu, R. W., M. J. Herriott, P. E. Moore, G. R. Orr, and P. J. Birckbichler. 1982. Enhanced transglutaminase activity associated with macrophage activation: possible role in Fc-mediated phagocytosis. *Exp. Cell Res.* 141: 191–199.
74. Mahidhara, R., Billiar, T.R. Apoptosis in sepsis. *Crit Care Med.* 2000 Apr;28(4 Suppl):N105-13.
75. Mariotto, S., Cuzzolin, L., Adami, A., et al. Effect of a new non-steroidal anti-inflammatory drug, nitroflurbiprofen on the expression of inducible nitric oxide syntase in rat neutrophils. *B J Pharmacol* 1995; 115: 225-6.
76. Meisner, M., Tschaikowsky, K., Palmaers, T., et al. Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Crit Care (Lond)* 1999;3:45–50.
77. Mete, B., Sepsiste böbrek ve karaciğer. Dikmen Y, Demirkıran O (Editörler). *Güncel bilgiler ışığında sepsis* 2006;51:35-43.
78. Michie, H.R., Manogue, K.R., Spriggs, D.R., et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *New Engl J Med.* 1988; 318:1481–86.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

79. Modlin, R.L., Brightbill, H.D., Godowski, P.J., The toll of innate immunity on microbial pathogens, *N Engl J Med.* 1999;340(23):1834-5.
80. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 1991; 43: 109-143.
81. Mostafa, M.G., Mima, T., Ohnishi, S.T., S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Med.* 66:148–151; 2000.
82. Murat, P. Deneysel sepsiste betain ve prednizolonun immünomodülör etkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı) 2007.
83. Nagae, S., Ushijima, M., Hatono, S., Imai, J., Kasuga, S., Matsuura, H., Itakura, Y., Higashi, Y. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med.* 1994, 60 (3), 214-217.
84. Nakagawa, S., Kasuga, S., Matsuura, H., Prevention of liver damage by aged garlic extract and its components in mice. *Phytotherapy Res.* 1989, 3 (2), 50-53.
85. Nakagawa, S.; Yoshida, S.; Hirao, Y.; Kasuga, S.; Fuwa, T. Cytoprotective activity of compound of garlic, ginseng and ciuwjia on hepatocyte injury induced carbontetrachloride in vitro. *Hiroshima J. Med. Sci.* 1985, 34 (3), 303-309.
86. Niederman, M.S., Fein, A.M., Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome and nasocomical pneumonia: a common clinical sequence. *Clin Chest Med* 1990;11:633-56.
87. Nishiyama, N., Moriguchi, T., Morihara, N., Saito, H., Ameliorative effect of S-allylcysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence accelerated mice. *J. Nutr.* **2001**, 131 (3S), 1093S-1095S.
88. Numagami, Y., Ohnishi, S.T., S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J. Nutr.* 131:1100S–1105S; 2001.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

89. Numagami, Y., Sato, S., Ohnishi, S. T., Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem. Int.* 29:135–143; 1996.
90. Nyugen, A., Yaffe, M., Proteomics and systems biology approaches to signal transduction in sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31: 1-6.
91. Otero-Anton, E., Gonzalez-Quintela, A., Lopez-Soto, A., Lopez-Ben, S., Llovo, J., Perez, L.F., Cecal ligation and puncture as amodel of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001;33(2):77-9.
92. Öter, S., Edremitlioğlu, M., Korkmaz, A. Effects of hyperbaric oxygen treatment on liver functions, oxidative status and histology in septic rats. *Intensive Care Med.*, Sep;31(9):1262-8. 2005
93. Öz, H., Sepsis ve Organ Yetersizlikleri: Koagülasyon. Dikmen Y, Demirkıran O (Editörler). *Güncel bilgiler ışığında sepsis* 2006;51:27-9.
94. Özcan, A., Atakişi E, Apotozisin Biyokimyasal Önemi, *Kafkas Üniv.Vet.Fak.der.*2003,9(1):95-100.
95. Özdemir, S. (2001), Sepsis ve Bakteriyemi Hastaları ile Kontrol Grubunda Kan Kültürü, Serum CRP ve PCT Düzeylerinin Karşılaştırması, *Uzmanlık Tezi* (Dokuz Eylül Üniversitesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)
96. Öztürk, E., Demirbilek, S., But, A.K., Antioxidant properties of propofol and erythropoietin after closed head injury in rats. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005; 29: 922-7.
97. Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
98. Parillo, J.E., Pathogenetic Mechanisms of Septic Shock. *N Engl J Med* 1993;328:1471–77.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

99. Park, K.-C., K.-C. Chung, Y.-S. Kim, J. Lee, T. H. Joh, and S.-Y. Kim. 2004. Transglutaminase 2 induces nitric oxide synthesis in BV-2 microglia. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 323: 1055–1062.
100. Peters, K., Unger, R.E., Brunner, J., et al. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular Research* 2003; 60: 49-57.
101. Piacentini, M., A. Amendola, F. Ciccocanti, L. Falasca, M. G. Farrace, P. G. Mastroberardino, R. Nardacci, S. Oliverio, L. Piredda, C. Rodolfo, and F. Autuori. 2005. Type 2 transglutaminase and cell death. *Prog. Exp. Tumor Res.* 38:58–74.
102. Piacentini, M., and L. Fesus. 2002. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 27: 534–539.
103. Rongione, A., Kusske, A., Ashley, S. et al. Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. *J Surg Res* 1997; 70: 107-12.
104. Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med.* 2000 Oct 16;192(8):F21-5.
105. Schultz, J., Corlin, R., Oddi, F., et al. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. *Arch. Biochem Biophys* 1965; 111:73–79.
106. Schulz, R., Nava, E., Moncada, S. Induction and potential biological relevance of a calcium independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105: 575-580.
107. Sener, G., Sehirli, A.Ö., İpçi, Y., Çetinel, S., Cıkler, E., Gedik, N., Chronic nicotine toxicity by aqueous garlic extract. *Plant Foods Hum Nutr* 2005; 60:77-86.
108. Suh, G.Y., Ham, H.S., Lee, S.H., et al. A peptide with antitransglutaminase activity decreases lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice. *Exp Lung Res* 2006;32:43-53.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

109. Sumiyoshi, H., Wargovich, M. J. Chemoprevention of 1,2-dimethyl hydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organo- sulfur compounds. *Cancer Res.* 1990, 50 (16),5084-5087.
110. Şener, G., Toklu, H., Ercan, F., Erkanlı, G. Protective effect of β -glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2005; 5: 1387-1396.
111. Tate, R.M., Repine, J.E., Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:552–59.
112. Temizkan, Güler., Arda, Nazlı., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, Genişletilmiş 2.baskı, s 161-302, 2004.*
113. Tietz, *Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th Ed., Burtis CA, Ashwood ER. Saunders, Philadelphia. 2001. (Türkçe çevirisi: Klinik Kimyada Temel İnkeler) S:354-356*
114. Tulunay, M., Oral, M., Sistemik enflamatuar yanıt sendromu, sepsis, septik şok ve multipl organ disfonksiyonu sendromu, in Cuhruk H (ed), *Anesteziyoloji ve Reanimasyon; AÜTF ANTIP AS, Ankara, 1999.*
115. Ugarte, H., Silva, E., Mercan, D., et al. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27:498–504.
116. Uzun, O., Akalın, H.E., Hayran, M., Unal, S., Faktors influencing prognosis in bacteremia due to gram -negative organisms: evaluation of 448 episodes in a Turkish university hospital.*Clin Infect Dis* 1992;15:886-73.
117. Van der Poll, T., Van Deventer, S.J., Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13: 413-26.
118. Weinstein, M.B., Reller, L.B., Murphy, J.R., Lichtenstein K.A., The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adult. I. Laboratory and epidemiologic observation. *Rev Infect Dis* 1983;5:35

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

119. Welbourn, C.R., Goldman, G., Paterson IS. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of neutrophil. *Br J Surg.* 1991; 78:651–55.
120. White, B., Schmidt, M., Murphy, C., et al: Activated protein C inhibits lipopolysaccharide -induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line, *Br J Haematol* 2000;110(1):13
121. Wongmekiat, O., Thamprasert, K., Investigating the protective effects of aged garlic extract on cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19:555-62.
122. Wu, C.H., Chen, T.L., Chen, T.G., Ho, W.P., Chiu, W.T., Chen, R.M. Nitric oxide modulates proand anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages. *J Trauma* 2003; 55: 540-545.
123. Yamasaki, T., Li, L., Lau, B.H., Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother. Res.* 8:408–412; 1994.
124. Yoshimura, T.H., Yokoyama, S., Fujii, F., Takayama, K., Oikwa & Kamada: In vivo EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolisaccharide-treated mice. *Nature Biotechnology.* 1996; 14: 992-994.
125. Zager, R.A., Burkhart, K.M., Conrad, D.S., Gmur, D.J., Iron, heme oxygenase and glutathione: effects on myohemoglobinuric proximal tubular injury. *Kidney Int* 1995;48:1624-34.
126. Akın B., Settari B., Nilüfer E., Okan H., Gülhan Ö., Ayşe D., Atila K., 1999, Therole of oxygen free radicals in an experimental sepsis model, *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 10, 4, 427-431 p.

ORHAN BAYRAKTAR

Tel: (0392) 37 66 373

orhanbellet@hotmail.com

Adres: Őht. Fehmi Mehmet sok. No:51 Serdarlı/KKTC

Doğum Tarihi : 31.08.1988

Doğum Yeri: Gazimağusa

Uyruğu: KKTC

Medeni Drumu: Bekar

EğİTİM DURUMU :

2009-2013:ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek lisans Programı

2009-2005: ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
Fen Edebiyat Fakóltesi Kimya Bölümü Lisans

2002-2005: LEFKOŐA 20 TEMMUZ FEN LİSESİ

1999-2002: LEFKOŐA RUSO ORTAOKULU

1995-1999: LEFKOŐA ŐEHİT TUNCER İLKOKULU

YABANCI DİL: İNGİLİZCE

BİLİMSEL ETKİNLİKLER:

2-13 Mayıs 2011- **ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası**