

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

**LİPOPOLİSAKKARİT İLE UYARILMIŞ DENEYSEL
SEPSİSTE LİPOKSİJENAZ, ARJİNAZ/NİTRİK OKSİT
YOLAĞI VE İNFLAMATUAR PARAMETRELER
ÜZERİNDE KARVAKROLÜN DOZA BAĞIMLI
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MEHMET KARA

Prof. Dr. SEMA USLU

EKİM-2012

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

**LİPOLİSAKKARİT İLE UYARILMIŞ DENEYSEL
SEPSİSTE LİPOKSİJENAZ, ARJİNAZ/NİTRİK OKSİT
YOLAĞI VE İNFLAMATUAR PARAMETRELER
ÜZERİNDE KARVAKROLÜN DOZA BAĞIMLI
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MEHMET KARA

Prof. Dr. SEMA USLU

EKİM-2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mehmet KARA'nın Doktora Tezi olarak hazırladığı “Lipopolisakkarit ile uyarılmış deneysel sepsiste lipoksijenaz, arjinaz/nitrik oksit yolağı ve inflamatuvar parametreler üzerinde karvakrolün doza bağımlı etkisinin araştırılması” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğı'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

05.10.2012

Üye: Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ

Üye: Prof. Dr. Sema USLU

Üye: Prof. Dr. Ömer ÇOLAK

Üye: Prof. Dr. Güngör KANBAK

Üye: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/10/2012.. tarih ve 332./4334. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. KAZIM ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Giderek yaygınlaşan endotoksin nedenli enfeksiyonlar sepsis gelişiminden dolayı ciddi ölüm oranlarına yol açabilir. Fenolik bir monoterpen olan karvakrol gibi birçok doğal biyoaktif bileşik sepsisin profilaksisinde medikal uygulamaların içinde yer alabilir. Bu çalışmada karvakrolün ön uygulamasının lipoksijenaz (LOX) aktivitesi, arjinaz/nitrik oksit yolağı ve inflamatuvar parametreler üzerindeki etkilerini araştırdık.

Deney hayvanlarına 20, 40 ve 80 mg/kg karvakrol, 6 gün boyunca verildi. Bu sürenin sonunda subletal lipopolisakkarit (1 mg/kg) verilerek sepsis indüklendi. İnokülasyondan 24 saat sonra anestezi altında ratlardan intrakardiyak kan alınarak ratlar öldürüldü. Kan örneklerinde tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), LOX, arjinaz, nitrik oksit (NO), seruloplazmin, malondialdehit (MDA), ALT ve AST düzeyleri çalışıldı. Karaciğer dokusu hematoksin-eozin boyası kullanılarak histolojik incelemesi için formaldehitte fikse edildi.

Sonuç olarak sepsis öncesi karvakrol ön uygulaması TNF- α ve IL-6 düzeylerini önemli düzeyde azalttı. Seruloplazmin oksidaz düzeylerini doza bağımlı olarak artırırken MDA ve NO oluşumu inhibe edildi. Tüm gruplarda LOX ve AST aktivitelerinde önemli bir değişiklik gözlenmedi. Diğer bir hepatik enzim olan ALT ise karvakrol tarafından azaltıldı.

Bu çalışmadan elde edilen deneysel verilere göre karvakrol doza bağı pro-inflamatuvar sitokin üretimini baskılayarak, oksidatif hasar, lipit oksidasyon işlemlerini geriletirerek ve antioksidan aktiviteyi artırarak inflamasyonu durdurucu etki gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Arjinaz, Karvakrol, Lipoksijenaz, Nitrik oksit

SUMMARY

Infections caused by endotoxins are increasingly common and can result in significant mortality rates due to the development of sepsis. Compounds such as carvacrol (CVL), a phenolic monoterpene, may have anti-inflammatory properties, their medicinal application can involve the prophylaxis of sepsis. In this study we have investigated the pretreatment effects of CVL doses on lipoxygenase (LOX) activity, arginase/nitric oxide pathway and inflammatory parameters.

Test animals were treated with CVL at dose 20, 40 and 80 mg/kg for six days. At the end of the administration, sepsis was induced by sublethal dose of lipopolysaccharide (1 mg/kg bw). Rats were killed by cardiac exsanguinations after 24 hours after the inoculation under anesthetic condition. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), LOX, arginase, nitric oxide (NO), ceruloplasmin, malondialdehyde (MDA), ALT and AST levels were analyzed in blood samples. The liver tissue was fixed in formol for histological analysis using Hematoxylin and Eosin stain.

According to the results, pretreatment with CVL before sepsis significantly decreased TNF- α and IL-6 levels and inhibited the development MDA and NO although increased ceruloplasmin levels in a dose dependent manner. No significant changes were observed in LOX and AST activity in all groups where the other hepatic enzyme ALT was reduced by carvacrol.

Results obtained in this study suggests that CVL may inhibit inflammation probably by suppressing the production of pro-inflammatory cytokines and retarding the process of oxidative damage, lipid oxidation and elevate antioxidant activity in a dose dependent manner.

Key Words: Arginase, Carvacrol, Lipoxygenase, Nitric oxide

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
DIŞ KAPAK	i
İÇ KAPAK.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
TABLO DİZİNİ	ix
ŞEKİL DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sepsis	3
2.1.1. Endotoksin ile İndüklenen Sepsis Patogenezi	6
2.2. İnflamatuvar Mediyatörler	14
2.2.1. Sitokinler	15
2.2.2. Araşidonik Asit Metabolitleri (Eikozanoidler).....	24
2.2.3. Arjinaz/Nitrik Oksit Yolağı.....	34
2.2. Karvakrol	41
GEREÇ VE YÖNTEMLER	43
3.1. Gereçler.....	43
3.1.1. Deney Hayvanları	43
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Sarf Malzemeler	43
3.1.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar.....	44
3.2. Yöntemler	45
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	45
3.2.2. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	46
3.2.3. Tümör Nekroz Faktörü – α (TNF- α) Düzeylerinin Ölçümü	49
3.2.4. İnterlökin – 6 (IL-6) Düzeylerinin Ölçümü.....	54
3.2.5. Lipoksijenaz (LOX) Aktivitesinin Ölçümü.....	59

	<u>Sayfa</u>
3.2.6. Alanin aminotransferaz (ALT) ve Aspartat aminotransferaz (AST) Ölçümü	62
3.2.7. Seruloplazmin Oksidaz Aktivitesinin Ölçümü	62
3.2.8. Total Nitrit (NO ₂ ⁻) Miktarı Ölçümü	63
3.2.9. Arjinaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	68
Histolojik İnceleme	71
İstatistiksel Analiz.....	72
BULGULAR.....	73
TARTIŞMA.....	91
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	108
ÖZGEÇMİŞ	124

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. 1991 sepsis konferansında ortaya atılan tanımlar.....	3
Tablo 2. Erişkin hastada sepsis tanısında kullanılan kriterler.....	5
Tablo 3. Nükleer Faktör Kappa B için hedef genlerin kısmi listesi.....	13
Tablo 4. İnflamasyon sürecinde rol oynayan spesifik kimyasal mediyatörler	15
Tablo 5. İnsan sepsisinde düzeyleri artan Sitokinler.....	16
Tablo 6. Eikozanoid Ailesi	24
Tablo 7. LTA ₄ sentezinde rol oynayan enzimlerin hücre içi yerleşimleri.....	28
Tablo 8. Arjinaz izoenzimlerinin karşılaştırılmalı özellikleri.....	37
Tablo 9. Çalışmada ölçümü yapılan parametrelerin ortalama \pm standart sapma değerleri.....	74
Tablo 10. Çalışmada ölçümü yapılan parametrelerin ortanca (%25 - %75) değerleri.....	75

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS), Enfeksiyon ve Sepsis arasındaki karşılıklı ilişki	4
Şekil 2. Gram negatif bakteri LPS endotoksininin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 3. LPS, LBP ve CD14 arasındaki etkileşim.....	8
Şekil 4. (a) TLR4–MD-2–LPS kompleksinin simetrik dimer yapısının üstten görünüşü (b) Kompleksin yandan görünüşü	9
Şekil 5. MyD88-bağımlı ve MyD88-bağımsız TLR4 sinyal yolağı	10
Şekil 6. İnsan Toll-Like Reseptörlerinin (TLRx) sinyalizasyon yolağı	12
Şekil 7. TNF Reseptör -1 aracılı sinyal iletim yolakları.....	18
Şekil 8. IL-6 tersiyer yapısı.....	20
Şekil 9. IL-6 tipi sitokinlerin reseptör kompleksleri	21
Şekil 10. IL-6, IL-6R ve gp130'un yapısal organizasyonu	21
Şekil 11. IL-6 aktivasyonlu JAK/STAT yolağı ve MAPK kaskadı.....	22
Şekil 12. Araşidonik Asitten köken alan Siklooksijenaz (COX), Lipoksijenaz (LOX) ve Sitokrom P450 Epoksijenaz (Monoksijenaz) Ürünleri	25
Şekil 13. <i>cis,cis-1,4-pentadien</i> yapının lipoksijenasyon mekanizması	27
Şekil 14. Lökotrien sentezinde hücre içi yerleşim ve cPLA ₂ ve 5-LOX'un translokasyonu	28
Şekil 15. 5-lipoksijenaz	29
Şekil 16. 5-lipoksijenazın katalitik döngüsü.....	30
Şekil 17. Lökotrien sentezi ve etkileri.....	33
Şekil 18. Memeli hücrelerinde Arjinin metabolizması	35
Şekil 19. Arjinaz ve nitrik oksit sentaz arasındaki etkileşim.....	36
Şekil 20. İndüklenebilir Arjinaz I (Arg1) ve iNOS (NOS2) enzimlerinin sitokin –bağımlı ve metabolik düzenleyici çevrimi	38
Şekil 21. Karvakrolün kimyasal yapısı.....	41
Şekil 22. TBA – MDA bileşiği oluşturan TBA ile MDA arasındaki kimyasal tepkime	47

Şekil 23. Standart [MDA] grafiği.....	49
Şekil 24. Standart TNF-a Grafiği.....	54
Şekil 25. Standart IL-6 Grafiği.....	59
Şekil 26. Griess Reaksiyonu.....	64
Şekil 27. Standart [NO ₂] Grafiği.....	67
Şekil 28. Standart Üre Grafiği.....	70
Şekil 29. MDA düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	76
Şekil 30. TNF- α düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	77
Şekil 31. IL-6 düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	78
Şekil 32. LOX düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	79
Şekil 33. ALT düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	80
Şekil 34. AST düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	81
Şekil 35. Seruloplazmin oksidaz aktivitesinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	82
Şekil 36. NO düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	84
Şekil 37. Arjinaz düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	85
Şekil 38. Sağlıklı kontrol grubu histolojik incelemesi.....	86
Şekil 39. Sham grubu histolojik incelemesi.....	87
Şekil 40. Sepsis grubu (1 mg/kg LPS) histolojik incelemesi.....	88
Şekil 41. Karvakrol grubu I (20 mg/kg CVL+LPS) histolojik incelemesi.....	88
Şekil 42. Karvakrol grubu II (40 mg/kg CVL+LPS) histolojik incelemesi.....	89
Şekil 43. Karvakrol grubu III (80 mg/kg CVL+LPS) histolojik incelemesi.....	90
Şekil 44. Kafeik asit grubu (50 mg/kg CA+ LPS) histolojik incelemesi.....	90

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Araşidonik asit
ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i> , Amerikan Toraks Hekimleri Koleji
aPTT	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
ATS	<i>American Thoracic Society</i> , Amerikan Toraks Derneği
cGMP	Siklik Guanozin monofosfat
COX	Siklooksijenaz
CRP	C-reaktif protein
CVL	Karvakrol
cys-LT	Sisteinil - lökotrien
dH₂O	Distile su
DHET	Dihidroksieikozatrienoik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
EET	Epoksieikozatrienoik asit
EFA	Esansiyel yağ asitleri
ELISA	Enzim Bağlı İmmün Ölçüm
ESICM	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i> , Avrupa Yoğun Bakım Tedavisi Derneği
Fe⁺²	Ferröz demir iyonu
Fe⁺³	Ferrik demir iyonu
FiO₂	İnspiratuar oksijen fraksiyonu
FLAP	5-lipoksijenaz aktive edici protein
Gal	Galaktoz
Glc	Glukoz
GM-CSF	Granülosit-monosit-koloni-stimulan faktör
Hep	L-gliserol-D-manno-heptoz
HETE	Hidroksieikozatetraenoik asit
HPETE	Hidroperoksieikozatetraenoik asit
HRP	<i>Horse – Radish peroksidaz</i>
IFNγ	İnterferon gamma

IκB	İnhibitör subünit kappa B
IL-1	İnterlökin 1
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
INR	İnternasyonel normalize edilmiş oran
IRAKx	IL-1R ilişkili protein kinazlar
ISPF	α-Izonitrosopropiofenon
KAA	Katyonik amino asit
KDO	2-keto-3-deoksioktonik asit
Kİ	Kardiyak indeks
LBP	Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein
LOX	Lipoksijenaz
LPS	Lipopolisakkarit
LT	Lökotrien
LX	Lipoksin
MD-2	Myeloid diferansiyasyon faktör-2
MyD88	Myeloid diferansiyasyon faktörü 88
NAA	Nötral aminoasit
NED	N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NGa	N-asetil-galaktozamin
NGc	N-asetil-glukozamin
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
OAB	Ortalama arter basıncı
PaCO₂	Parsiyel arteryel karbondioksit basıncı,
PAF	Trombositleri aktive eden faktör
PaO₂	Parsiyel arteryel oksijen basıncı
PG	Prostaglandin
PLA₂	Fosfolipaz A 2
ROS	Reaktif oksijen türleri
SIRS	Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu

SKB	Sistolik kan basıncı
SSCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i> , Yoğun Bakım Tıbbı Derneği
SvO₂	Mikst venöz oksijen saturasyonu
TAK1	Transforme edici büyüme faktörü- β aktive kinaz 1
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
TMB	Tetrametil benzin
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TRAF6	Tümör nekroz faktör ilişkili faktör 6
TRIF	Toll-like reseptör domain adaptör indüklü interferon – β
TSST	<i>S. aureus</i> 'un toksik şok sendromu toksinleri
TX	Tromboksan
α	Alfa
β	Beta
ζ	Zeta
κ	Kappa
ω	Omega

GİRİŞ VE AMAÇ

Enfeksiyona verilen sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanan sepsis, özellikle son yıllarda patofizyolojisi daha iyi anlaşılmış olmasına, antimikrobiyal tedavideki ilerlemelere, diyagnostik yöntem ve teknolojideki gelişmelere rağmen özellikle şok ve multiorgan sistem yetersizliği tablosu ile birlikte yüksek mortaliteye sahiptir (22).

Sepsiste, enfeksiyon etkeninin erken tanınması, doğru ve zamanında antimikrobiyal tedavi hayati önem taşır. Fakat birçok destek tedavi uygulanmasına karşın, mortalite oranını azaltacak koruyucu girişimlerin azlığına bağlı olarak sepsiste önemli bir basamak olan inflamasyonun etkisini minimum düzeyde tutmak klinik tabloyu önemli derecede etkiler (192).

Mikroorganizmaların tedavide kullanılan antibiyotiklere zamanla direnç kazanması tedaviyi güçleştirmekte ve uzamasına sebep olmaktadır. Tedavide başarı oranının artırılması amacıyla yeni ilaç ve kimyasalların araştırılması son yıllarda bitkisel kaynaklı maddelere daha fazla ilgi uyandırmıştır.

Hücrel savunma mekanizmaları spesifik ve non-spesifik hücrel immün yanıtı içerir. Patojenlerin invazyonunu takiben hücrel immün yanıt ikincil savunma hattını oluşturur, burada granülositler, makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri görev alır. Bu efektör hücreler arasındaki karmaşık etkileşimler sitokinler ve diğer mediyatörlerin salınımı ile düzenlenir. Canlının diyetindeki birçok madde ya mediyatör oluşumunu modifiye ederek ya da sinyal transdüksiyonu ile etkileşimde bulunarak hücrel ve humoral immünitede modülasyon yapabilir.

Bitkisel kaynaklı esansiyel uçucu yağlardan, karvakrol (CVL) fenolik bir monoterpen olup başta kekik bitkisinde olmak üzere birçok bitki de bulunur. Kekik suyu anti-ülser, sindirime yardımcı, anti-diyabetik olarak gastrointestinal sistemin düzenlenmesi amacıyla yaygın bir şekilde tüketilmektedir (19).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada karvakrolün anti-mikrobiyal, anti-tümör, anti-mutajenik, anti-genotoksik ve anti-kolinesteraz gibi çok sayıda aktivitelere sahip

olduğu gösterilmiştir (66). Fakat çalışmaların büyük bir bölümü *in vitro* hücre kültürü ortamında yapılmış, *in vivo* veriler azdır.

Sepsisteki patofizyolojik süreç ve bu sürecin önemli bir basamağı olan inflamasyonun önemi, karvakrolün sahip olduğu birçok biyolojik özelliği ile birlikte göz önünde bulundurarak, inflamasyon sürecinde mediyatörler üzerinde karvakrolün doza bağlı etkilerini incelemeyi hedefledik. Bu çalışmada, *in vivo* doza bağlı karvakrol kullanımının lipoksijenaz enzim aktivitesi, arjinaz/nitrik oksit dengesi ve anti-oksidan durum üzerindeki etkileri araştırıldı. Mevcut literatür taramaları yapıldığında *in vivo* koşullar altında karvakrol – lipoksijenaz ve karvakrol – arjinaz çalışmaları bulunamamış olup, bu çalışmanın *in vivo* alışma olarak önemli basamak teşkil edeceğini düşünmekteyiz.

GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

Sepsis hemodinamik değişikliklerle seyreden, acil tedavi edilmesi gereken mortalitesi yüksek klinik bir tablodur. Yoğun bakım ünitelerinde en önemli ölüm nedenidir (29, 192).

Günümüzde sepsis sendromunun konakçının enfeksiyon etkenine karşı geliştirdiği bir grup yanıtlar dizisi olduğu anlaşılmıştır (Şekil 1). Ancak, birçok terimin birbirinin yerine kullanılması karışıklığa yol açtığından *American College of Chest Physicians* (ACCP) ve *Society of Critical Care Medicine* (SSCM) adlı derneklerin 1991'de yaptıkları toplantıda ortak görüş birliğine varılarak bazı tanımlamalar yapılmıştır (119). Bu tanımlamalar daha sonra 2001 yılında yapılan toplantıda *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), *American Thoracic Society* (ATS) ve *Surgical Infection Society* (SIS) derneklerinin de katkısıyla yenilenmiştir (110). Bu şekilde sepsis tablosu içindeki bu tanımlamalar Tablo 1'de tarif edilmiştir:

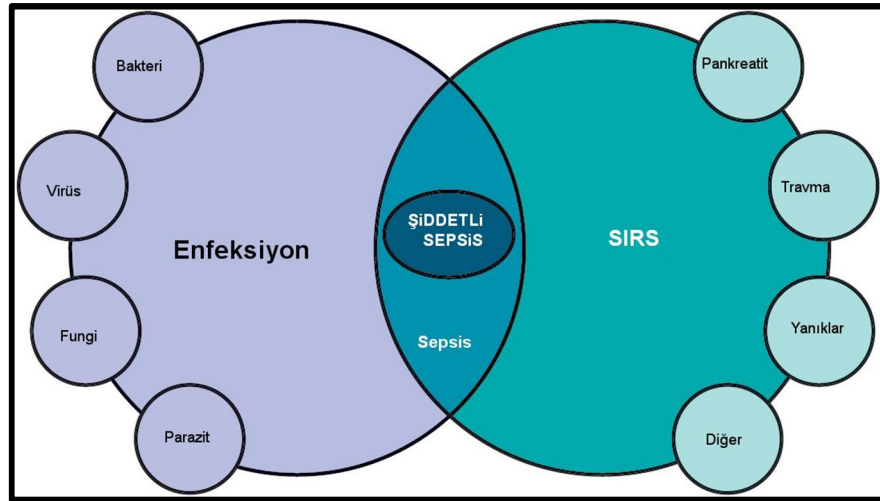
Tablo 1. 1991 sepsis konferansında ortaya atılan tanımlar (11)

Enfeksiyon	Mikroorganizmalara bağlı gelişen inflamatuvar yanıt veya steril dokuların bu mikroorganizmalar tarafından invazyonu
Bakteremi	Kanda bakteri bulunması
SIRS	Birçok ciddi klinik soruna bağlı gelişen sistemik inflamatuvar yanıt: Aşağıdaki belirti ve bulgulardan en az ikisinin bulunması: 1. <i>Vücut ısısı</i> > 38°C veya < 36°C 2. <i>Kalp hızı</i> > 90/dakika 3. <i>Solunum sayısı</i> > 20/dakika veya <i>PaCO₂</i> < 32 mmHg 4. <i>Beyaz küre sayısı</i> > 12.000/mm ³ , < 4000/mm ³ veya <i>formülde</i> > %10 <i>çomak formunun olması</i>
Sepsis	Sepsise bağlı sistemik inflamatuvar yanıt (enfeksiyon yanında SIRS varlığı)
Ağır sepsis	Organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonun eşlik ettiği sepsis. Laktik asidoz, oligüri veya akut bilinç değişiklikleri hipoperfüzyon bulgularının bir kısmını oluşturur

Tablo 1. 1991 sepsis konferansında ortaya atılan tanımlar (11) (devamı)

Septik şok	Sepsise bağlı organ hipoperfüzyon bulguları yanında yeterli sıvı tedavisine rağmen gelişen hipotansiyon. Vazopresör veya inotropik ajan desteği ile normotansif olan hastalar da bu gruba dahildir
Sepsise bağlı hipotansiyon	Diğer hipotansiyon nedenlerine bağlı olmayan sepsise bağlı sistolik kan basıncının < 90 mmHg veya önceki değerinde \geq 40 mmHg düşüş olması
Çoklu organ disfonksiyonu	Hemostazın müdahale edilmeden sağlanamadığı akut olarak gelişen organ sendromu fonksiyon bozukluğu

SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, PaCO₂: Parsiyel arteryel karbondioksit basıncı



Şekil 1. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS), Enfeksiyon ve Sepsis arasındaki karşılıklı ilişki (44)

Vücut ısısı, kalp hızı, solunum sayısı ve beyaz küre sayısına dayalı sistemik inflamatuvar yanıt sendromu kriterlerinin özgüllüğünün düşük olması nedeniyle 2001 yılında Uluslararası Sepsis Tanısı Konferansı'nda sepsise işaret edebilecek bulgu ve semptomların listesi genişletilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Erişkin hastada sepsis tanısında kullanılan kriterler (11).

Kanıtlanmış veya kuvvetle şüphelenilen enfeksiyon varlığı:

• *Genel belirleyiciler*

1. Ateş ($> 38,3^{\circ}\text{C}$)
2. Hipotermi ($< 36^{\circ}\text{C}$)
3. Kalp hızı $> 90/\text{dakika}$
4. Takipne veya respiratuar alkaloz (solunum sayısı $> 20/\text{dakika}$ veya $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$)
5. Bilinç bulanıklığı
6. Ciddi ödem ya da pozitif sıvı dengesi ($> 20 \text{ mL/kg/24 saat}$)
7. Hiperglisemi (diabetes mellitus yokken plazma glukozunun $> 120 \text{ mg/dL}$ olması)

• *İnflamasyon belirleyicileri*

1. Lökositoz ($> 12.000/\text{mm}^3$)
2. Lökopeni ($< 4000/\text{mm}^3$)
3. Beyaz küre sayımı normal iken formülde $> \%10$ çomak formunun olması
4. Plazma CRP düzeyinin normal değer 2 standart sapma üstünde olması
5. Plazma prokalsitonin düzeyinin normal değer 2 standart sapma üzerinde olması

• *Hemodinamik belirleyiciler*

1. Hipotansiyon (SKB $< 90 \text{ mmHg}$, OAB $< 70 \text{ mmHg}$ veya SKB'de $> 40 \text{ mmHg}$ düşme)
2. $\text{SvO}_2 > \%70$
3. $\text{Kİ} > 3.5 \text{ L/dakika/m}^2$

• *Organ disfonksiyonu belirleyicileri*

1. Arteriyel hipoksemi ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$)
2. Akut oligüri (idrar çıkışı $< 0.5 \text{ mL/kg/saat}$)
3. Kreatininde $> 0.5 \text{ mg/dL}$ artış
4. Koagülasyon bozuklukları (INR > 1.5 veya aPTT > 60 saniye)
5. İleus (bağırsak seslerinin olmaması)
6. Trombositopeni ($< 100.000/\text{mm}^3$)
7. Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin $> 4 \text{ mg/dL}$)

• *Doku perfüzyon belirleyicileri*

1. Hiperlaktatemi ($> 1 \text{ mmol/L}$)
2. Azalmış kapiller dolum ya da beneklenme

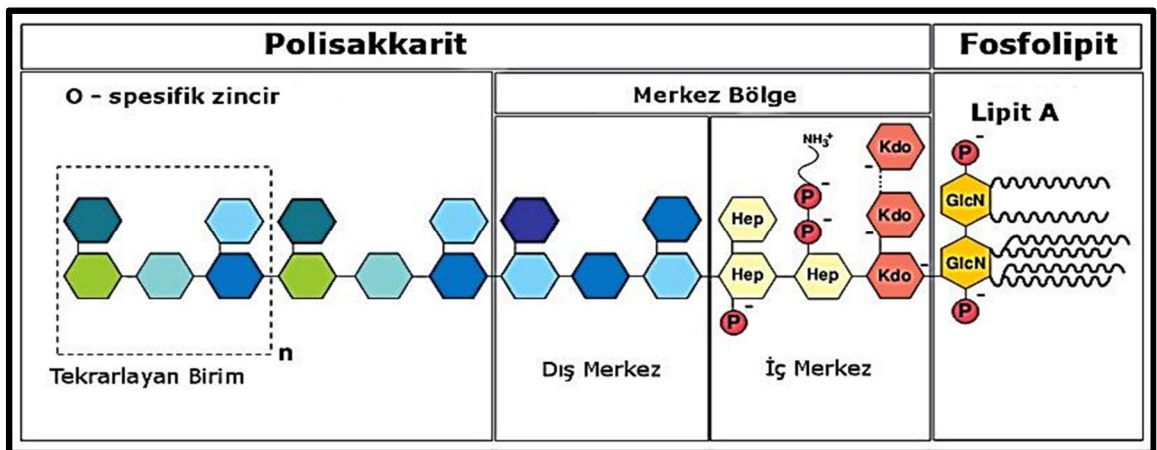
PaCO_2 : Parsiyel arteriyel karbondioksit basıncı, CRP: C-reaktif protein, SKB: Sistolik kan basıncı, OAB: Ortalama arter basıncı, SvO_2 : Mikst venöz oksijen saturasyonu, Kİ: Kardiyak indeks, PaO_2 : Parsiyel arteriyel oksijen basıncı, FiO_2 : İnspiratuar oksijen fraksiyonu, INR: İnternasyonal normalize edilmiş oran, aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı

2.1.1. Endotoksin ile İndüklenen Sepsis Patogenezi

Sepsis sistemik inflamasyon, koagülasyon ve bozulmuş fibrinoliz şeklinde ilerleyen bir tablodur. Sepsis fizyopatolojisinde, patojenler ve inflamatuvar yanıt yer almaktadır. Yapılan araştırmalarda dokularda oluşan enfeksiyon ve travmatik hasar sonucu vücutta humoral sistemin aktive olduğu ve çeşitli sitokinlerin salındığı gösterilmiştir (22, 37, 77).

Sepsisin gelişmesi için mikroorganizmanın kendisinin konakçıyı enfekte etmesi gerekli değildir. Patojene ait sinyal ürünleri ve toksinlerin lokal veya sistemik yayılması da sepsisi başlatabilir. Sepsis en sık Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere ikincil olarak gelişir. Daha az sıklıkla virüsler, mantarlar ve protozoalara ikincil olarak da gelişir. Gram pozitif bakterilerin tedavisindeki etkinlik Gram negatif bakterileri sepsiste ön sıraya almaktadır. Gram negatif bakterilerin daha sık etken olmaları nedeniyle sepsis patogenezi ile ilgili çalışmalar Gram negatif sepsise yoğunlaşmıştır.

Endotoksinler, Gram negatif bakterilerde hücre duvarında yer alan, etkinliği iyi bilinen lipopolisakkarit (LPS) yapıdaki oluşumlardır. Lipopolisakkarit bakteri dış membranı içine yerleşmiştir. LPS'nin lipit A kısmı bakteri duvarına tutunmayı sağlamakta olup, bütün Gram negatif bakterilerde ortaktır.



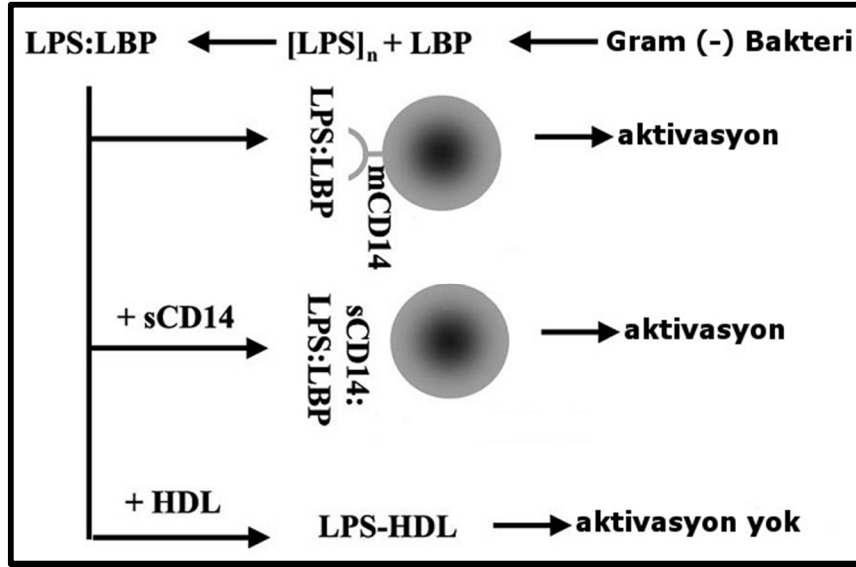
Şekil 2. Gram negatif bakteri LPS endotoksinin kimyasal yapısı (9, 114).

(Hep) L-gliserol-D-manno-heptoz; (Gal) galaktoz; (Glc) glukoz; (KDO) 2-keto-3-deoksioktonik asit; (NGa) N-asetil-galaktozamin; (NGc) N-asetil-glukozamin.

Lipopolisakkaritler, ağırlıklı olarak lipofilik *lipit A* bölgesi ile kovalent bağlı hidrofilik poli- ve oligosakkarit kısımdan oluşan oldukça ısıya dayanıklı amfifilik moleküllerdir (Şekil 2) (9). Lipopolisakkarit yapısındaki endotoksinin lipit A bölümü toksisiteden sorumludur. Ayrıca Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısal komponentleri (peptidoglikan ve teikoik asitler), kapsül antijenleri ve ekzotoksinler (*Staphylococcus aureus*'un toksik şok sendromu toksinleri (TSST), *Streptococcus pyogenes*'in pirojenik toksinleri, *Pseudomonas aeruginosa*'nın ekzotoksin A'sı), mantarların hücre duvarı antijenleri, viral veya paraziter antijenler inflamasyona neden olabilir (22). Bu antijenik yapılar dolaşımdaki mononükleer fagositik hücreleri CD14 reseptörüne bağlanarak uyarırlar. Monositlerden tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin 1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve trombositleri aktive eden faktör (PAF) salınır. IL-1 ve IL-6 T hücrelerini aktive ederek γ -interferon (IFN- γ), IL-2, IL-4, granülosit-monosit-koloni-stimulan faktörlerin (GM-CSF) salgılanmasını sağlar. Bu sitokinler sistemik olayların devamını kontrol altına almak için lokal enfeksiyonun ortadan kaldırılmasında çok yararlı olurken, şiddetli sepsiste aşırı üretilen mediyatörler ve pıhtılaşma faktörleri küçük damarların endotelinin harabiyetine yol açabilir ve bu durum Gram negatif sepsisini hızlandırır (149). Endotelin zedelenmesi hemodinamik değişiklikler ve organ yetersizliği ile sonuçlanır. TNF lökosit yüzeyindeki adezyon moleküllerini aktive ederek nötrofillerin endotel hücrelerine yapışmasına neden olur. Aktive olmuş nötrofillerin degranülasyonu sonucu açığa çıkan proteazlar ve toksik oksijen radikalleri endotel hücrelerinin zedelenmesini kolaylaştırır (97).

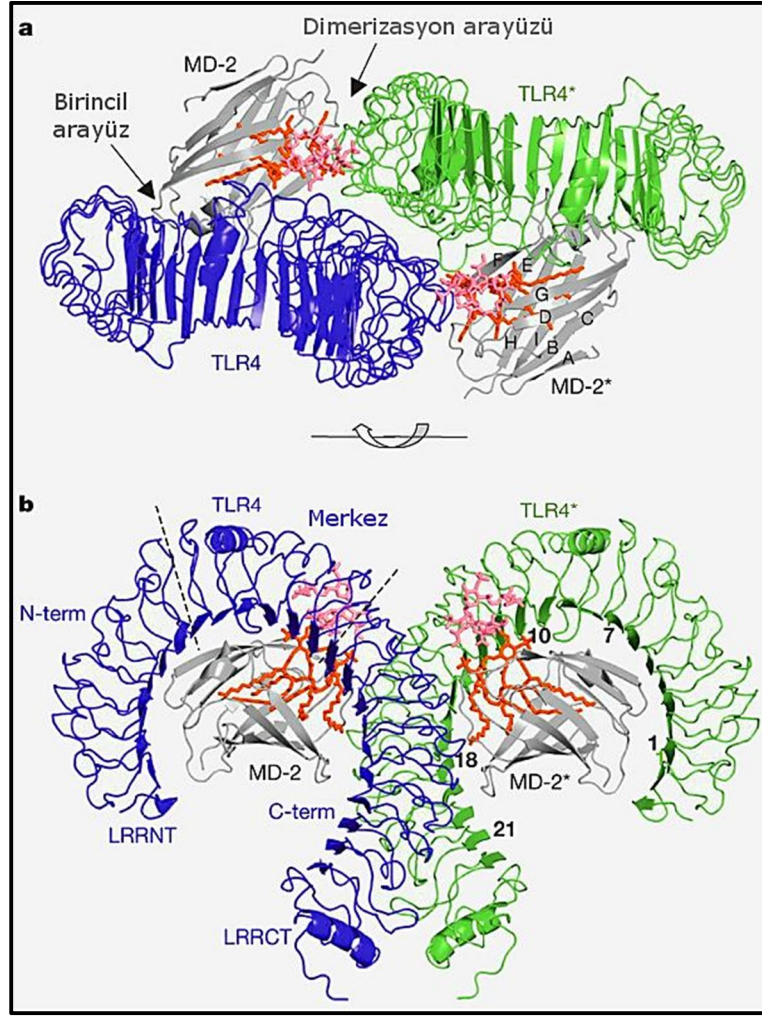
Hayvan hücreleri ile lipit A'nın etkileşimini başlatan olayların birçoğu son on yıl içerisinde aydınlatılmıştır. Plazmada bulunan özel bir lipit transfer proteini lipit A molekülünü bakteriden opsonik bir reseptör olan CD14'e aktarır (149). Lipopolisakkaritin amfifilik yapısından dolayı Gram negatif bakteriden agregatlar şeklinde serbestleşir. Bu agregatlardan CD14'e LPS monomerlerinin spontan difüzyonu çok yavaş gerçekleşir. Lipopolisakkaritin monomerler şeklinde transferi Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein (LBP) olarak adlandırılan, başlıca hepatositler tarafından aynı zamanda da epitel ve kas hücrelerinden de sentezlenen 58 – 60 kDa'luk bir akut faz plazma proteini tarafından gerçekleştirilir (76, 90). Lipopolisakkarit bağlayıcı protein agregat halindeki endotoksinleri monomerler halinde ya membranöz

CD14 (mCD14) ya da soluble CD14 (sCD14) veya lipoproteinlere -özellikle HDL'ye- aktarır. Bu süreç CD14 üzerinden hücre aktivasyonu veya HDL üzerinden LPS'nin nötralize olmasıyla sonuçlanır. Bundan dolayı her iki süreç arasındaki denge konağın LPS'ye vereceği cevabın belirlenmesinde önemli rol oynar (Şekil 3) (76).



Şekil 3. LPS, LBP ve CD14 arasındaki etkileşim (76)

CD14, öncelikli olarak myeloid hücrelerin yüzeyinde bulunan glikozile fosfatidilinositol- bağlı (GPI) bir proteindir. Transmembran ve intraselüler domaini yoktur bundan dolayı LPS sinyalinin hücreleri aktive etmek için membranel alandan sitoplazmik alana iletemez. Membrana bağlı CD14 ile kenetlendikten sonra LPS-LBP kompleksi, MD-2 (myeloid diferansiyasyon faktör-2) olarak adlandırılan ekstrasellüler bir adaptör proteine aktarılır (8, 21). MD-2'nin hidrofobik cebine bağlanan LPS'nin moleküler planı Park ve arkadaşları tarafından yapılan LPS – MD-2 ve TLR4 (Toll benzeri reseptör 4 [Toll Like Receptor 4])'ün atomik yerleşimleri ve kristalizasyon çalışmalarıyla bugün daha kesin bir şekilde bilinmektedir (Şekil 4) (139).



Şekil 4. (a) TLR4–MD-2–LPS kompleksinin simetrik dimer yapısının üstten görünüşü (139)

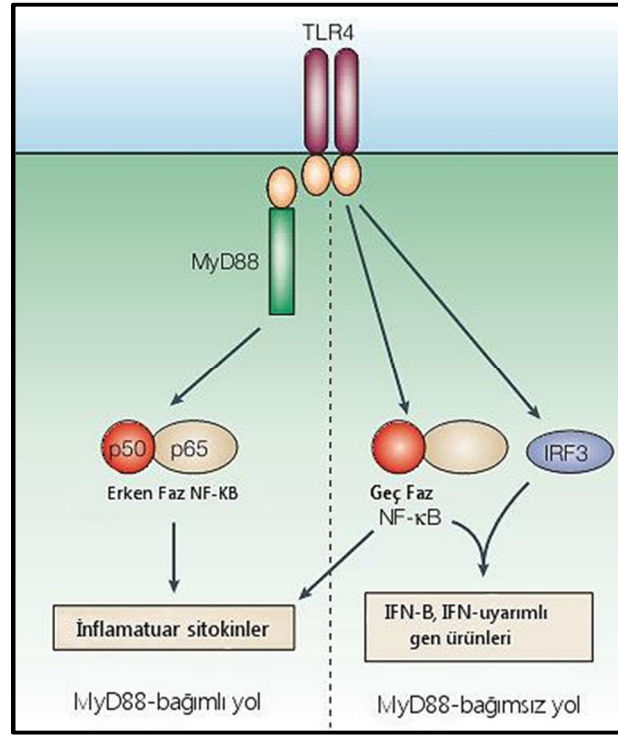
Birincil arayüz LPS bağlanmadan önce TLR-4 ve MD2 arasında şekillenir. LPS'nin bağlanması dimerizasyon arayüzünü oluşturur. (b) Kompleksin yandan görünüşü. LPS'nin Lipit A bileşeni kırmızı renkle, iç kısımdaki karbonhidratlar pembe renkle gösterilmiştir. Lözün – zengin tekrarların (LRR) TLR4'teki modül sayıları ve MD-2'nin β kırmalı tabakadaki isimleri siyah renkle yazılmıştır. TLR4, N – terminal, merkez ve C – terminal kısımlarına bölünmüştür. LRRNT ve LRRCT modülleri LRR modüllerinin amino ve karboksi uç bölgelerini içerir

Altı açıl grubu taşıyan, 12 – 14 karbonlu yağ asitleri bağlı lipit A molekülü MD2 proteinine sıkı bir şekilde bağlanırken LPS'nin yapısında daha uzun zincirli yağ asitleri (C16-C18) veya daha kısa zincirli yağ asitleri (C8-C10) varlığında MD2'ye uygun şekilde bağlanamaz ve MD2-TLR4 kompleksini aktive etmede çok zayıf kalır (132).

LPS:LBP-MD2 kompleksi TLR4'ün ekstrasellüler kısmına bir kere bağlandığında, iki dimerik LPS:LBP-MD2-TLR4 kompleksi, iki TLR4 molekülünün

hücre içi ve transmembran kısımlarını birbirlerine daha yakın hale getirmek için bir araya gelerek birleşir (daha çok hücre yüzeyi boyunca lipit agregatları şeklinde). Bu olaylar zinciri, hücre içi sinyal trafiğini başlatıcı TLR4'ün TIR adaptör domaininin devreye girmesini sağlar.

TLR4 ligantı ile bağlandığında, hücresel aktivasyon için iki olası mekanizma devreye girer. Bu mekanizmalar ya MyD88 (myeloid diferansiyasyon faktörü 88) yoluyla ya da TRIF (Toll-like reseptör domain adaptör indüklü interferon - β) yoluyla üzerinden ilerler (Şekil 5) (21, 173).



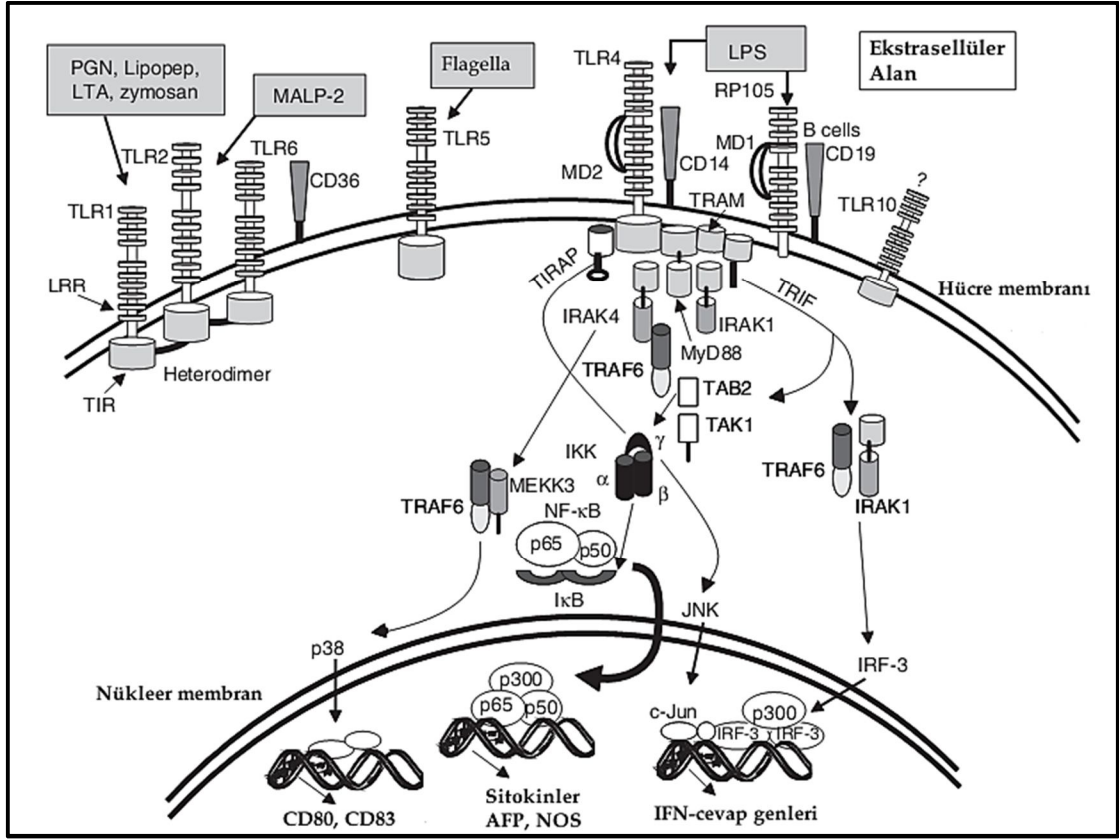
Şekil 5. MyD88-bağımlı ve MyD88-bağımsız TLR4 sinyal yolağı (7)

Myeloid diferansiyasyon faktör 88 bağımlı yolda TLR4'ün hücre yüzeyinde LPS tanınmasında rol oynayan adaptör proteinler olduğu gibi sitoplazmik bölgede de sinyal üretimi için birtakım adaptör moleküllere ihtiyaç vardır. Bu sinyal kaskadı içinde yer alan adaptörler MyD88, IL-1R ilişkili protein kinazlar (IRAKx), TGF- β aktive kinaz 1 (TAK1), TAK1 bağlayan protein 1 ve 2 (TAB1 ve TAB2) ve tümör nekroz faktörü ilişkili faktör 6 (TRAF6)'dır (181). MyD88 TLR3 hariç diğer tüm TLR'ler ile birliktelik halindedir ve IL-6 ve IL-12p40 içeren inflamatuvar sitokinlerin uyarılması için

gereklidir. MyD88'in C – terminal bölgesi TLR ile bağlantıda rol oynayan TIR domainine sahip iken N – terminal bölgesi IRAK-4 başta olmak üzere diğer IRAK kinazlar için aktivasyon bölgesi taşır. Bununla birlikte TRAF6, I κ B kinazlar (IKK α ve IKK β) üzerinden TAK1 aktivasyonu sağlar. MyD88 geni olmayan farelerde TNF α , IL-6, IL-12p40 gibi sitokinlerin üretimi ve TLR ligantlarına verilecek hücrel cevaplarda defektler söz konusudur (7). Bu nedenle MyD88 TLR ailesi üyelerinin aracılık ettiği sitokin salınımında esansiyeldir.

TLR4 sinyal iletiminde MyD88 bağımlı olmayan yolda ise LPS kökenli dendritik hücrelerin olgunlaşması ve IFN uyarımlı gen ekspresyonu gerçekleşir. Bu yolağın en belirgin adaptör molekülü olan TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) TLR3 ile doğrudan birliktelik gösterirken TLR4 için TICAM-2 olarak adlandırılan (TIR-domain-containing molecule 2) molekül gereklidir. TRIF bağımlı bu yolak IKK ϵ – TBK1 – IRF3 adaptör proteinleri üzerinden ya da TRAF6 aracılığıyla NF- κ B aktivasyonuna yol açar (Şekil 6) (7).

Bu yollarda gerçekleşen sinyalizasyon olayları spesifik tirozin ve treonin/serin kinazların sekansiyel aktivasyonlarıyla meydana gelir. Bu sinyal kaskadı en sonunda diğer transkripsiyonel aktivatörler ile birlikte inhibitör κ B'nin (I κ B) yıkılması, ubiquitinlenmesi ve fosforillenmesine neden olur. I κ B'nin yıkılması nükleer faktör κ B'nin (NF- κ B) çekirdek membranına bağlanma bölgesini serbestleştirir ve çekirdek içine geçişini kolaylaştırır. Pıhtılaşma faktörleri, kompleman ve diğer akut faz proteinleri, sitokinler, kemokinler ve nitrik oksit sentaz genleri promotor bölgelerinde NF- κ B bağlanma bölgesi taşırlar. LPS maruziyetinden sonra inflamatuvar sitokinler ve diğer inflamatuvar mediyatörlerin açığa çıkması genel anlamda inflamasyon, prokoagulan aktivite, doku hasarı ve septik şoka zemin hazırlar (42, 150).



Şekil 6. İnsan Toll-Like Reseptörlerinin (TLRx) sinyalizasyon yolağı. TLR4'ün sinyalizasyon kaskadı gösterilmiştir (42)

AFP = akut faz proteinleri; **IkB** = inhibitör subünit κ B; **IFN** = interferon; **IKK** = I κ B kinaz; **IRAK** = interlökin-1 reseptör-ilişkili kinaz; **IRF-3** = IFN regülatör faktör; **JNK** = Janus N-terminal-bağılı kinaz; **lipopep** = bakteriyel (tri-açill) lipopeptid **LPS** = lipopolisakkarit; **LRR** = lözin-zengin tekrar; **LTA** = lipoteikoik asit; **MALP2** = (di-açil)-makrofaj aktive edici lipopeptit-2; **MEKK** = mitojen-aktive protein kinaz kinaz; **MyD88** = myeloid farklılaşma faktörü; **NF- κ B** = nükleer faktör- κ B; **NOS** = nitrik oksit sentaz; **PGN** = peptidoglikan **TAB2** =TAK bağlayan protein 1 ve 2; **TAK1** = transforming growth faktör-ilişkili kinaz 1; **TIR** = Toll/interlökin reseptör; **TIRAP** = TIR adaptör protein; **TRAF6** = tümör nekroz faktörü reseptör-ilişkili faktör 6; **TRAM** = TRIF-bağımlı adaptör molekül; **TRIF** = TIR-domain adaptör uyarımlı IFN β .

Nükleer Faktör Kappa β (NF- κ β) immün cevabın düzenlenmesinde, inflamatuvar mediyatörlerin genlerinin ifadenmesinde gerekli redoks – duyarlı transkripsiyon faktörüdür (93). Bilinen NF- κ β aktivite uyarıcıları reaktif oksijen türleri (ROS), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) (55), İnterlökin 1-beta (IL-1 β), bakteriyel lipopolisakkaritler (146), isoproterenol (174), kokain (71), hipoksi (31) ve iyonize radyasyondur (183). NF- κ β doğal ve kazanılmış immüniteden sorumlu genlerin

düzenlenmesinde merkezi bir noktada olup promotörlerinde NF- κ B bağlanma bölgesi taşıyan genlerin bazılarının ifadenmesini sağlar (3).

Tablo 3. Nükleer Faktör Kappa B için hedef genlerin kısmi listesi (3)

Sınıf	Hedef Gen
İmmünoresseptörler	İmmüoglobulin κ - hafif zincir İnterlökin 2 reseptör α zinciri Büyük Doku Uygunluk Kompleksi Sınıf I (MHC I) Trombosit - Aktive Edici Faktör Reseptör Doku Faktörü
Hücre Adezyon Molekülleri	Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü 1 (ELAM1) Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1 (VCAM1) İnterselüler Hücre Adezyon Molekülü 1 (ICAM1)
Sitokinler ve Büyüme Faktörleri	Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α) İnterlökin 1 β (IL-1 β) İnterlökin 2 (IL-2) İnterlökin 6 (IL-6) İnterlökin 8 (IL-8) İnterlökin 12 (IL-12) Granülosit Koloni Stimulan Faktör (G-CSF)
Kemokinler	Makrofaj İnflamatuar Protein 1 α (MIP-1 α) Makrofaj İnflamatuar Protein 1 (MIP-2)
Akut - Faz Proteinleri	C - Reaktif Protein (CRP) Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein (LBP)
Transkripsiyon Faktörleri ve Sub-ünitleri	I κ B- α NF- κ B prekürsör p105 NF- κ B prekürsör p100
Diğer	Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Siklooksijenaz 2 (COX-2) Fosfolipaz A ₂

2.2. İnflamatuar Mediyatörler

İnflamatuar doku yanıtı oluşmasında rol oynayan mediyatörlerden ilk keşfedilen histamin olmakla birlikte sayıları giderek artmaktadır. Sepsisli hastalarda 1986 yılından bu zamana kadar çok çeşitli inflamatuvar sitokinler tespit edilmiştir (Tablo 4). Mediyatörler hasarlı dokudan, hücrelerden veya plazmadan köken alan çeşitli kimyasal maddelerdir. Genel özellikleri:

- Plazma kaynaklı mediyatörler (komplemanlar) biyolojik aktivasyon için çeşitli proteolitik değişiklikler geçirirler. Hücre kaynaklı olan mediyatörler uyarıcı olmadığı durumlarda intrasellüler granüllerde (histamin mast hücrelerinde) depolanırlar; ihtiyaç olduğunda salgılanır veya bir uyarıcıya karşı yeniden sentez edilirler (örneğin: prostaglandinler).
- Aktivasyon ve salınım bu mediyatörlerin çoğunun metabolik değişime uğramasına (araşidonik asit metabolitleri) veya enzimatik inaktivasyonuna neden olur (kininaz bradikininini inaktive eder).
- Mediyatörlerin büyük bir çoğunluğu ilgili hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak hedef hücrede ikincil mediyatör çıkışı uyarabilir. Bu ikincil mediyatörler hücreyi uyarıcı mediyatörlere benzeyebilir veya aynı olabilir. Bununla birlikte karşıt aktivite de gösterebilirler (106).

Sepsiste ortaya çıkan aşırı inflamatuvar cevap, karşıt etki gösteren molekül, mediyatör ve sitokinlerle dengelenmeye, düzenlenmeye çalışılır. Bu olaylar zinciri içerisinde yer alan mediyatörleri aşağıdaki başlıklar altında sınıflandırmak mümkündür.

Tablo 4. İnflamasyon sürecinde rol oynayan spesifik kimyasal mediyatörler (106 no.lu referanstan *modifiye edilmiştir*)

Kimyasal Mediyatörler		
<i>Vazoaktif aminler</i>	Histamin, Serotonin	
<i>Plazma Proteazları</i>	<i>Kininler</i>	Bradikinin, Kallikrein
	<i>Kompleman Sistem</i>	C3a, C5a, C5b-9
	<i>Koagülasyon - Fibrinolitik Sistem</i>	Fibrinopeptitler ve fibrin yıkım ürünleri
<i>Araşidonik Asit Metabolitleri</i>	<i>Siklooksijenaz Yolu</i>	Prostaglandinler, Tromboksanlar, Endoperositler
	<i>Lipoksijenaz Yolu</i>	Lökotrienler, Hidroperoksieikozatetraenoik asit (HPETE), Hidroksieikozatetraenoik asit (HETE)
<i>Lökosit Ürünleri</i>	Lizozomal proteazlar, Serbest Oksijen Radikalleri	
<i>Trombosit Aktive Edici Faktör (PAF)</i>		
<i>Sitokinler</i>		
<i>Büyüme Faktörleri</i>	Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF),	
<i>Diğer Mediyatörler</i>	Arjinin/Arjinaz/Nitrik oksit, P maddesi, Kalpainler, Hem oksijenaz-1	

2.2.1. Sitokinler

Sitokinler primer olarak immün sistem hücreleri tarafından sentezlenen küçük (8-26 kDa), oldukça aktif moleküllerdir. Pro-inflamatuar sitokinlerin dolaşımdaki düzeyleri sağlıklı bireylerde düşük veya tespit edilemeyecek düzeydedir fakat patojenik mikroorganizmalar tarafından konağın enfekte olması salınımlarını uyarır (129). Bakteriyel ligantların TLR'ler üzerinden başlattığı sinyal kaskadı NF-κB aktivasyonuna

ardından TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IL-8 gibi önemli bazı pro – inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonuna neden olur (170).

Tablo 5. İnsan sepsisinde düzeyleri artan sitokinler

Tümör Nekroz faktörü (TNF)	Monosit kemoattractan protein-1 ve -2 (MCP-1& -2)
İnterlökin-1 (IL-1)	Transforming Büyüme Faktör-b (TGF- β)
İnterlökin-6 (IL-6)	Lenfotoksin- α (Lt- α)
İnterlökin-8 (IL-8)	İnterlökin-12 (IL-12)
Lösemi inhibitör Faktör (LIF)	Makrofaj inflamatuvar protein-1 α & 1 β (MIP-1 α &1 β)
İnterlökin-10 (IL-10)	İnterlökin-18 (IL-18)
İnterlökin-1 reseptör agonist (IL-1ra)	

Sitokinlerin sekresyonu, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel incinmeler ve çeşitli inflamatuvar olaylarla uyarılabilirler ve inflamasyonda en önemlileri interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktörü-alfa'dır (TNF- α). Özellikle IL-1 ve TNF- α birçok ortak biyolojik özellikleri paylaşır. Her ikisi de aktive makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulur ve pro-inflamatuvar sitokinler olarak adlandırılırlar (106).

Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF- α)

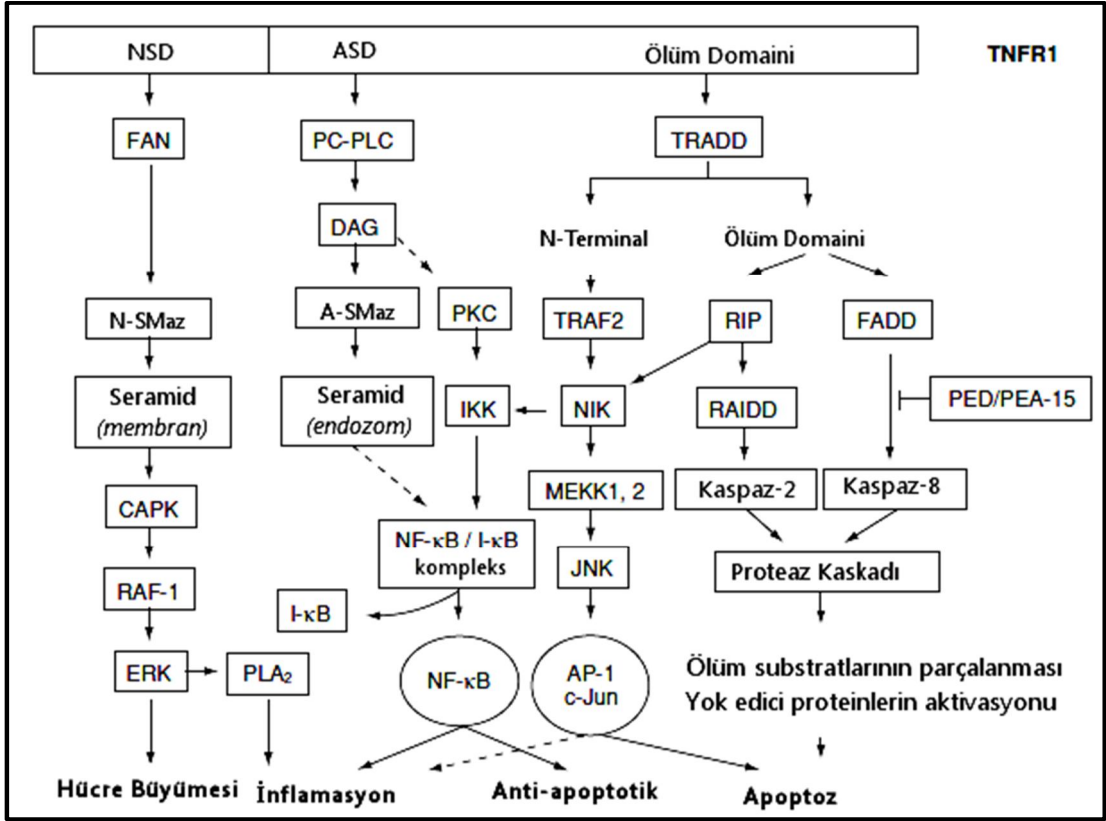
Bakteriyel lipopolisakkarit uyarımını takiben monosit, makrofaj, doğal öldürücü (NK - Natural Killers) hücreleri, nötrofiller ve T – hücreleri tarafından salgılanır. Çok geniş biyolojik fonksiyonlara sahip pleiotropik pro-inflamatuvar bir sitokindir (62). Konak hücrelerin Gram negatif bakterilere karşı esas mediyatörüdür. TNF'nin hücrel kaynağı lipopolisakkarit ile aktive olan mononükleer fagositlerdir. İnsan TNF'si nonglikolize bir transmembran protein olup, molekül ağırlığı 17 kDa'dır. İki çeşit TNF vardır. Bunlar, genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α (kaşektin) ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (Lenfotoksin)'dir (2, 87, 166).

Tümör nekroz faktörü alfa'nın pleiotropik etkilerine iki farklı, fakat yapısal olarak benzer TNF reseptörleri aracılık eder. TNFR1; 60 kDa reseptör 1 ve TNFR2; 80 kDa reseptör 2 olarak adlandırılan bu reseptörler tip 1 transmembran glikoproteinlerdir

ve TNF reseptör süperaillesinin üyeleridir. TNFR1 ve TNFR2 eritrositler dışında hemen hemen tüm canlı hücre tiplerinde bulunur. TNFR1 çoğunlukla her yerde bulunurken, TNFR2 daha çok endotel hücreleri ve hematopoietik kökenli hücrelerde baskındır. Her iki reseptörde TNF'ye yüksek bir afiniteyle bağlanabilir (176).

TNFR1'in hücre içi fonksiyonel alt birimleri, hücre içi adaptör proteinlerle etkileşerek TNF'nin biyolojik aktivitesinin koordinasyonunda hücre içi sinyallerle uyum sağlar. TNFR1, C – terminal ölüm domaini ve birbirine yakın konumlanmış N-SMaz (nötral sfingomyelinaz) ile A-SMaz (asidik sfingomyelinaz) aktive edici domainleri (NSD ve ASD) olmak üzere üç fonksiyonel domainden oluşmaktadır. Bu domainler hücre dışından gelen TNF sinyallerini hücre içi adaptör proteinlere aktarırlar. TNFR1 ilişkili ölüm domaini (TRADD) reseptörün ölüm domainine bağlanarak hem apoptotik hem de antiapoptotik yolakda rol oynar. TNF'nin proapoptotik etkilerine ASD domaini üzerinden fosfotidilkolin – özel fosfolipaz c (PC-PLC) aktivasyonu aracılık eder. N-SMaz ilişkili faktör (FAN) TNFR1'in NSD domainine bağlanarak TNF'nin çeşitli inflamatuvar cevap ve hücre proliferasyonu ile sonuçlanan olaylarına aracılık eder. NSD domaini inflamatuvar cevap ve hücre proliferasyonunun TNF aracılı düzenlenmesinde merkezi bir noktadadır. N-SMaz ilişkili faktör (FAN) bir sfingomyelin yıkım ürünü olan seramid üretimi üzerinde özellikle N-SMaz'ı aktifleyerek ayarlayıcı fonksiyon görür. Plazma membranında seramid ilişkili protein kinazları (CAPK) aktifler ki bu aktivasyon sitoplazmik raf-1'i fosforile eder. Aktive raf-1 sırayla MAP kinaz kaskadını ve MAPK/ERK'ı (ekstrasellüler sinyal-düzenleyici kinaz) ve fosfolipaz A2'yi aktive edebilir. Fosfolipaz A2 araşidonik asit metabolitleri olan lökotrienler ve prostaglandinlerin üretiminden sorumludur (Şekil 7). Bu metabolitler TNF'nin proinflamatuvar aktivitelere katkı sağlarlar (176).

TNFR2 aracılı sinyalizasyon daha az karakterize edilmekle birlikte TNF'nin T ve B hücre proliferasyonunu sağlayan etkilerine aracılık eder. TNFR2 insan ve kemirgen aktive T hücrelerini apoptozisi indükleyerek baskılar. TNFR2'nin hücre içi ölüm domaini olmaması apoptozisi indüklemekte farklı mekanizmalar üzerinden etki gösterdiğini desteklemektedir. Anti – apoptotik bir protein olan Bcl-xL'nin baskılanması TNFR2'nin indüklediği apoptozisle korelasyon halindedir (176).



Şekil 7. TNF Reseptör -1 aracılı sinyal iletim yolları (176)

TNF nanomolar konsantrasyonlarda lökosit ve endotel hücreleri için lokal olarak parakrin ve otokrin düzenleyicidir. Düşük yoğunluklarda ($<10^{-9}$ M) biyolojik etkileri şunlardır: ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi hücre yüzey adezyon moleküllerinin yapımını artırarak lökositlerin adezyonuna destek olur. Böylece lökositlerin hücre yüzeyine tutunması ve endotel bariyerden geçişini hızlandırır (185). Pro-inflamatuar sitokin üretiminde “mastır düzenleyici” olarak görev yapar (138). Endotel hücreleri ve makrofajları kemokin salınımı için uyarır (1). TNF hepatosit kökenli akut faz proteinlerinin salınımını uyarır (1).

Gram negatif bakteriyel sepsis durumlarında çok yüksek miktarda ($>10^{-7}$ M) TNF üretilir ve serum TNF yoğunluğu artar. LPS enjeksiyonundan 30 dakika sonra serumda görülmeye başlar ve 60 – 90 dakika içerisinde pik düzeylerine ulaşır. Memelilerde 10 – 20 dakikalık yarılama ömrü vardır (122).

İnterlökin – 6 (IL-6)

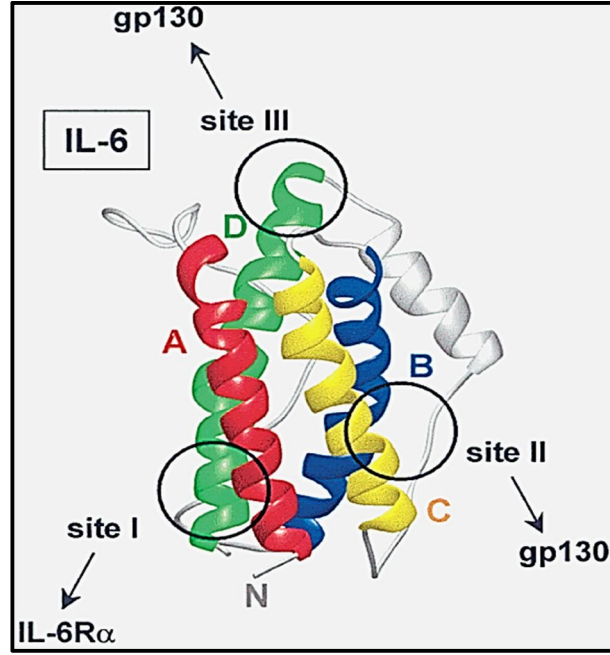
İnterlökin 6–tip sitokin ailesi IL-6, IL-11, LIF (lösemi inhibitör faktör), OSM (onkostatin M), CNTF (siliar nötrofik faktör), CT-1 (kardiotrofin-1) ve CLC (kardiotrofin-benzeri sitokin) üyelerinden oluşur. Farklılaşma, hayatta kalma, apoptoz, çoğalma gibi fonksiyonların sürdürülmesinde hedef genleri aktive ederler (72).

İnterlökin-6 çeşitli biyolojik aktivitelere sahip, hem lenfoid (T ve B hücreleri) hem de lenfoid olmayan hücreler (makrofajlar, kemik iliği stroma hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, mezengial hücreler, astrositler, endotel hücreleri) tarafından üretilen, immün reaktivite, akut faz cevap, inflamasyon, onkogenез ve hematopoezi düzenleyen pleiotropik bir sitokindir (56, 176).

İnterlökin-6, 21 – 28 kDa moleküler kütleyle sahip bir glikoprotein olup 4 – heliks kıvrımlı yapıya sahiptir IL-6 üç farklı reseptör bağlanma bölgesine sahiptir. Bölge 1; IL-6 reseptörü ile bağlantı kurar, Bölge 2; domain 2 ve 3 arasında gp130 ile bağlantı kurar, Bölge 3; domain 1 veya gp130'un Ig- benzeri domaini ile bağlantı kurar (Şekil 8) (161).

İnsan ve fare IL-6 geni yaklaşık 5 – 7 kilobaz uzunluğundadır ve her ikisi de 5 ekzon ve 4 intron bölge içerir (191). İnsan IL-6 geni 7. kromozomun kısa kolu üzerinde (7p15-21) (164) lokalize iken, fare IL-6 geni 5.kromozom üzerindedir.

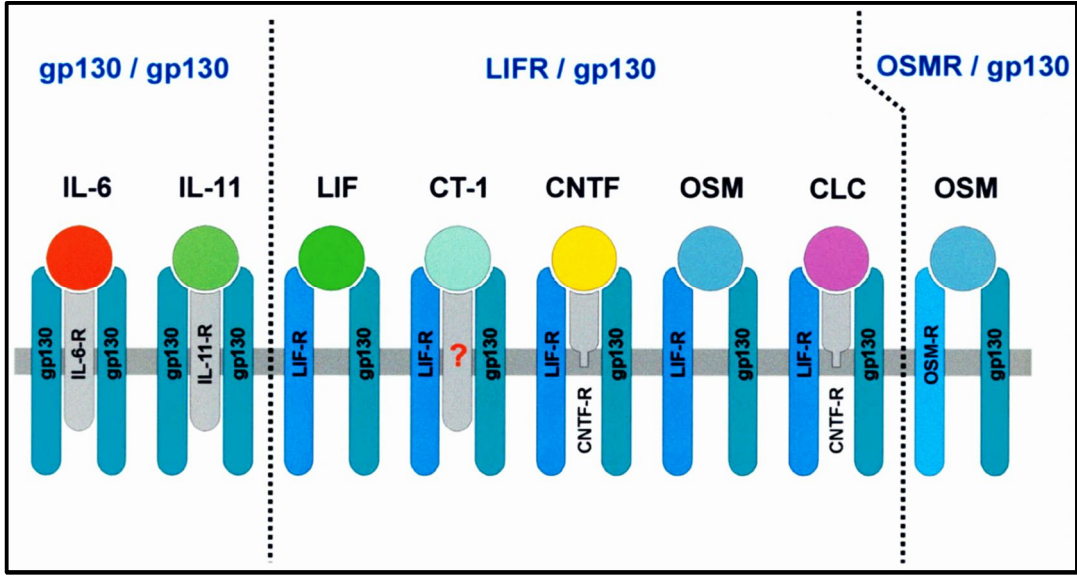
İnterlökin-6 çeşitli uyaranlar tarafından düzenlenir. T – hücreleri veya T – hücre klonlarında T – hücre mitojenleri ya da antijenik uyaranlarla üretimleri uyarılır. Monosit ve fibroblastlarda LPS IL-6 üretimini artırırken, glukokortikoidler bu üretimi baskılar. IL-1, TNF, IFN- β , trombosit – kökenli büyüme faktörü (PDGF), protein kinaz C, kalsiyum iyonofor A23187 gibi hücre içi siklik AMP derişimini artırıcı ajanlar aynı zamanda IL-6 üretimini de uyarırlar. Oysa IL-4 ve IL-13 monositlerde IL-6 üretimini durdururlar (176).



Şekil 8. IL-6 tersiyer yapısı (72)

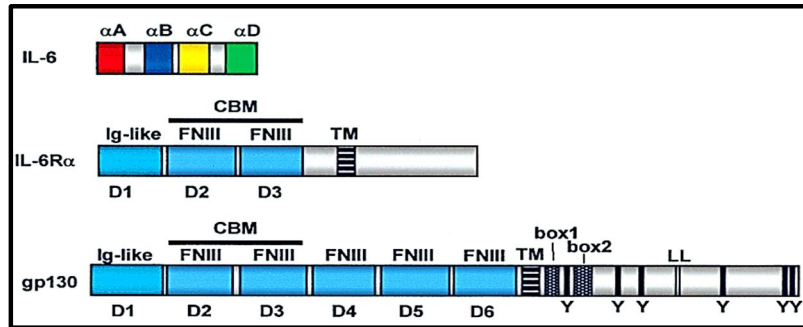
İnterlökin-6 birçok akut faz proteininin üretiminde esas uyarıcı iken (59), diğer sitokinler akut faz proteinlerinin alt grupları üzerinde etki gösterirler.

İnterlökin 6'nın biyolojik aktivitelere aracılık eden reseptör kompleksi 2 alt birimden oluşur. Bunlardan α alt birim IL-6R olarak isimlendirilen tip 1 transmembran glikoprotein (CD126, gp80) ve β alt birim tip 1 transmembran sinyal değiştirici protein gp130 (CD130)'dan oluşur. Hedef hücrelerde, IL-6 ilk önce membrana bağlı sinyal aktivitesi olmayan α reseptör IL-6R (mbIL-6R)'ye bağlanır. Daha sonra bu kompleks gp130'un iki molekülüne bağlanır ve JAK/STAT, ERK ve PI3K sinyal uyum yollarını aktive eden IL-6 sinyal aktarımı gerçekleşir (161). IL-6 ve IL-11 bu sitokin ailesi içerisinde sinyal aktarımını sadece gp130 homodimerleri üzerinden gerçekleştiren sitokinler olup, diğer IL-6 sitokin ailesi üyeleri sinyal aktarımını ya gp130 homodimerleri, LIFR (LIF, CNTF, CT-1 ve CLC) veya gp130 ve OSMR (OSM) aracılığıyla gerçekleştirirler (Şekil 9) (72).



Şekil 9. IL-6 tipi sitokinlerin reseptör kompleksleri (72)

Moleküler ağırlığı 130 – 150 kDa olan gp130, 6 ekstrasellüler, tek bir transmembran ve bir sitoplazmik domainden oluşan glikolize tip 1 transmembran proteindir. Gp130 N- terminal Ig – benzeri domain (D1), bunu takip eden iki sitokin bağlama bölgesi (CBD; D2 ve D3) ve üç fibronektin-benzeri (FNIII) domainden oluşur (D4-D6). N- terminal yerleşimli domain 2 birbirlerine disülfid köprüleri ile bağlı iki çift sistein kalıntısı içerir. C-terminal yerleşimli D3 Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) motifi içerir (161).



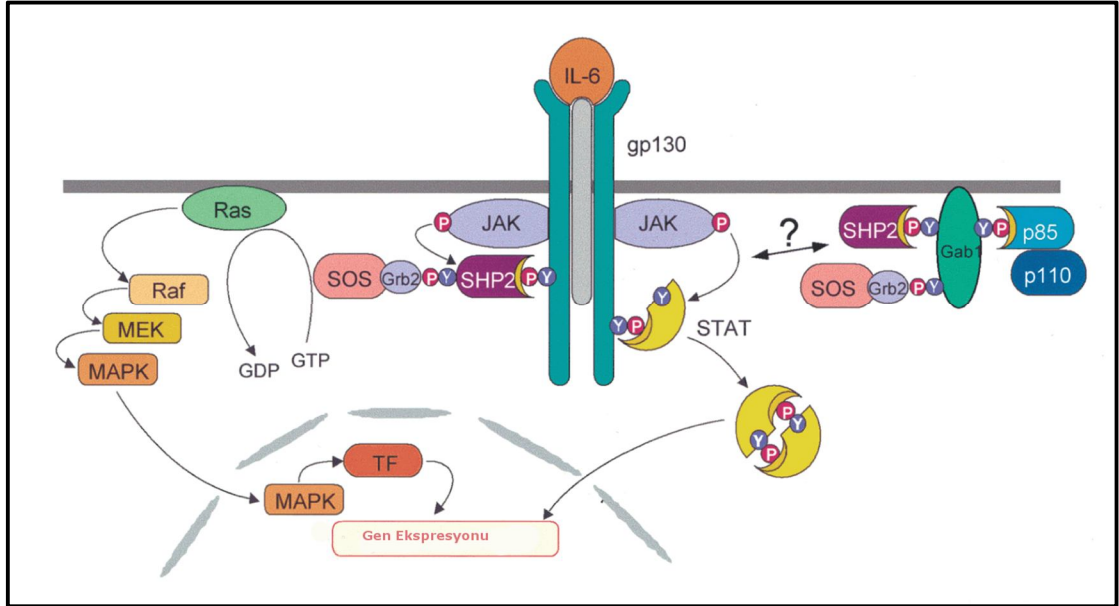
Şekil 10. IL-6, IL-6R ve gp130'un yapısal organizasyonu (72)

Gp130 taşıyan sitokin reseptörlerinin birçoğunun intrinsik katalitik domainleri yoktur. Janus ailesi tirozin kinazların (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk-2) bulunmasıyla sitokinlerin ve hormonların sinyal iletimleri konusunda önemli bir nokta aydınlatılmış

oldu. Bununla birlikte, sinyal aktarıcı ve transkripsiyon aktivatörü (STAT)'nın sitokin sinyal aktarım yollarında merkezi bir role sahip olduğunun belirlenmesiyle sitokin sinyalinin ekstrasellüler – intraselüler – nükleus süreci de büyük ölçüde belirlenmiştir.

Otofosforilasyon özelliği bulunan bu tirozin kinaz ailesi üyelerinden özellikle JAK1, IL-6 sinyal iletiminde esansiyeldir ve yokluğunda sinyalizasyon önemli ölçüde bozulur (67, 153). Gp130 ve JAK1 arasındaki bağlantı son derece sıkı ve dayanıklıdır.

Janus ailesi tirozin kinazlar sitokin reseptörlerinin box-1 ve box-2 olarak adlandırılan membran-proksimal bölgesine bağlanırlar. JAK'ların sinyal aktarım görevleri dışında bazı sitokin reseptörlerinin eksprese edilmelerinde de görev üstlenirler. JAK1, JAK2 ve Tyk-2'nin birlikte ekspresyonları insan OSMR yüzey reseptörlerinin ekspresyonlarını artırır. Tyk-2 IFN- α reseptör 1 zincirinin yüzey ekspresyonunda önemlidir (72).



Şekil 11. IL-6 aktivasyonlu JAK/STAT yolağı ve MAPK kaskadı (72)

İnterlökin-6'nın doğal bağışıklıktan kazanılmış bağışıklığa geçiş sırasında çok önemli bir rolü olduğunu işaret eden çalışmalar mevcuttur. Akut inflamasyon, inflamasyon bölgesinde reaktif oksijen türleri ve nötrofil kökenli proteazların birikimiyle artacak olan doku hasarından korunmak için nötrofil infiltrasyonunun yerini 24-48 saat sonra monositler ve T-hücrelerine bırakması ile karakterize bir süreçtir.

Mikrobiyal ürünler, IL-1 β veya TNF- α tarafından aktive edilen diğer vasküler elementlerle birlikte endotel hücreleri, inflamasyonun başlangıç fazında nötrofillerin bölgeye çekimine yol açan IL-6 ile birlikte çeşitli kemokinleri de üretir. Saldırgan nötrofillerdeki IL-6R'nin proteolitik işlemleri sonucunda doku hücrelerinde IL-6 sinyalizasyonunu harekete geçirir. Bu durum, nötrofil göçünü hızlandıran kemokinlerin baskılanması ve monosit göçünü artıran kemokinlerin üretiminin hızlandırılmasıyla inflamasyon bölgesinde nötrofillerden monositlere doğru yeniden bir düzenlenmeye yol açar (81, 92, 96, 155).

IL-6^{-/-} farelerde peritoneal inflamasyon analizi IL-6'nın T-hücre takviyesi için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. IL-6 sinyalizasyonu T-hücre çoğaltımını sağlayan kemokinlerin ekspresyonunu başlatır, T-hücrelerini apoptoza girmekten korur (15).

B ve T hücre farklılaşmasında IL-6 çok önemli bir rol üstlenir. IL-6 ilk başlarda B-hücre kültüründe antikor üretimini artırıcı faktör olarak tanımlanmaktaydı. Son zamanlarda IL-21 üretimini artırmak suretiyle CD4⁺ T-hücrelerinin B-hücrelerine yardımcı yeteneklerini destekler (48).

Hepatositler tarafından akut faz proteinlerinin sentezi IL-1, TNF ve HSF (hepatosit uyarıcı faktör) gibi çeşitli faktörler tarafından düzenlenir. Rekombinant IL-6'nın HSF gibi fonksiyon gösterebileceği bulunmuştur ve HSF aktivitesi IL-6 molekülü ile düzenlenebilmektedir. IL-6 HepG2 insan hepatoma hücre kültüründe fibrinojen, α 1 antitripsin, α 1 asit glikoprotein ve haptoglobin gibi çeşitli akut faz proteinlerini indükler. Bu proteinlere ek olarak insan primer hepatositlerinde serum amiloid A, C-Reaktif Protein ve α 1 antitripsini de uyarır. Şiddetli yanık vakalarında ateş ve CRP ile IL-6'nın iyi korelasyon gösterdiği bildirilmektedir. Aynı zamanda cerrahi operasyon geçiren hastalarda serum CRP düzeylerinin yükselmesinden önce IL-6 düzeylerinde bir artış tespit edilmiştir. IL-6 yoksun fareler doku hasarı veya enfeksiyon sonrasında şiddetli bozuk inflamatuvar akut faz cevabı göstermektedirler (176).

2.2.2. Araşidonik Asit Metabolitleri (Eikozanoidler)

Eikozanoidler (IUPAC adlandırması ikozanoidler) (Yunanca *eicosa* = yirmi) yirmi karbonlu esansiyel yağ asitlerinin (EFA) oksidasyonu ile oluşan, güçlü biyolojik etkinlik gösteren endojen sinyal molekülleridir (Tablo 6). Eikozanoidler omega-3 (ω -3) ya da omega-6 (ω -6) yağ asitleri deriveleridir. Omega-3 (ω -3) ve omega-6 (ω -6) yağ asitleri insan dahil birçok hayvan türünün doğru beslenmesi için vazgeçilmez olduğu bilinen esansiyel yağ asitleridir ve dolayısı ile, besinle alınmaları zorunludur.

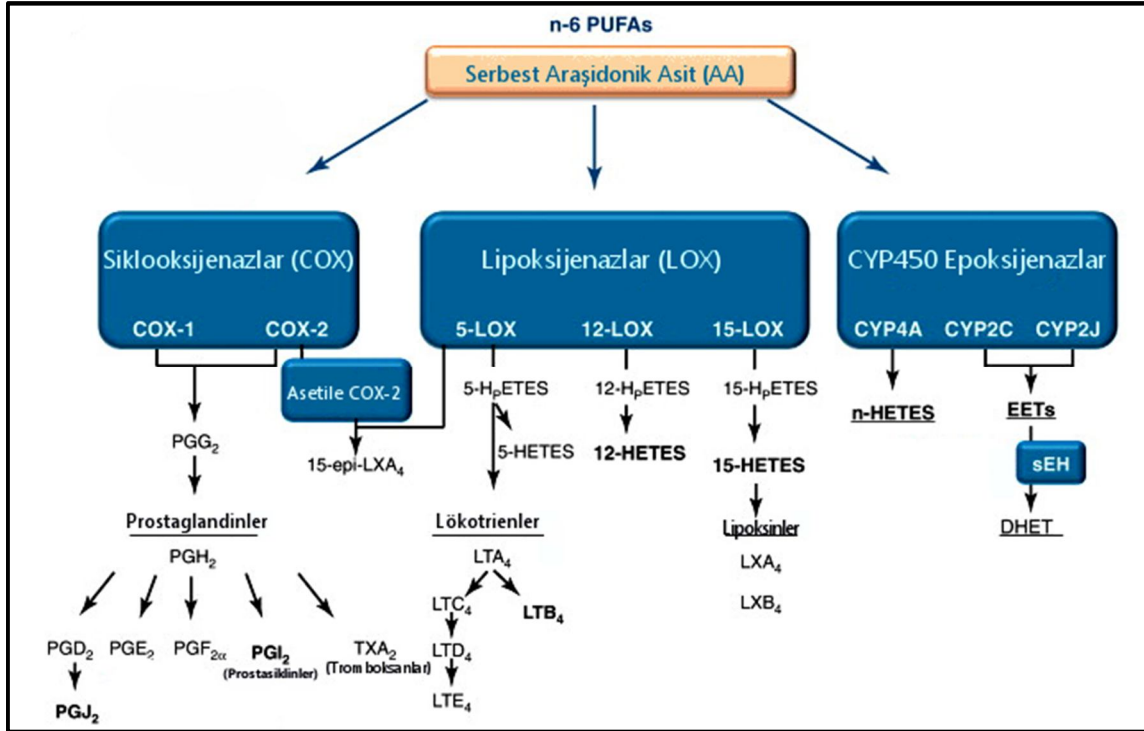
Tablo 6. Eikozanoid Ailesi (115 no.lu referanstan *modifiye edilmiştir*)

İsim	Eikozanoid Ailesi
	Biyosentez Yolu
<i>Prostaglandinler</i>	Siklooksijenaz/prostaglandin sentazlar
<i>Tromboksanlar</i>	Siklooksijenaz/Tromboksan sentazlar
<i>Prostasiklinler</i>	Siklooksijenaz/Prostasiklin sentazlar
<i>HPETEs ve HETEs</i>	Lipoksijenazlar ve Sitokrom P-450-bağımlı monooksijenazlar
<i>Lökotrienler</i>	Lipoksijenazlar/Lökotrien sentazlar
<i>Lipoksinler</i>	Lipoksijenazlar
<i>15-Epi-lipoksinler</i>	Asetile Siklooksijenaz-2
<i>Hepoksilinler</i>	Lipoksijenazlar
<i>Trioksilinler</i>	Lipoksijenazlar
<i>Epoksieikozatrienoik asitler</i>	Sitokrom P-450-bağımlı monooksijenazlar
<i>Izoprostanlar</i>	Non-enzimatik lipit peroksidasyonu
<i>Anandamid</i>	Bilinmiyor

Genel olarak, plazma zarındaki fosfolipidlerin 2. konusundan fosfolipaz A₂ (PLA₂) etkisi ile oluşturulan araşidonat, prostaglandin (PG), tromboksan (TX), lökotrien (LT) ve lipoksin (LX) bileşiklerin sentezi için kullanılan ortak substrattır.

Eikozanoidler araşidonik asiti substrat olarak kullanan yollardaki enzimlerin türüne göre siklooksijenaz ürünleri, lipoksijenaz ürünleri ve p450 monooksijenaz ürünleri şeklinde üç ana başlık altında incelenirler (Şekil 12). Her bir başlık altında yer

alan olaylar fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolleri ve etkileri bakımından aralarında belirgin farklar vardır.



Şekil 12. Araşidonik Asitten köken alan Siklooksijenaz (COX), Lipoksijenaz (LOX) ve Sitokrom P450 Epoksijenaz (Monoksijenaz) Ürünleri (182 no.lu referanstan *modifiye edilmiştir*)

EET:Epoksieikozaenoik asit, DHET: dihidroksieikozaatrienoik asit (DHETs), Siklooksijenaz (COX), Lipoksijenaz (LOX), hidroperoksieikozatetraenoik asit (HPETE), hidroksieikozatetraenoik asit (HETE)

Prostanoidler olarak adlandırılan siklooksijenaz yolağı eikozanoidleri prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlardır. Araşidonik asitten prostanoidlerin oluşma reaksiyonu iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta prostaglandin endoperoksit sentaz enzimleri (siklooksijenazlar) aracılığıyla araşidonik asitten prostaglandin (PG) endoperoksit PGG₂ oluşur. Daha sonra PGG₂, peroksidaz etkisiyle PGH₂'ye indirgenir (115). İkinci basamakta ise kararsız olan PGH₂ spesifik dokularda spesifik enzimlerle prostanoidlere dönüşürken, trombositlerde tromboksan sentaz enzimi tarafından tromboksanlara (TXA₂, TXB₂) dönüşür (49).

Prostaglandinler ve lökotrienler, fiziksel, ısı, kimyasal, bakteriyel ve çeşitli nedenlere bağlı olarak inflamasyon belirti ve semptomlarının ortaya çıkmasında önemli

rol oynarlar. Prostaglandinlerin damar geçirgenliği üzerinde doğrudan etkileri olmasa da PGE₂ ve PGI₂ inflamasyon bölgesinde ödem oluşumu ve lökositlerin damar yatağından çıkışını belirgin bir şekilde artırır. PGE₂ çok güçlü bir proinflamatuvar ve hiperaljezik prostanoitdir (64).

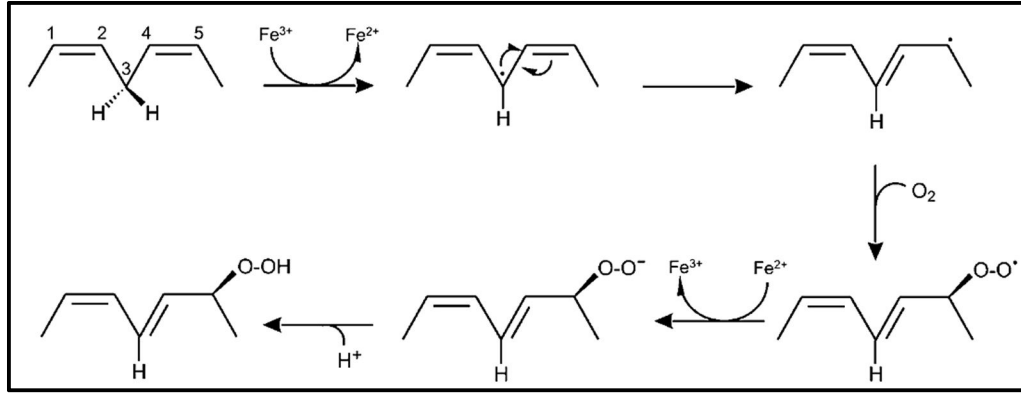
Lipoksijenaz Enzim Yolağı, Lökotrienler ve İnflamasyonda Rolü

Prostaglandinlerin aksine lökotrienler (LT), baskın olarak mast hücreleri, makroplar ve polimorfonükleer lökositler tarafından üretilir. İmmün kompleksler, bakteriyel peptitler ve diğer uyarıların yol açtığı hücresele aktivasyon 5-lipoksijenaz ve PLA₂'nin nükleus zarına translokasyonlarına yol açan olaylar zinciri akışına neden olur (58).

Lipoksijenaz reaksiyonları “hem” yapısında olmayan demir içeren dioksijenazlar tarafından çoklu doymamış yağ asitlerinin bir veya daha fazla *cis,cis-1,4-pentadien* kalıntılarına moleküler oksijenin katılmasını katalize ederler (68).

Lipoksijenaz reaksiyonları eşit molar hidroperoksitlerin eklenmesiyle durdurulabilen bir lag fazı¹ ile karakterizedir ve muhtemelen Fe⁺² (inaktif, ferröz form)'nin Fe⁺³ (aktif, ferrik forma)'e oksidasyonu bu duruma yol açmaktadır. Bu da şu demektir ki hücrelerdeki hidroperoksit düzeyleri lipoksijenaz aktivitesini etkilemektedir. Tanımlanmış birçok reaksiyon (serbest radikal reaksiyonları gibi) *cis,cis-1,4-pentadien* yapının C3'deki hidrojenin stereoözlü uzaklaştırılması ile başlatılır. Bu durum karbon merkezli radikal oluşumuna yol açar. Hidrojen proton ve elektronlarına ayrışır ve Fe⁺²'yi indirger. Paylaşılmamış radikal elektronları komşu çift bağın elektronlarından biri ile birleşir. Böylece radikalın moleküler oksijenin peroksi radikale dönüştüğü C5'e göçü *1-cis,3-trans* konjugedien oluşumuna yol açar. Daha sonra demir peroksi radikale elektron transfer ederek oksitlenir ve peroksi anyonu oluşur. Demir protonlanarak (Fe⁺³) enzim aktiflenir. Hidrojenin uzaklaştırılması ve oksijenin yerleştirilmesi substratın farklı kısımlarında meydana gelir fakat aynı mekanizma ile stereoözlülük olmaksızın non-enzimatik oto-oksidasyon ile de kendiliğinden gelişebilir (68).

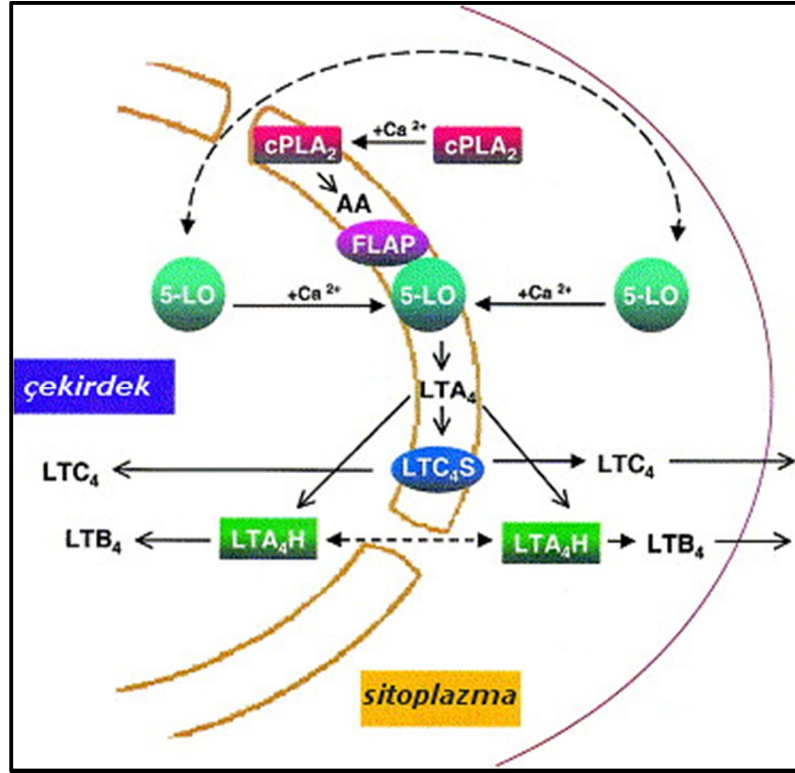
¹ Enerjinin verilmesi ile bunun sonucu olan hareketin meydana gelmesi arasında geçen zaman



Şekil 13. *cis,cis*-1,4-pentadien yapının lipoksijenasyon mekanizması (68).

Lipoksijenazların dönüşümünü gerçekleştirdiği tüm sinyal molekülleri arasında lökotrienlerin ayrı bir yeri vardır ve özellikle inflamasyon mediyatörleri olarak patofizyolojik rolleri çok önemlidir. İsimlerinden de anlaşıldığı gibi lökotrienler temel olarak çeşitli lökosit tiplerinde üretilirler. Lökotrienler iki majör sınıfa ayrılırlar; 1. Dihidroksi asit lökotrien B₄ (LTB₄), şimdiye kadar bilinen en güçlü kemotaktik ajanlardan biri, 2. Sisteinil-lökotrienler (cys-LT), LTC₄, LTD₄ ve LTE₄, çok güçlü spazmojenik ajanlardır (68).

Üç anahtar protein LT sentezinin başlamasında görev alır: sitozolik fosfolipaz A₂ (cPLA₂), 5-lipoksijenaz (5-LOX) ve 5-lipoksijenaz aktive edici protein (FLAP) (143). Bu üç proteinin hücre içi yerleşimleri ile ilgili yapılan çalışmalar sanılanın aksine ayrı ayrı değil birlikte lokalize oldukları ve bu lokalizasyon yerinin plazma membranı değil çekirdek zarı olduğu yönündedir. Bunlardan ilk elde edilen veri FLAP molekülünün çekirdek zarında bulunduğu (144, 186). İkincisi ise, aktivasyon esnasında, cPLA₂ plazma membranına doğru değil çekirdek zarına doğru hareket ettiğinin belirlenmesidir (61, 144, 145, 162). Üçüncü önemli bilgi ise cPLA₂'nin selektif olarak çekirdek zarının fosfolipitlerini hidroliz ettiğidir (144). Sitoloplazmik cPLA₂ çekirdek zarının fosfolipitlerinden araşidonik asiti (AA) serbestleştirir. Serbest AA FLAP molekülüne bağlanır, 5-LOX ile oksijenasyon reaksiyonu gerçekleşir. Bu reaksiyon sırasında FLAP 5-LOX enzimine bağlanmaz (186). Yine bu reaksiyonun gerçekleştiği bölgede LTC₄ sentaz enzimi de yer alır (Tablo 7) (Şekil 14) (140).



Şekil 14. Lökotrien sentezinde hücre-içi yerleşim ve cPLA₂ ve 5-LOX'un translokasyonu (144)

Tablo 7. LTA₄ sentezinde rol oynayan enzimlerin hücre içi yerleşimleri (128)

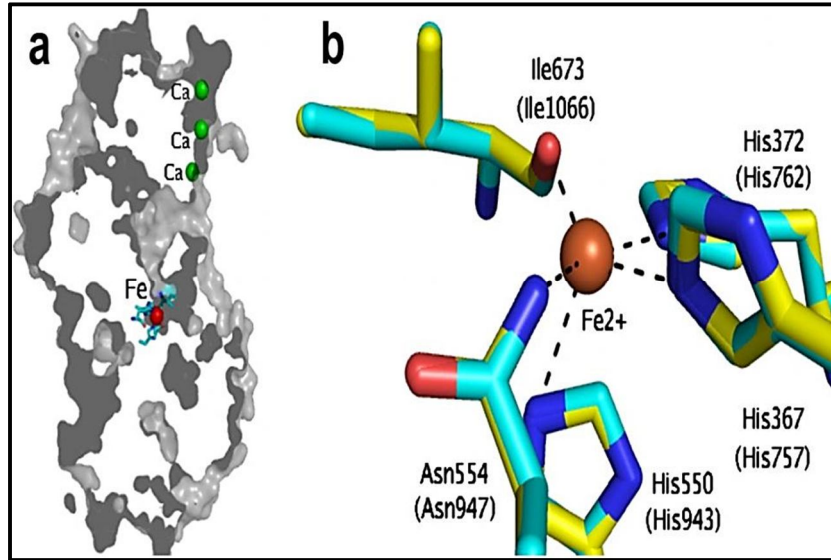
Protein	Dinlenme durumunda hücresel konumu	Aktivasyon durumunda hücresel konumu
cPLA ₂	Sitozol	perinükleer membran, golgi aparatı, endoplasmik retikulum
5-LOX	Sitozol, nükleoplazma	perinükleer membran
FLAP	perinükleer membran	perinükleer membran
LTA ₄ -H	Sitozol	Sitozol, nükleoplazma
LTC ₄ -S	perinükleer membran	perinükleer membran

Lipoksijenaz Enzimleri

5 – Lipoksijenaz (5-LOX, Araşidonat 5-Lipoksijenaz)

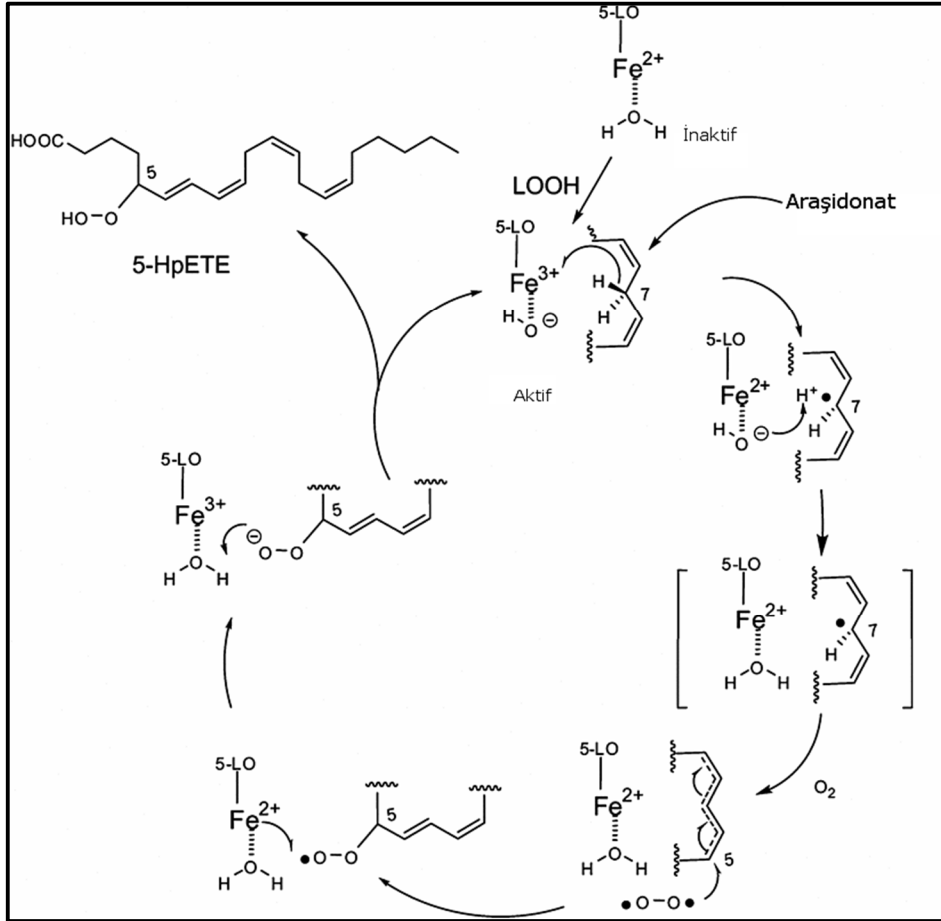
5-Lipoksijenaz (EC 1.13.11.34) çözünebilir monomerik non-hem demir içeren bir dioksijenazdır. Lökotrien sentezinin ilk iki basamağını kataliz ederek araşidonik asitten kararsız epoksit ara ürün LTA_4 meydana gelir. Granülositler, monosit/makrofajlar, mast hücreleri, dendritik hücreler ve B-lenfositler 5-LOX üretirken, trombositler, endotel hücreleri, T-hücreler ve eritrositler üretmezler. Deride Langerhans hücrelerinde de güçlü bir şekilde sentezlendiği tespit edilmiştir (69, 148). Transforming Büyüme Faktörü- β (171), retinoik asit ve vitamin D3'ün hücre kültürü ortamında enzim mRNA ve protein miktarını artırdığı tespit edilmiştir (148). Fare mast hücrelerinde IL-3 ve olgun nötrofillerde GM-CSF enzimi uyarmaktadır (68).

Enzimin polipeptit zinciri iki alt biriminden oluşur; N-terminal regülatör bölge ve C-terminal katalitik bölge. Non-hem demir C-terminal bölgede yer alır. Demir atomu His550, His372, His367 ve Ile673 aminoasit kalıntıları arasındaki bölgede tutulmaktadır (Şekil 15) (152).



Şekil 15. 5-lipoksijenaz (152)

Oksijenasyon reaksiyonunda, 5-LOX araşidonik asiti 5 (*S*)-hidroperoksi-6-*trans*-8,11,14-*cis* eikozatetraenoik asit (5-HPETE)'e dönüştürür. 5-LOX'nun patates yumrusu ve RBL-1 hücrelerinde 7-*(R)*-döterio-araşidonat ile inkübasyonu C7 pozisyonundan hidrojenin koparıldığını oksijenin antarafasiyal olarak yerleştirildiğini göstermektedir (147). 5-LOX lökotrien biyosentezinin bir sonraki basamağı olan LTA₄'ün 5-HPETE'den oluşumunu da katalizler. Enzimin her iki aktivitesi de aktivatörler ve inhibitörler tarafından eşit şekilde etkilenir. 5-HPETE'nin LTA₄' e dönüşümü ise C10'daki *pro-R* hidrojenin uzaklaştırılması ile başlatılır. Böylece araşidonik asit LTA₄'e dönüştüğünde yağ asidinin omurgasının aynı bölgesinden ardışık iki H'nin uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilmiş olur (Şekil 16) (128).



Şekil 16. 5-lipoksijenazın katalitik döngüsü (128, 147)

5-LOX'nun oksijenaz aktivitesi için gerekli diğer substratlar, 5,8,11,14,17-eikozapentaenoik asit, 5,8,11-eikozatrienoik asit, 5,8-eikozadienoik asit, 12-HPETE ve 15-HPETE'dir (45, 131, 179).

5-LOX kararsız bir enzimdir, 0°C'de 30 dakika (156), 2°C'de 24 saat (179) içinde yarı aktivitesini kaybetmektedir. Kalsiyum (151) ve ATP (179) enzim aktivitesini stimüle eder. Fosfatidil kolin (137) ve FLAP (57, 187) enzimin aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan diğer faktörlerdir. 5-LOX gen aktivitesi baskılanmış farelerde şiddetli inflamasyonda azalmış immün cevaplar ortaya çıkmaktadır (32,194).

12-Lipoksijenaz (12-LOX, Araşidonat 12-lipoksijenaz)

İnsan trombositlerinde 1974 yılında keşfedilen lipoksijenaz türü olup trombosit – tipi 12-lipoksijenaz olarak tanımlanmıştır. Moleküler oksijen araşidonik asitin C12'ye yerleştirilerek 12(S)-hidroperoksi-5,8,10,14-eikozatetraenoik asit (12-HPETE) oluşur ve reaksiyon 5,8,11,14-eikozatetraenoik asit (ETYA) tarafından durdurulur. Trombositlerde ve öncülleri olan megakaryositlerde 12-LOX bulunması dışında, keratinositler de izole edilmiş ve psöriasisite aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (68).

15-Lipoksijenaz (15-LOX) ve Fare “Lökosit Tip” 12-LOX

15-lipoksijenaz esasen insan ve tavşan retikülositlerinde bulunurken, 12-LOX domuz ve sonrasında fare ve sıçan dokularında bulunmuş olup şu an bu enzimler 12/15-LOX olarak bilinmektedir. 12/15-LOX bölgesel ve stereospesifik olarak çeşitli serbest ve esterleşmiş çoklu doymamış yağ asitlerine moleküler oksijenin yerleştirilmesini katalize ederler.

İnsanlarda 12/15-LOX solunum yolu respiratuar endotelinde ve eozinofillerde bulunurken farelerde peritonel makrofajlarda en yüksek düzeyde bulunur (68).

Lökotrienlerin Sentezlenmesi

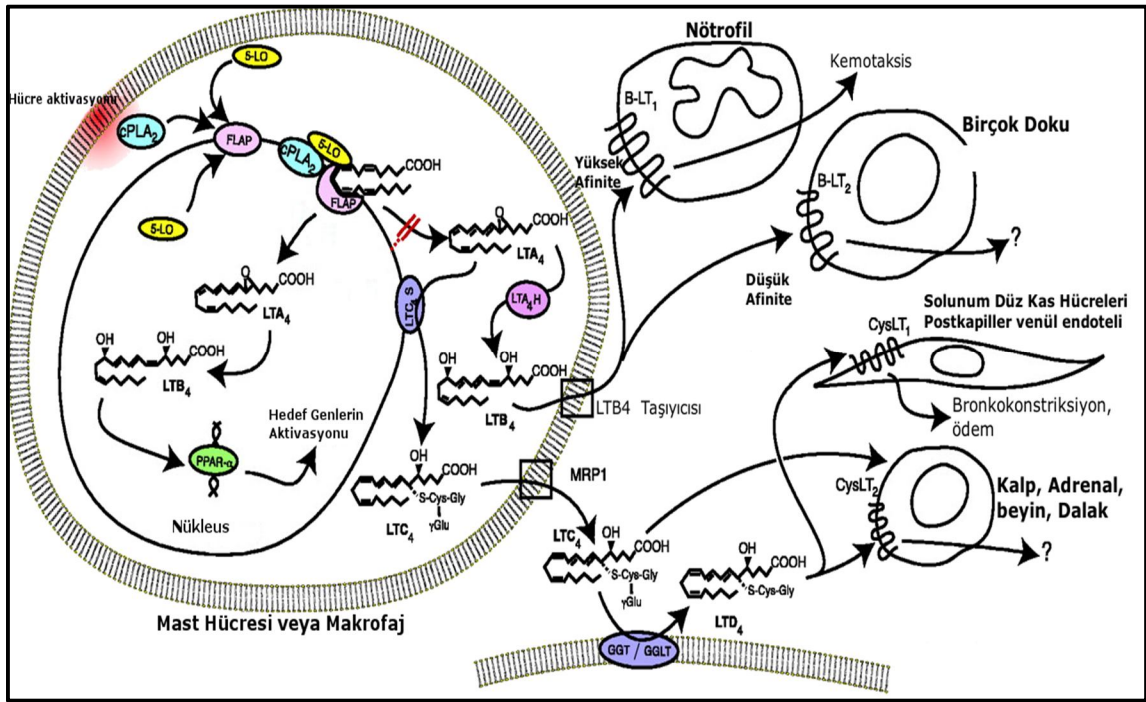
Hücre içi Ca^{+2} derişiminin artması, PLA₂ perinükleer membrandaki araşidonik asiti serbestleştirmesi ve FLAP molekülüne bağlanmasıyla aktive olan 5-LOX araşidonik asiti LTA₄'e dönüştürür. LTA₄ bu aşamadan sonra ya LTA₄-H (Hidrolaz) ya da LTA₄-S (sentaz)'ın katalizlediği reaksiyonlara girer. LTA₄-hidrolaz lökotrien A₄'ün

C12 konusuna su ekleyerek kemotaktik bir ajan olan LTB₄ oluşumunu katalizler. Eğer LTC₄-Sentaz yoluna girerse reaktif epoksinin C6 allilik karbonuna glutatyonunu tiol grubu atak yaparak epoksit açılır ve sisteinil-lökotrienler (cyc-LT) (LTC₄, LTD₄, LTE₄) oluşur. LTC₄ eozinofiller, mast hücreleri ve monositlerde bulunur. Nötrofiller, monositler, lenfositler ve eritrositler LTA₄-hidrolaz enzim kaynağı açısından zengin iken, bazofiller ve trombositler bu enzimi sentezleyemezler.

Lökotrienler lokal ya da sistemik etkileri ile genel olarak inflamatuvar yanıtta rol oynayan ve bazı kronik inflamatuvar hastalıkların gelişiminden sorumlu mediyatörlerdir. Sisteinil lökotrienlerin astım patogenezinde önemli yeri bulunurken LTB₄'ün ise diğer inflamatuvar süreçlerde etkili olduğu ileri sürülmüştür. LTB₄'ün en önemli biyolojik aktivitesi lökositler ve nötrofiller üzerine kemotaktik aktivitesidir. Ayrıca lökositlerin endotelial adezyonu ve ekstrasvasküler aralığa migrasyonunu artırdığı saptanmıştır. Lökositlerden süperoksit anyonları ve çeşitli granül içeriklerinin salınımını uyardığı bildirilmiştir (134).

Lökotrienler biyolojik etkilerini spesifik reseptörleri aracılığı ile gösterirler. Farklı biyolojik aktiviteleri nedeniyle LTB₄ ve sisteinil lökotrienler için iki ayrı grup reseptör varlığı gösterilmiştir. LTB₄ için farklı afiniteye sahip iki adet G-protein bağımlı reseptör (BLT₁ ve BLT₂) vardır. Özellikle lenfosit ve mast hücreleri gibi çeşitli inflamatuvar hücrelerde eksprese edilirler. Dinlenme durumundaki endotel hücrelerinde BLT₁ ekspresyonu oldukça düşüktür fakat LPS ile uyarılarak artırılır. Bu durum inflamasyona erken vasküler cevapta LTB₄ ve reseptörlerinin önemine vurgu yapabilir. BLT₁'in aksine BLT₂ baskın olarak lökositlerde bulunur. Fizyolojik rolü tam olarak bilinmemekle birlikte son yapılan fare kolit çalışmalarında (82) anti-inflamatuvar fonksiyona sahip olabileceği gösterilmektedir. Sisteinil-lökotrienlerin G-protein eşlenik iki adet reseptörü tanımlanmıştır (cysLT₁ ve cysLT₂). CysLT₁ dalak, periferal kan lökositleri, akciğer dokusu, düz kas hücreleri, makrofajlar ve mast hücrelerinde bulunur. CysLT₁ sırasıyla LTD₄, LTC₄ ve LTE₄'ü substrat olarak tercih eder. Bu reseptör özellikle anti-astım tedavisinde kullanılan bazı ilaçların hedefindedir. CysLT₂ ise LTC₄ ve LTD₄'ü eşit şekilde bağlarken, LTE₄'e afinitesi düşüktür. Kalp, beyin, periferal kan lökositleri, dalak, plasenta ve lenf nodlarında mRNA düzeyleri oldukça yüksek iken, akciğerde çok küçük miktarlarda bulunur. Transgenik hayvan modelleri çalışmaları

CysLT₂'nin özellikle küçük damarlarda fazlasıyla bulunduğu ve endotelial permeabiliteyi artırdığını bildirmektedir. Yine bir fare çalışmasında (91), iskemi-reperfüzyon yapılan kalpte CysLT₂'nin permeabiliteyi artırarak miyokardiyal hasarı kötüleştirdiğini belirtmektedir (68).



Şekil 17. Lökotrien sentezi ve etkileri. (58 no.lu referanstan *modifiye edilmiştir*)

MRP-1: Çoklu-ilaç direnci ilişkili protein-1, GGT: γ -glutamil transpeptidaz, GGLT: γ -glutamil lökotrienaz

2.2.3. Arjinaz/Nitrik Oksit Yolağı

Arjinin; poliamin, üre, kreatin fosfat, prolin, glutamin, agmatin, NO ve proteinlerin biyosentezinde önemli bir aminoasittir ve protein yapım-yıkım döngüsünde, immün fonksiyonda, yara iyileşmesinde, hücre sel yenilenmede önemli rolü vardır (113).

Arjinin protein sentezinin arttığı gebelik dönemlerinde ve çocukluk döneminde yarı esansiyel bir amino asittir.

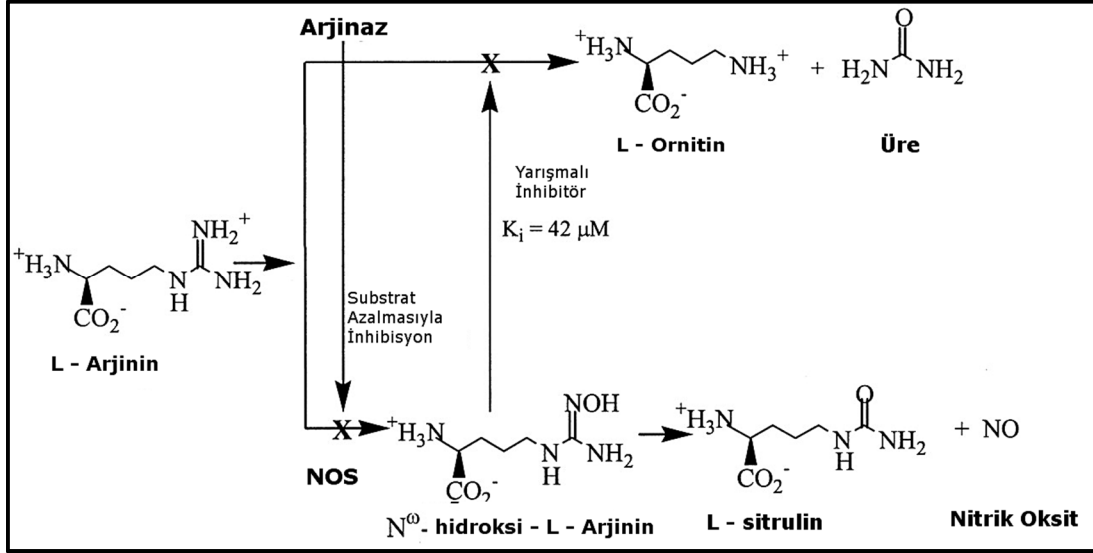
Erişkinlerde endojen arjinin sentezi intestinal – renal aks arasında gerçekleşir (190). Enterosit mitokondrilerinde glutamin, glutamat ve prolinden sentezlenen sitrulin ince bağırsağa salınır ve primer olarak arjinin yapımı için böbrekler tarafından tutulur. Oral olarak alınan arjinin tamamı sistemik dolaşıma girmez ve % 40'ı ince bağırsaklarda ilk geçiş metabolizması sırasında yıkıma uğrar (188).

Birçok hücrede arjinin transportu lizin ve ornitin gibi katyonik aminoasitlerin (KAA) taşınımıyla ortak benzerlikler gösterir. Bununla birlikte birçok hücrede plazma membranından arjinin taşınımı enerji gerektirmeyen Na^+ gradiyentine eşlenik olarak taşınır. Na^+ - bağımsız tek bir transport sistemi *sistem y^+* olarak adlandırılır ve birçok hücreye KAA'ların majör giriş yoludur (y ; lizin, +; pozitif yük). Bununla birlikte Na^+ bağımlı başka bir yol üzerinden de taşınım gerçekleşmekle birlikte bu sistem hem KAA hem de NAA (nötral aminoasitler)'ların taşınımında görev alır (Sistem B^{0,+}) (35).

Arjinin taşıyıcıları, arjinin – sitrulin döngüsü enzimleri ve arjinin arjinazla üre ve ornitine hidrolizi arjinin yararlanımını etkileyen temel faktörlerdir (Şekil 18) (70,125).

Doğrusu metabolizmada nitrik oksit sentaz enzimi ve arjinazın ortak substrat olarak arjinini kullanıyor olması bu iki enzim arasındaki ilişkinin nitrik oksit üretimi üzerinde önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (85).

eşit miktarları tarafından L-arjinin tüketim hızları, fizyolojik L-arjinin konsantrasyonlarının üzerinde, göreceli olarak baskın arjinaz lehinedir (18).



Şekil 19. Arjinaz ve nitrik oksit sentaz arasındaki etkileşim (14)

Arjinaz

Arjinaz (L-Arjinin üre amidino hidrolaz; EC 3.5.3.1) arjinini üre ve ornitine hidrolize ederek amonyağın detoksifikasyonunda rol oynayan üre döngüsünün son enzimidir.

Arjinazın AI ve AII olmak üzere iki izoformu vardır. Bunlardan AI (hepatik arjinaz) sitoplazmik kökenli ve ağırlıklı olarak karaciğerde bulunurken, AII (ekstrahepatik arjinaz) ise mitokondriyal matris içinde yerleşim göstermektedir. AI üre sentezi ve amonyağın zehirsizleştirilmesi ile sorumlu iken AII ise ornitin, prolin, glutamat gibi biyosentetik fonksiyonlarla ilgilidir (168).

Tablo 8. Arjinaz izoenzimlerinin karşılaştırılmalı özellikleri (30)

	Arjinaz I	Arjinaz II
Doku spesifitesi	Karaciğer, RBC	Böbrek, beyin, GI, prostat
Anti – AI ile immünreaktivite	+	-
Moleküler Kütle (Da)	35,000	40,000
İzoelektrik nokta	9,8	6,8
[Mn ²⁺] iyonu gereksinimi (mmol/L)	20	2
Prolin ile inhibisyon	±	++
İzolösin ile inhibisyon	++	±
Hücre içi Yerleşim	Sitozol	Mitokondri

Karaciğer, arjinaz aktivitesinin en yüksek olduğu dokudur. Ekstrahepatik dokulardaki aktivitesi, karaciğere oranla belirgin olarak düşüktür. Bu dokuların başında eritrositler, lökositler, trombositler, plazma, böbrek, iskelet ve kalp kası, beyin, bağırsak, pankreas, akciğer, tükürük bezleri, meme bezi ve testisler gelmektedir (120).

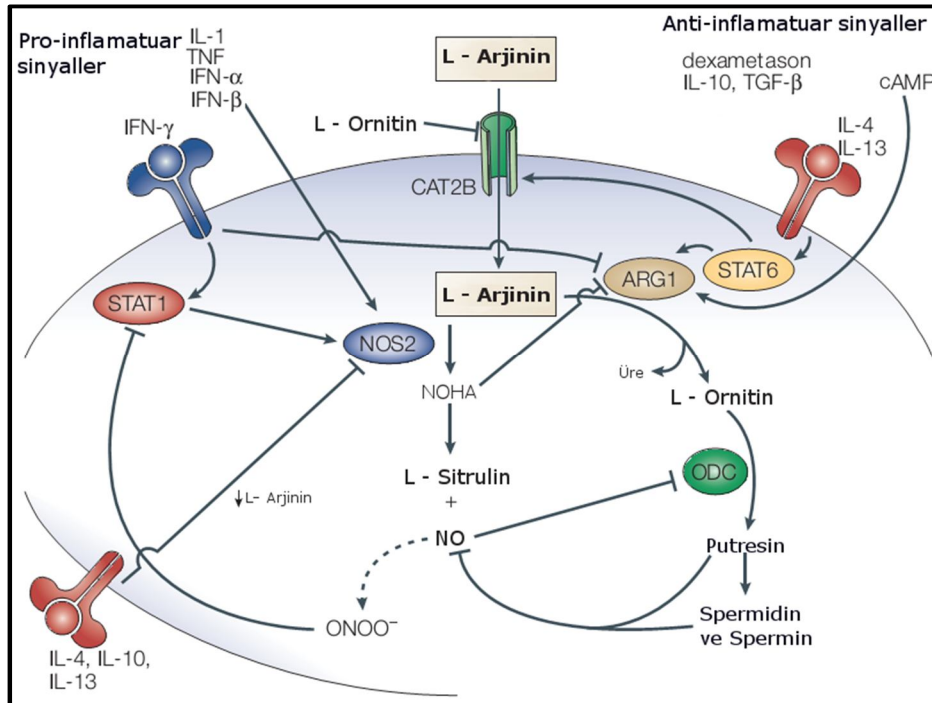
Arjinazın tetiklediği tepkimenin üre ve ornitin olmak üzere iki ürünü vardır. Arjininden oluşan ornitin, akut inflamasyona cevap olarak ve hücre proliferasyonunu sağlamak üzere poliaminler dönüşür. Poliaminler (putresin, spermin ve spermidin) tüm memeli hücrelerinde bulunur. Hücre proliferasyonunun arttığı fizyolojik ve patolojik durumlarda, poliamin düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir. Poliaminlerin, DNA ve RNA sentezi ile DNA'nın stabilizasyonunda uyarıcı etki göstermelerine paralel olarak, habis olaylarda artan hücre yapımı nedeniyle hücre içi poliamin metabolizmasının arttığı bildirilmiştir (52).

İnflamatuar koşullar altında, çeşitli hücre ve dokularda makrofaj kaynaklı arjinaz aktivitesinin, inflamasyon ve enfeksiyonda, konak dokuların iyileşmesinde yalnızca NO sentezi için substrat olarak arjinini uzaklaştırarak değil, ayrıca, kollajen sentezi için gerekli olan prolinin sentezi için ornitin meydana getirerek bir rol oynadığı yönünde görüş bildiren çalışmalar mevcuttur (190).

Arjinin metabolizmasının immün sistemdeki yerini araştıran çalışmaların büyük çoğunluğu makrofajlardaki olayları incelese de arjinin metabolize edici enzimlerin

nötrofiller ve T hücreleri gibi diğer hücre tiplerinde de olduğu bilinmektedir. Dinlenme durumunda makrofaj kaynaklı arjinin tüketimi minimal düzeyde iken, yalnızca aktive olduktan sonra KAT'lar tarafından makrofajlara arjinin girişi olmaktadır. Fare RAW264.7 ve J 277.4 hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda sitokin uyarımı sonucu KAT2B taşıyıcı gen ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu taşıyıcının ekspresyonunun iNOS tarafından NO üretimi ve arjinaz I tarafından arjinin tüketimi için esansiyel olduğu bilinmektedir (130). Sitokin ve diğer uyarılar tarafından makrofajlarda iNOS ve arjinaz I/II ekspresyonunun tespit edildiği fakat uyarıların iNOS veya arjinaz I'i farklı şekilde indüklediği bulunmuştur (18).

T – helper I sitokinleri; IL-1, TNF- α , IFN γ iNOS'u indüklerken, T – helper II sitokinleri; IL-4, IL-10, IL-13 arjinaz aktivitesini indükler. Th-1 sitokinleri şiddetli enfeksiyon ve sepsis gibi durumlarda hücrel immün cevapta rol oynarlar iken, Th-2 sitokinleri inflammatuar cevabı baskımlarken antikor üretimini destekler (humoral cevap) (Şekil 20) (18).



Şekil 20. İndüklenebilir Arjinaz I (ArgI) ve iNOS (NOS2) enzimlerinin sitokin – bağımlı ve metabolik düzenleyici çevrimi (26 no.lu referanstan *modifiye edilmiştir*)

iNOS ve arjinaz II'nin LPS ile uyarılmış RAW 264.7 makrofajlarında birlikte indüklendikleri fakat LPS ile uyarıldıktan sonra sıçan peritoneal makrofajlarında ve *in vivo* sıçan akciğerlerinde arjinaz I'in iNOS ile birlikte indüklendiği tespit edilmiştir. LPS – ile aktive edilmiş fare peritoneal makrofajlarında ise en az iNOS kadar hem arjinaz I'in hem de arjinaz II'nin indüklendiği fakat arjinaz II'nin erken, arjinaz I'in ise daha geç aşamada uyarıldığı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (124, 126, 158).

Son yıllarda yapılan çalışmalar arjinaz salınımının ve L – arjinin tüketiminin memeli immün sisteminde güçlü bir immün supresif etki meydana getirdiğini vurgulamaktadır (26). Ochoa ve ark arjinin eksikliğinin T lenfosit fonksiyonu üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, T hücre reseptörünün önemli bir bileşeni olan zeta (ζ) zincirinin arjinin eksiliğine bağlı olarak fonksiyon kaybına uğradığı ve bunun da T hücre fonksiyonlarında bozulmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir (154).

Nitrik Oksit (NO•)

Nitrik oksit (NO•) çift atomlu, nitrik oksit sentaz ailesi enzimleri tarafından arjininin oksidasyonu ile salıverilen bir mediyatördür. NO• *in vivo* son derece geniş ve kompleks fonksiyonlara sahiptir. Yüksüz ve küçük bir molekül olduğu için hücre membranlarını geçerek otokrin ve parakrin etkiler gösterir. Serbest radikal türlerine göre nispeten daha uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir (5-15 sn) ve sentez edildiği bölgeden 300 µm'lik alana kadar aktif kalabildiği düşünülmektedir (108). İlk kez vasküler relaksasyonunu sağlayıcı endotelial faktör olarak keşfedilmiş (136), günümüzde ise sistemik vazomotor tonusun dolayısıyla kan basıncının düzenlenmesinde çok önemli bir regülatör olarak bilinmektedir (142). NO• aynı zamanda trombosit adezyonunu ve agregasyonunu inhibe eder ve renin salınımı ve sodyum atılımını artırarak damar içi hacmin kontrolünü sağlar. Damar dışında nörotransmitter olarak birçok organ sisteminin fonksiyonunu etkiler. Periferde bronşial ve gastrointestinal düz kas gevşemesi ve penil ereksiyondan sorumlu non-adrenerjik, non-kolinerjik (NANC) nörotransmitter olarak işlev yapar. Santral sinir sisteminde davranış, öğrenme ve ağrı algısını etkileyici bir nöromodülatör olarak davranır. NO• inflamasyonda çok yönlü bir rol üstlenir ve lökosit – aracılı mikrobiyal öldürme için gereklidir. Bu aktivite spektrumu bağlamında NO•'in aşırı veya az üretilmesinin hastalık patogenezinin sebebi

veya sonucu olabileceği beklenen bir durumdur. L – Arjinin - NO• sistemi dikkate değer bir şekilde sepsis ilişkili hipotansiyon, esansiyel hipertansiyon, ateroskleroz, iskemik stroke ve bazı nörodejeneratif hastalıklarda terapötik hedef olarak üzerinde yoğunlaşılacak bir çalışma alanı oluşturmaktadır (123).

NO•'e cevaben çözünebilir guanilat siklaz (sGC) aktivitesiyle siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretiminde artış meydana gelir. cGMP hücre içinde birçok efektör molekül üzerinde etki gösterir ve bu moleküllerin büyük çoğunluğu, hücre içi Ca⁺² iyon konsantrasyonunda değişikliğe yol açabilen ve/veya hücrenin kalsiyuma cevabını etkileyen iyon kanalları, fosfodiesterazlar ve protein kinazlardır (123). Bununla birlikte hücre solunum ve protein ekspresyonunu etkileyen mitokondriyal enzimler ve nükleer transkripsiyon faktörlerini de doğrudan inhibe edebilir.

NO•'in *in vivo* biyoyararlanımı nitrit (NO²⁻)/nitrat (NO³⁻) oksidasyonu, oksihemoglobin ile reaksiyonu, serbest veya proteinlerin tiol gruplarıyla etkileşimi ve süperoksit radikali (O₂•⁻) ile sınırlandırılır. Sonucu etkileşim O₂•⁻ aracılı sitotoksiteyi inhibe eder fakat bu durum aşırı miktarda peroksinitrit (ONOO⁻) molekülü üretimine yol açar (80).

İnflamasyon ve Sepsiste Nitrik Oksit

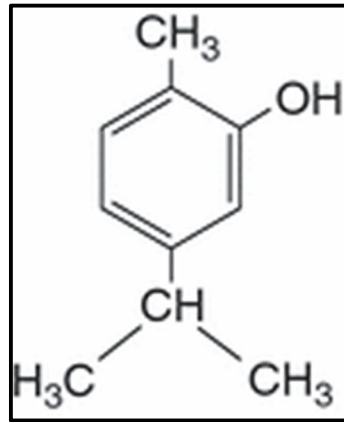
Nitrik oksidin akut ve kronik inflamasyon, sistemik inflamatuvar yanıt ve sepsiste rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma vardır. Nitrik oksit vazodilatasyonu artırır, ödem oluşturur ve hassas sinir uçlarını etkiler. Tüm bu etkiler inflamatuvar yanıtın önemli göstergelerindedir. Glukokortikoid ve NOS inhibitörleri ile yapılan tedaviler inflamasyonun şiddetinin azaltılmasında etkili olmaktadır. Bakteriyel endotoksinler iNOS'u uyarır ve kardiyomiyositlerde, endokardiyumda ve düz kas hücrelerinde NO• sentezini artırarak venlerde kan birikmesine ve kardiyak fonksiyonların bozulmasına (sepsise bağlı dilate kardiyomyopati) yol açar.

Hayvan modelinde yapılan bir çalışmada, NOS aktivitesinin engellenmesi, uygulamanın dozuna bağlı olarak farklı sonuçlar vermiştir. Bir NOS inhibitörü olan L-nitro monometil arjinin 30 mg/kg dozunda uygulandığında endotoksik şok engellenirken, 300 mg/kg düzeyindeki uygulama bulguları şiddetlendirmiştir. Nitrik

oksidin inflamasyon ve endotoksemideki etkinliği ile ilgili birçok çalışmada genellikle non-selektif NOS inhibitörleri kullanılmıştır. Bu durum, NO• hem dokuda lokal hem de sistemik olarak bazı etkiler gösterdiğinden, kesin bir yorum yapılmasını engellemiştir. Bu nedenle çalışmalarda selektif NO• inhibitörlerinin kullanılması ve hatta bunların da sistemik değil lokal olarak ilgili yere uygulanması önerilmiştir. NO•'nun etkileri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu araştırmaların bazılarında NO• inhibisyonu dokularda fonksiyon bozukluğu ve hasara neden olurken, bir kısmında da yararlı etkiler göstermiştir (103, 107).

2.2. Karvakrol

Karvakrol kimyasal formülü $(CH_3)_2CHC_6H_3(CH_3)OH$, moleküler ağırlığı 150,22 g/mol, yoğunluğu $0,9772 \text{ g/cm}^3$ (20°C 'de), erime noktası 1°C , kaynama noktası $237,7^\circ\text{C}$, IUPAC adlandırması "2-methyl-5-propan-2-yl-phenol" olan, uçucu yağ bileşiği fenolik bir monoterpendir (şekil 21) (79).



şekil 21. Karvakrolün kimyasal yapısı (13)

Origanum türleri başta olmak üzere (*Origanum onites* [40, 157], *Origanum vulgare* [53,95], *Origanum compactum* [23], *Origanum dictamnus* [112], *Origanum microphyllum* [10], *Origanum scabrum* [10],), *Satureja* (51), *Thymus* (159), *Thymbra* (24), *Plectranthus* (117), *Lippia* (167), *Arnica* (172) ve *Lavandula* (135) vb. bitkilerin uçucu yağları, % 85'e varan farklı miktarlarda karvakol içerir.

Karvakrol anti-mikrobiyal, anti-fungal, anti-tümör, anti-mutajenik, hücre koruyucu, asetilkolin esteraz inhibisyonu, anti-trombosit aktivitesi, analjezik, anti-inflamatuar, anti-anjiojenik, anti-oksidan ve anti – elastaz aktivilerine sahiptir (19).

Karvakrol mutajenik çalışmalarda zayıf bir aktivite gösterir. Sadece; karvakrolün akut toksisitesi ile ilgili olarak gavajla verilen 1,5 mM/kg'lık tek doz, karaciğer bifenil-4 hidrolaz üretiminde hafif bir artışa yol açmıştır. Karvakrol DNA üzerinde nükleer fragmentasyona sebep olmasına rağmen, karvakrolün genotoksik potansiyeli çok zayıftır. Erkek albino sıçanlarda gavajla 1 mM/kg doz uygulanan karvakrol, değişmeden ya da glukoronid ve sülfat konjugatları şeklinde atılır. Tam anlamıyla oksidasyon, başlıca metil (-CH₃) gruplarında ortaya çıkar. Metil gruplarının karboksilik asitlere dönüşmesiyle benzil alkol ve 2-fenil propano türevleri artar. Halka hidroksilasyonu önemsiz bir metabolit üretir (46).

Akut ve kronik karvakrol toksikolojisi ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. FDA tarafından yiyeceklerde kimyasal tatlandırıcı olarak B kategorisinde, meşrubatlara 2 ppm, şekerlemelere 25 ppm oranında kullanımına izin verilmiştir (46).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya ABD Deneysel Hayvanları Laboratuvarı ve ESOĞÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Deneysel Hayvanları

Deneysel aşamalarda kullanılmak üzere dişi, *Sprague-Dawley* cinsi, 200-300 gr ağırlığında albino sıçanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi (TICAM)'den sağlanmıştır. Bu çalışma için ESOĞÜ Hayvan Deneysel Yerel Etik Komite Raporu alınmıştır (266-2/2012).

Deneysel hayvanları ağırlıklarına göre 6-8 adet sıçan bir grupta olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Gruplara ayrılan sıçanlar yeni ortamlarına uyum sağlamaları açısından 1 hafta deney öncesi bekletildi. Deney öncesi ve deneysel aşamalarda sıçanlar 12 saat aydınlık-karanlık periyodu altında, optimum oda sıcaklığında (25 ± 1 °C) bakıldı ve *ad libitum* standart sıçan yemi ve su verildi.

3.1.2. Deneysel Kullanılan Sarf Malzemeler

- 1 ml, 10 ml steril enjektör
- 1,1,3,3-Tetraetoksipropan (T9889 Aldrich)
- 10 – 1000 µL hacim aralıklı pipet uçları
- 2,5 – 50 mL hacim aralıklı pipetör uçları
- Absolü etanol (Riedel de Haen, Germany)
- Bistüri ucu
- Blok kaseti çelik kapağı (Isolab, Germany)
- Butil hidroksitoluen (W218405 Aldrich)
- Cam kalemi
- Dimetilsülfoksit; DMSO, D8418 Sigma)
- Doku blok kaseti (Isolab, Germany)

- Düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plate'i (Guangzhou Jet Bio-Filtration Products Co., Ltd)
- Eldiven: (Non-Steril Ameliyat Eldiveni, 7.5 Numara)
- Endotoksin (*Lipopolisakkarit Escherichia coli 0128:B12*, Sigma)
- Eppendorf tüp (1.5 ml)
- IL-6 ELISA Kit (KRC0061 İnvitrogen)
- Kafeik Asit (Sigma)
- Karvakrol (Anadolu Üniv. Ecz. Fak. Eskişehir)
- Kurutma kağıdı, 40x40 cm (Isolab, Germany)
- L – Arjinin (A5006, Sigma-Aldrich)
- Lipoksijenaz İnhibitör Assay Kit (760700 Cayman Chemical)
- N-1-Naftiletilediamin dihidroklorür (NED, 33461 Fluka)
- No 6 Çelik Gavaj Tüpü (Harvard Apparatus, Massachusetts)
- o-Dianisidine dihydrochloride (D3252 Sigma-Aldrich)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye)
- Sodyum nitrit (S2252, Sigma)
- Sülfanilamit (SA, S9251 Sigma-Aldrich)
- TNF- α ELISA Kit (KRC3011 İnvitrogen)
- Trizma – HCl (T3253 Sigma)
- α -Izonitrosopropiofenon (I3502 Aldrich)

3.1.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar

- BioTek ELx50 mikro plate yıkayıcı
- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin Dondurucu, -80°C (Thermo, ULT 1386-5-V40)
- Disposable mikrotom bıçağı Low profil (Thermo Shandon, USA)
- Distile su cihazı
- Eppendorf EDOS elektronik pipetleyici (Eppendorf EDOS 5222)
- Etüv (Binder)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Mikroplatt okuyucu (Perkin Elmer 2030 Multilabel reader, Victor X3)

- Santrifüj (Nüve NF800)
- Santrifüj, soğutmalı (Jouan MR22)
- Shaker (WiseMax)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)
- Su banyosu (Nüve BM402)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Her bir grupta vücut ağırlıklarına göre 6-8 adet sıçan olacak şekilde 7 grupta deneysel çalışma yapıldı. Çalışmada kullanılmak üzere karvakrol Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Karvakrol ve kafeik asit %5'lik Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde süspansiyon edilerek intragastrik gavajla hayvanlara verildi. En yüksek karvakrol dozu vücut ağırlığına göre belirlenen LD₅₀ dozunun (810 mg/kg) onda biri olacak şekilde 80 mg/kg olarak belirlendi (13).

Sağlıklı Kontrol Grubu: Bu grupta yer alan sıçanlara herhangi bir yem ve su kısıtlaması olmaksızın toplam 7 gün boyunca herhangi bir işlem uygulanmayıp sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi (n=7).

SHAM grubu: Enjeksiyonun uygulanması esnasında oluşan stres ve çözücü maddelerin bazı biyokimyasal parametrelerin değişimine yol açabileceği düşüncesiyle, sham kontrol grubundaki hayvanlara da aynı stresi oluşturmak amacıyla, 7.gün steril serum fizyolojik periton-ichi (i.p.) (1 ml/kg) ve karvakrol çözücü madde (% 5 DMSO) oral yolla 6 gün boyunca verildi (n=7).

Karvakrol Grubu I (20 CVL+LPS): Bu grupta yer alan sıçanlara 6 gün boyunca, günde bir kez, sabah saatlerinde ve her gün aynı saatte olacak şekilde 20 mg/kg dozda karvakrol gavaj yoluyla verildi (12) (n=6).

Karvakrol Grubu II (40 CVL+LPS): Bu grupta yer alan sıçanlara 6 gün boyunca, günde bir kez, sabah saatlerinde ve her gün aynı saatte olacak şekilde 40 mg/kg dozda karvakrol gavaj yoluyla verildi (12) (n=8).

Karvakrol Grubu III (80 CVL+LPS): Bu grupta yer alan sıçanlara 6 gün boyunca, günde bir kez, sabah saatlerinde ve her gün aynı saatte olacak şekilde 80 mg/kg dozda karvakrol gavaj yoluyla verildi (12) (n=7).

Kafeik Asit Grubu (50 CA+LPS): Lipoksijenaz potent inhibitörü olarak deneyde karvakrolle karşılaştırma amacıyla kullanıldı. Bu grupta yer alan sıçanlara 6 gün boyunca 50 mg/kg gavaj yoluyla verildi (88, 111) (n=7).

Sepsis Grubu (LPS): Bu grupta yer alan sıçanlara herhangi bir yem ve su kısıtlaması olmaksızın toplam 6 gün boyunca herhangi bir işlem uygulanmayacak olup uygulamanın 7. günü sabahında tek doz 1 mg/kg LPS (*Escherichia coli 0128:B12*) (168) ile sepsis oluşumu sağlandı (n=8).

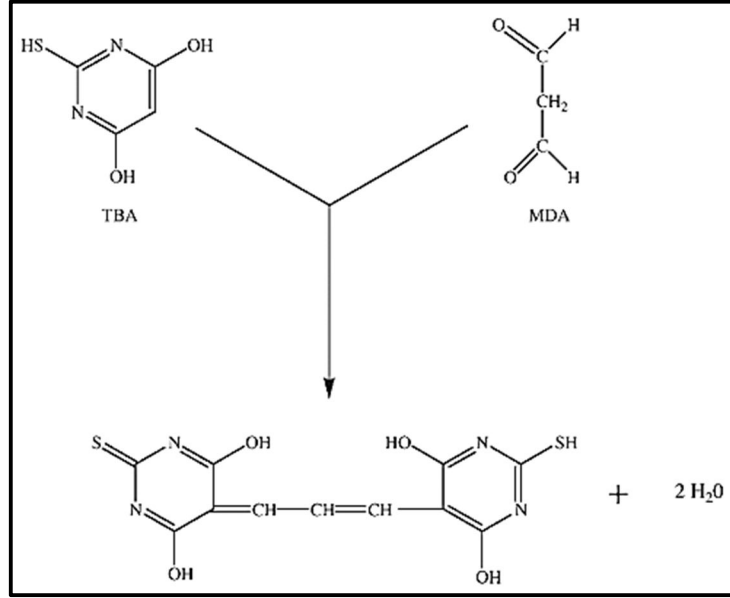
Kafeik asit ve karvakrol gruplarında yer alan sıçanlara 6. gün sabahında karvakrol ve kafeik asit alımı yapıldıktan sonra 7. gün gavaj işlemi uygulanmadı ve LPS ile sepsis oluşumu için i.p. enjeksiyon yapıldı (Sağlıklı, SHAM kontrol grupları hariç). LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra (8. gün) tüm gruplardaki hayvanlar (71), ketamin (80 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) periton içi (i.p.) anestezisi altında sakrifiye edilerek, karaciğer dokuları alındı. Histolojik incelemeler için karaciğer örneklerinin bir kısmı %10'luk formaldehitte tespit edildi.

Anestezi altında tüm deneklerden uygun separatör jelli tüplere, intrakardiyak kan alımı gerçekleştirildi. Serum örnekleri 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ikiye ayrılarak parametrelerin analizi yapılana kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edildi.

3.2.2. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Tiobarbitürik asit (TBA) ölçümü biyolojik örneklerdeki aldehit bileşiklerinin lipid peroksidasyonlarını kantitatif olarak belirlemek için geliştirilmiştir. Malondialdehit (MDA) vücut sıvılarında veya hücrelerde lipid peroksidasyonu açısından oksidatif stres göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Malondialdehit lipid peroksidasyonunun olduğu kadar araşidonat döngüsünün de bir yan ürünüdür. TBA yöntemi ile kantitatif miktarlarda belirlenebilir. TBA ve MDA yüksek sıcaklık ve asidik ortamlarda kromojenik/ floresans ürün meydana getiren schiff baz formunda tepkimeye girer ve bu

son ürün (lipit peroksidasyon ürünü) çeşitli analitik tekniklerle kolay bir şekilde ölçülebilir (Şekil 22) (75).



Şekil 22. TBA – MDA bileşiği oluşturan TBA ile MDA arasındaki kimyasal tepkime (75)

Malondialdehit Ölçüm Materyalleri

MDA ölçümü Williamson ve ark tarafından bildirilen yöntemle çalışılmıştır (75).

1. TBA reaktifleri:

- ❖ 0,25 N HCl,
- ❖ % 15 trikloroasetik asit (TCA),
- ❖ 2,5 mM butil hidroksitoluen (BHT),
- ❖ 100 mM butil hidroksitoluen (BHT)
- ❖ % 0,375 2- tiobarbitürik asit (TBA),
- ❖ % 8,1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) şeklinde hazırlandı.

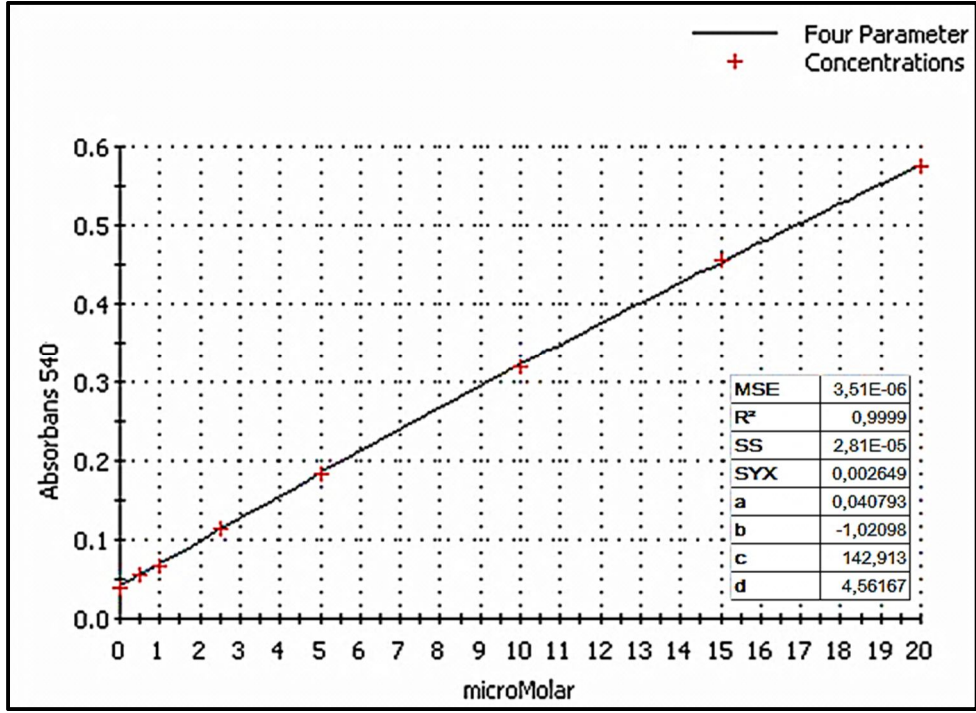
2. Standart:

- ❖ MDA standardı veya 1,1,3,3-tetraetoksipropan 10 mM konsantrasyonda stok standart olarak hazırlandı. Seri dilüsyonlar

deney sırasında hazırlanarak örnekteki MDA miktarı standart grafiği üzerinden değerlendirildi.

Malondialdehit Ölçüm Yöntemi

1. Tüm örneklerden 0,500 ml alınarak boş tüplere aktarıldı.
2. Her bir örneğin/standartın üzerine sırasıyla 250 µL % 15 TCA, 250 µL 0,25 N HCL, 250 µL 2,5 mM BHT, 250 µL % 0,375 TBA ve 100 µL % 8,1 SDS eklendi.
3. Her bir örnek yaklaşık 1 dakika boyunca ve mümkün olduğu kadar ışık maruziyetinden koruyarak iyice vortekslendi.
4. Tüm örnekler 37°C'de 30 dakika inkübe edildi ve 0,005 mL 100 mM BHT eklendi.
5. Tüpler 95°C'de 60 dakika inkübe edildi. Isıtma işleminden sonra tüpler buz üzerine konularak örnekler soğutuldu ve böylece reaksiyonunun durması sağlandı.
6. Kırmızımsı-pembe renk gelişimi TBA-MDA kompleksinin oluştuğu gösterir.
7. Daha sonra örnekler ortam sıcaklığında 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Santrifüj işleminden sonra tüm örnek tüplerinden 200 µL alınıp 96 – kuyucuklu plate'e aktarılarak 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu.
9. Standart seri dilüsyon konsantrasyonlarına (20 – 15 – 10 – 5 – 2,5 – 1,0 – 0,5 – 0 µM) karşı çizilen absorbans grafiği üzerinden numunelerin değerleri µM [MDA] olarak hesaplandı (Şekil 23).



Şekil 23. Standart [MDA] grafiği (Grafik *VICTOR™ X3*, *PerkinElmer Inc., USA*, Plate Okuyucuda, *WorkOut 2.5*, *DAZDAQ LTD, England*, programında çizilmiştir).

3.2.3. Tümör Nekroz faktörü – α (TNF- α) Düzeylerinin Ölçümü

Serum TNF- α düzeyleri Invitrogen Rat TNF- α (KRC3011, Invitrogen Corporation, USA) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü. Kitin ölçüm – içi kesinlik değeri (intra-assay % CV) % 5,8 ve ölçümler arası kesinlik değeri (inter-assay % CV) % 8,2'dir.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi

Invitrogen TNF- α kiti solid faz sandviç Enzim Bağlı İmmün Ölçüm (ELISA) prensibine dayanır. Rat TNF- α molekülüne spesifik monoklonal antikorlar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplanmıştır.

İlk inkübasyonda, bilinen konsantrasyondaki TNF- α standartları, kontroller ve bilinmeyen örnekler kuyucuklara pipetlenir. Yıkamadan sonra biyotin ile konjuge edilmiş ikincil antikorlar eklenir. Tekrar yıkama işleminden sonra streptavidin ile

konjuge peroksidaz enzimi eklenir. Üçüncü inkübasyondan sonra bağlanmayan enzimler yıkama işlemiyle ekarte edilir. Substrat solüsyonu ilave edilerek bağlı enzimlerin reaksiyonuyla renk değişimi gözlenir. Renk şiddeti TNF- α konsantrasyonu ile orantılı olarak değişim gösterir.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Materyalleri

1. Rat TNF- α Standartları

- ❖ Kit içeriğinde 2 adet liyofilize şişe halinde bulunmaktadır.

2. Standart Dilüsyon Tamponu

- ❖ % 0,1 Sodyum azid içerisinde 25 ml'lik 1 adet şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur

3. İnkübasyon Tamponu

- ❖ 12 ml'lik 1 adet şişe içerisinde kit içeriğinde mevcuttur.

4. Yüksek ve Düşük Konsantrasyon Rat TNF- α Kontrolleri

- ❖ % 0,1 sodyum azid içerisinde liyofilize halde 2 şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur.

5. Rat TNF- α Biotin Konjugatı

- ❖ % 0,1 Sodyum azid içerisinde 11 ml'lik 1 adet şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur.

6. Streptavidin – HRP (100X)

- ❖ 3,3 mM Timol içerisinde 0,125 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

7. Streptavidin – HRP Dilüent

- ❖ 3,3 mM timol içerisinde 25 ml'lik şişede 1 adet kit içeriğinde mevcuttur.

8. Konsantr Yıkama Tamponu (25X)

- ❖ 100 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

9. Stabilize Kromojen, Tetrametil benzidin (TMB)

- ❖ 25 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

10. Stop Solüsyonu

- ❖ 25 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

TNF - α Düzeyleri Ölçüm Metodu

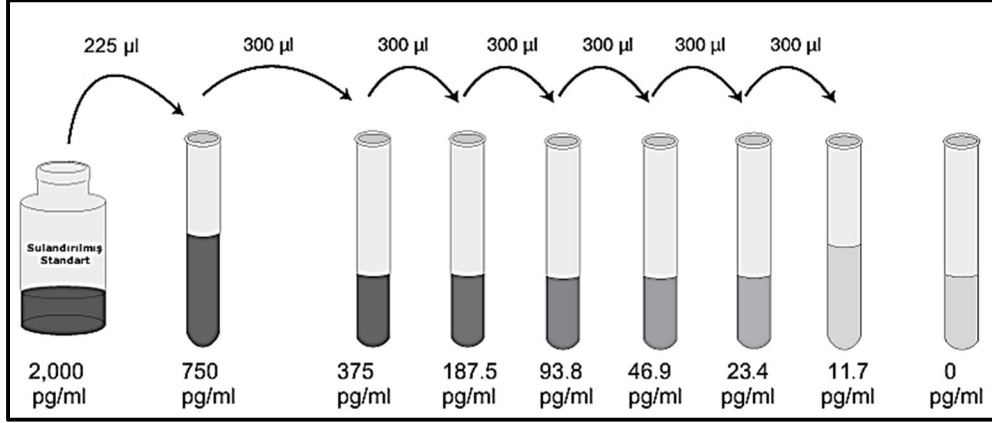
1. Örneklerin Hazırlanması

- Rat serum örnekleri inkübasyon tamponu ile 1:2 oranında dilüe edildi.

2. Standartların Dilüsyonu

- Liyofilize haldeki standart şişesi etiketi üzerinde belirtilen miktar standart dilüent tamponu eklenerek çözünmesi sağlandı. Bu şekilde hazırlanan çözülmüş standart konsantrasyonu 2000 pg/ml'dir. En az 10 dakika oda ısısında bekletilerek tüm liyofilize partiküllerin çözünmesi sağlandı.
- Sulandırılmış standarttan 225 μ L alınarak içerisinde 375 μ L standart dilüent tamponu bulunan tüpe aktarıldı. Bu şişe içerisindeki standart konsantrasyonu 750 pg/ml olarak belirtildi.
- Altı adet boş tüp üzerine sırasıyla 375 – 187,5 – 93,8 – 46,9 – 23,5 – 11,7 - 0 pg/ml konsantrasyon değerleri yazıldı ve her birine 300 μ L standart dilüent tamponu pipetlendi.

- 750 pg/ml'lik standart tüpünden 300 µL alınarak 375 pg/ml etiketli tüpe aktarıldı ve böylece 1:2 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Diğer tüpler içinde aynı oranda seyreltme yapıldı.



3. Streptavidin – HRP Hazırlanması

- 80 µL stok şişeden alınıp içerisinde 8 mL Streptavidin – HRP dilüenti bulunan şişeye aktarıldı. Böylece 1:100 oranında konsantre çözülden seyreltme yapılmış oldu. Bu çözelti kullanılacağı an taze olarak hazırlanmalıdır.

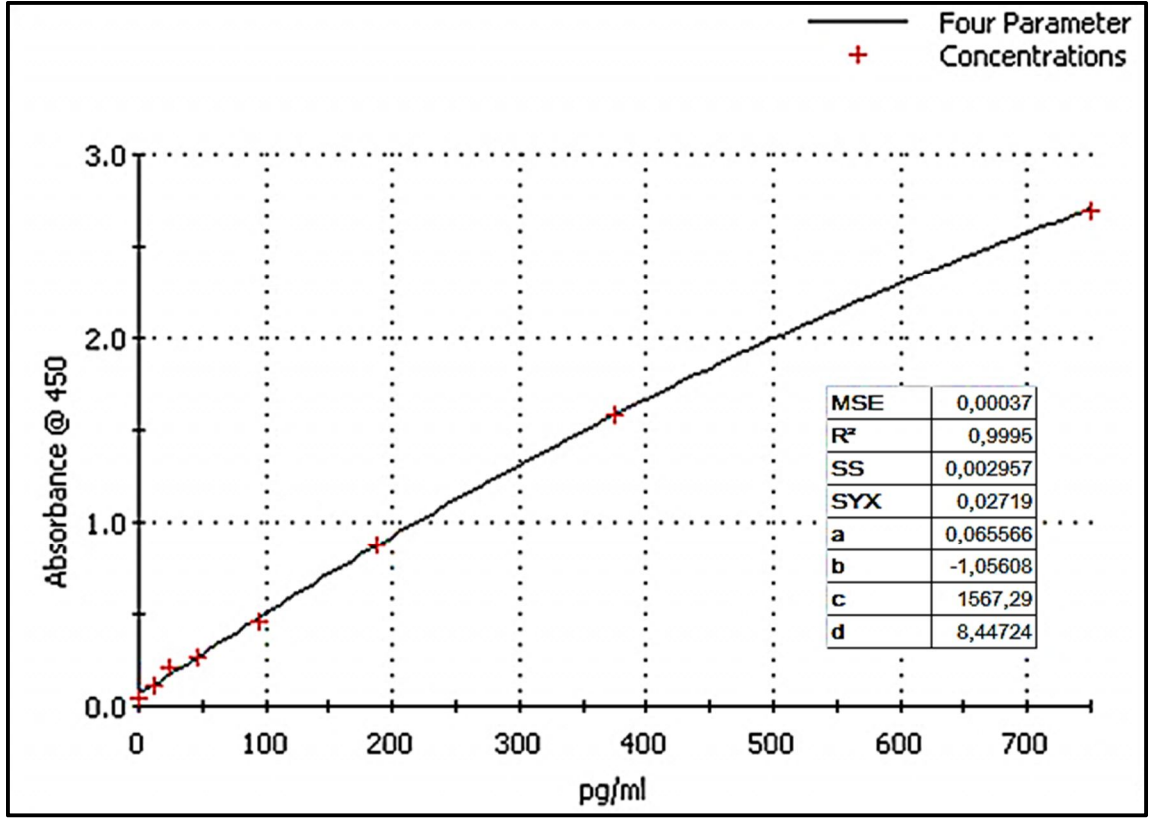
4. Yıkama Tamponunun Seyreltilmesi

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

Ölçüm Prosedürü

1. Çalışmada örnek sayısı kadar kuyucuklu strip plate çerçevesinde hazırlanarak kullanılmayacak fazla stripler tekrar orijinal kabına yerleştirildi.
2. Bir kuyucuk sıfır standart kuyucuğu olarak işaretlenip bu kuyucuğa 100 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.

3. Yerleri belirli tüm kuyucuklara 100 µL standart serileri, örnekler ve kontroller pipetlendi.
4. Plate'in üzeri özel yapışkan bandı ile kapatıldıktan sonra 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Bu aşamada örnek, standart ve kontroller içindeki mevcut TNF-α molekülleri kuyucukların iç duvarına kaplanmış TNF-α antikorları tarafından tutulur.
5. Birinci inkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile 4 kez otomatik plate yıkama cihazında yıkandı.
6. Kuyucuklara 100 µL biyotin konjugatı eklendi ve örnekler üzeri tekrar kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
7. İkinci inkübasyon işlemi sonrası yıkama işlemi 5. basamaktaki işlem tekrarlandı.
8. Tüm kuyucuklara 100 µL Streptavidin – HRP konjugatı eklendikten sonra 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
9. Beşinci basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.
10. Tüm kuyucuklara 100 µL Substrat (tetrametilbenzidin - TMB) eklendi ve karanlık bir ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
11. İnkübasyon işlemi bitiminde tüm kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklendi ve stop öncesi mavi rengin sarı renge değiştiği gözlemlendi. Renk değişimi örnekteki TNF-α konsantrasyonu ile orantılı olarak 450 nm'de absorbans düzeyleriyle belirlendi.
12. Tüm sonuçlar standart seri dilüsyonlarına karşılık çizilen absorbans eğrisi üzerinden hesaplandı (Şekil 24). Örnek sonuçları dilüsyon faktörüyle çarpılarak verildi.



Şekil 24. Standart TNF-a Grafiği (Grafik VICTOR™ X3, PerkinElmer Inc., USA, Plate Okuyucuda, WorkOut 2.5, DAZDAQ LTD, England, programında çizilmiştir).

3.2.4. İnterlökin – 6 (IL-6) Düzeylerinin Ölçümü

Serum IL-6 düzeyleri Invitrogen Rat IL-6 (KRC0061, Invitrogen Corporation, USA) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü. Kitin ölçüm – içi kesinlik değeri (intra-assay % CV) % 4,0 ve ölçümler arası kesinlik değeri (inter-assay % CV) % 6,9'dur.

İnterlökin – 6 Düzeyleri Ölçüm Metodu Prensibi

Invitrogen IL-6 kiti solid faz sandviç Enzim Bağlı İmmün Ölçüm (ELISA) prensibine dayanır. Rat IL-6 molekülüne spesifik monoklonal antikorlar strip halindeki 8'li kuyucuklara kaplanmıştır.

İlk inkübasyonda, bilinen konsantrasyondaki IL-6 standartları, kontroller ve bilinmeyen örnekler kuyucuklara pipetlenir. Yıkamadan sonra biyotin ile konjuge edilmiş ikincil antikorlar eklenir. Tekrar yıkama işleminden sonra streptavidin ile

konjuge peroksidaz enzimi eklenir. Üçüncü inkübasyondan sonra bağlanmayan enzimler yıkama işlemiyle ekarte edilir. Substrat solüsyonu ilave edilerek bağlı enzimlerin reaksiyonuyla renk değişimi gözlenir. Renk şiddeti IL-6 konsantrasyonu ile orantılı olarak değişim gösterir.

İnterlökin – 6 Düzeyleri Ölçüm Materyalleri

1. Rat İnterlökin – 6 Standartları

- ❖ Kit içeriğinde 2 adet liyofilize şişe halinde bulunmaktadır.

2. Standart Dilüsyon Tamponu

- ❖ % 0,1 Sodyum azid içerisinde 25 ml'lik 1 adet şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur

3. İnkübasyon Tamponu

- ❖ % 0,05 Sodyum azid içerisinde 12 ml'lik 1 adet şişe içerisinde kit içeriğinde mevcuttur.

4. Yüksek ve Düşük Konsantrasyon Rat IL-6 Kontrolleri

- ❖ % 0,1 sodyum azid içerisinde liyofilize halde 2 şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur.

5. Rat IL-6 Biotin Konjugatı

- ❖ % 0,1 Sodyum azid içerisinde 11 ml'lik 1 adet şişe halinde kit içeriğinde mevcuttur.

6. Streptavidin – HRP (100X)

- ❖ 3,3 mM Timol içerisinde 0,125 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

7. Streptavidin – HRP Dilüent

- ❖ 3,3 mM timol içerisinde 25 ml'lik şişede 1 adet kit içeriğinde mevcuttur.

8. Konsantr Yıkama Tamponu (25X)

- ❖ 100 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

9. Stabilize Kromojen, Tetrametil benzidin (TMB)

- ❖ 25 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

10. Stop Solüsyonu

- ❖ 25 ml'lik 1 adet şişede kit içeriğinde mevcuttur.

İnterlökin – 6 Düzeyleri Ölçüm Metodu

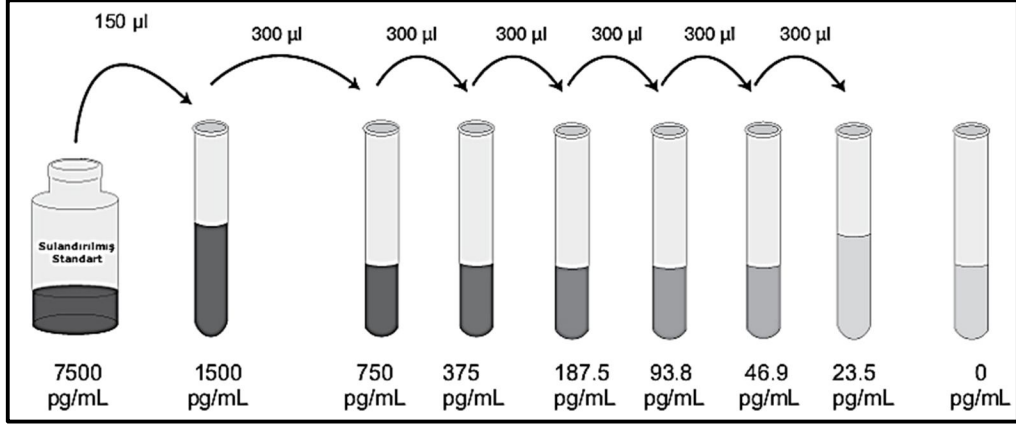
1. Örneklerin Hazırlanması

- Rat serum örnekleri Standart dilüsyon tamponu ile 1:2 oranında dilüe edildi

2. Standartların Dilüsyonu

- Liyofilize haldeki standart şişesi etiketi üzerinde belirtilen miktar standart dilüent tamponu eklenerek çözünmesi sağlandı. Bu şekilde hazırlanan çözülmüş standart konsantrasyonu 7500 pg/ml'dir.
- Sulandırılmış standarttan 150 µL alınarak içerisinde 600 µL standart dilüent tamponu bulunan tüpe aktarıldı. Bu şişe içerisindeki standart konsantrasyonu 1500 pg/ml olarak belirtildi.
- Altı adet boş tüp üzerine sırasıyla 750 – 375 – 187,5 – 93,8 – 46,9 – 23,5 – 0 pg/ml konsantrasyon değerleri yazıldı ve her birine 300 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.

- 1500 pg/ml'lik standart tüpünden 300 µL alınarak 750 pg/ml etiketli tüpe aktarıldı ve böylece 1:2 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Diğer tüpler içinde aynı oranda seyreltme yapıldı.



3. Streptavidin – HRP Hazırlanması

- 80 µL stok şişeden alınıp içerisinde 8 mL Streptavidin – HRP dilüenti bulunan şişeye aktarıldı. Böylece 1:100 oranında konsantre çözülden seyreltme yapılmış oldu. Bu çözelti kullanılacağı an taze olarak hazırlanmalıdır.

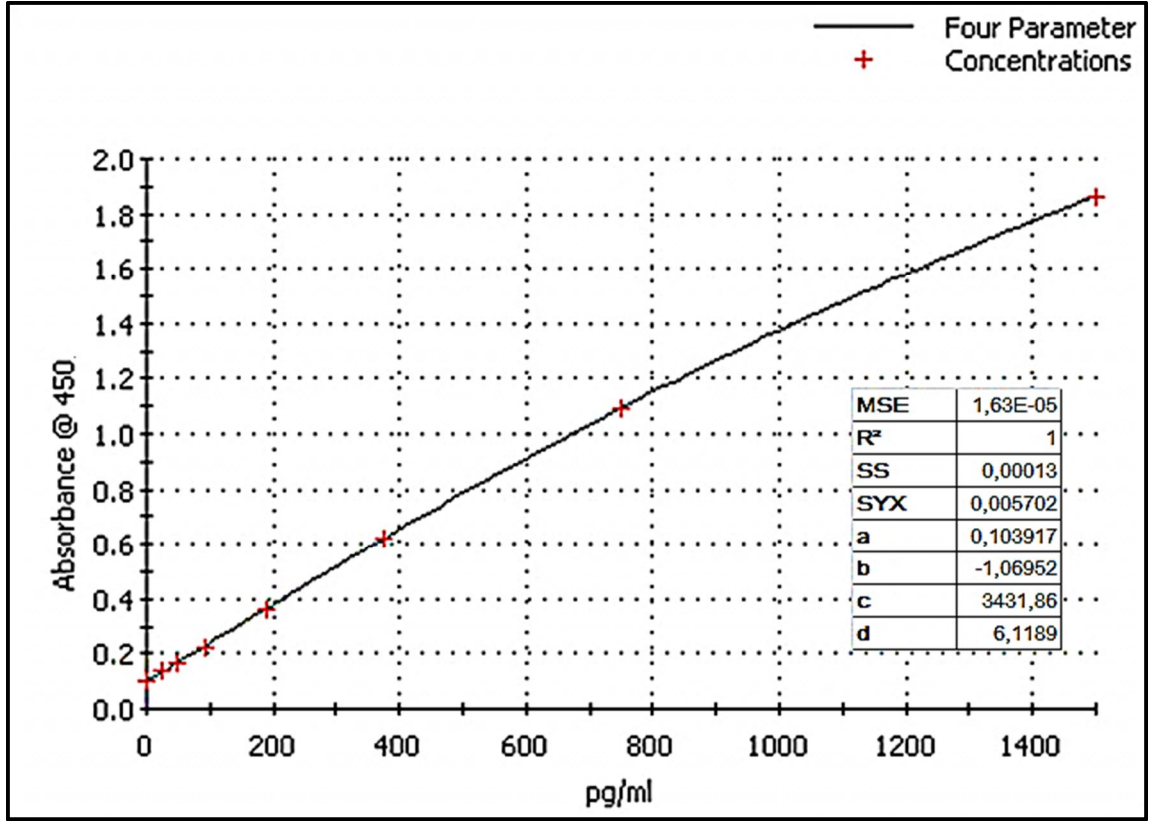
4. Yıkama Tamponunun Seyreltilmesi

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

Ölçüm Prosedürü

1. Çalışmada örnek sayısı kadar kuyucuklu strip plate çerçevesinde hazırlanarak kullanılmayacak fazla stripler tekrar orijinal kabına yerleştirildi.
2. Tüm kuyucuklara 50 µL inkübasyon tamponu pipetlendi.
3. Bir kuyucuk sıfır standart kuyucuğu olarak işaretlenip bu kuyucuğa 100 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.

4. Yerleri belirli tüm kuyucuklara 100 µL standart serileri, örnekler ve kontroller pipetlendi.
5. Plate'in üzeri özel yapışkan bandı ile kapatıldıktan sonra 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Bu aşamada örnek, standart ve kontroller içindeki mevcut IL-6 molekülleri kuyucukların iç duvarına kaplanmış IL-6 antikorları tarafından tutulur.
6. Birinci inkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklar 400 µL yıkama tamponu ile 4 kez otomatik plate yıkama cihazında yıkandı.
7. Kuyucuklara 100 µL biyotin konjugatı eklendi ve örneklerin üzeri tekrar kapatılarak 1 saat 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
8. İkinci inkübasyon işlemi sonrası yıkama işlemi 6. basamaktaki işlem tekrarlandı.
9. Tüm kuyucuklara 100 µL Streptavidin – HRP konjugatı eklendikten sonra 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
10. Altıncı basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.
11. Tüm kuyucuklara 100 µL Substrat (tetrametilbenzidin - TMB) eklendi ve karanlık bir ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. İnkübasyon işlemi bitiminde tüm kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklendi ve stop öncesi mavi rengin sarı renge değiştiği gözlemlendi. Renk değişimi örnekteki IL-6 konsantrasyonu ile orantılı olarak 450 nm'de absorbans düzeyleriyle belirlendi.
13. Tüm sonuçlar standart seri dilüsyonlarına karşılık çizilen absorbans eğrisi üzerinden hesaplandı (Şekil 25). Örnek sonuçları dilüsyon faktörüyle çarpılarak verildi.



Şekil 25. Standart IL-6 Grafiği (Grafik *VICTOR™ X3*, *PerkinElmer Inc., USA*, Plate Okuyucuda, *WorkOut 2.5*, *DAZDAQ LTD, England*, programında çizilmiştir).

3.2.5. Lipoksijenaz (LOX) Aktivitesinin Ölçümü

“Cayman Chemical Company” e ait “Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit” kullanılmıştır (Item No: 760700, Cayman Chemical Company, USA)

Lipoksijenaz (LOX) Aktivitesinin Ölçümü Prensibi

Lipoksijenasyon reaksiyonu ile oluşan hidroperoksitlerin ölçümüne dayanan kolorimetrik yöntemdir. Yağ asitlerinin çeşitli pozisyonlarındaki hidroperoksitlerin tamamına pozisyon ayırt edilmeksizin eşit duyarlılıktadır ve tüm yağ asitleriyle çalışır. Kuyucaklara önce enzim sonra substrat eklenir ve kısa bir süre inkübe edilir. İnkübasyondan sonra eklenen kromojenlerle reaksiyon tamamlanıp absorbanslar okunur.

Lipoksijenaz (LOX) Aktivitesinin Ölçüm Materyalleri

1. Lipoksijenaz İnhibitör Screening Assay Buffer (10X)

- ❖ Konsantre haldeki 3 ml assay buffer 27 ml HPLC derecesinde su ile sulandırıldı. Son hacimde 0,1 M Tris-HCl, pH:7,4 elde edilmiş oldu.

2. Developing Reagent 1

- ❖ Kullanıma hazır olarak kit içerisinde mevcuttur.

3. Developing Reagent 2

- ❖ Kullanıma hazır olarak kit içerisinde mevcuttur.

4. Kromojen

- ❖ Deneyde kullanılacak tüm kuyucuklara 100 µL kromojen olacak şekilde hesaplanarak Developing Reagent 1 ve Reagent 2'den eşit hacimde karıştırılarak oluşturuldu.

5. 15-Lipoksijenaz standardı

- ❖ İçerisinde 990 µL Assay buffer bulunan şişe içerisine 10 µL enzim transfer edildi. Bu çözelti 1 saat içerisinde kullanıldı

6. Araşidonik Asit (Substrat)

- ❖ İçerisinde 25 µL potasyum hidroksit bulunan tüpe 25 µL Substrat ilave edildi ve karıştırıldı. Bu karışım üzerine 950 µL HPLC derecesinde su ilave edilerek son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde ayarlandı.

7. Potasyum hidroksit

- ❖ Kullanıma hazır olarak 0,1 M konsantrasyonda kit içeriğinde mevcuttur.

Lipoksijenaz (LOX) Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi

1. Serum örnekleri çalışma öncesi denemelerle uygun seyreltme oranı tespit edilerek teste tabi tutuldu.
2. Çalışma için ayrılan kuyucuklardan birine 100 µL Assay buffer eklendi ve bu kuyucuk kör olarak tespit edildi.
3. Pozitif kontrol kuyucuğuna 90 µL 15-LOX ve 10 µL assay buffer pipetlendi.
4. Numune kuyucuklarına 90 µL dilüe örnek ve 10 µL assay buffer pipetlendi.
5. Reaksiyonu başlatmak için tüm kuyucuklara 10 µL Substrat (araşidonik asit) pipetlendi. Plate karıştırıcı üzerinde en az 5 dakika süreyle inkübe edildi.
6. Tüm kuyucuklara 100 µL kromojen reaktifi eklenerek reaksiyon durduruldu ve üzeri yapışkan bandıyla kapatılan plate 5 dakika karıştırıcıda bekletildi.
7. Süre sonunda kuyucukların absorbansı 490 nm'de otomatik plate okuyucuda okutuldu.
8. Örneklerdeki lipoksijenaz aktivitesi Ünite olarak verildi ve Ünite tanımı 1 µmol arşidonik asiti dakikada tüketen enzim miktarı olarak tanımlandı.
9. Lipoksijenaz aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Lipoksijenaz Aktivitesi (µmol/dakika/ml) =

$$\frac{A_{490}(\text{örnek}) - A_{490}(\text{kör})}{9,47 \text{ mM}^{-1} \times 5 \text{ dakika}} \times \frac{0,21 \text{ ml}}{0,09 \text{ ml}} \times \text{örnek dilüsyonu}$$

3.2.6. Alanin aminotransferaz (ALT) ve Aspartat aminotransferaz (AST) Aktiviteleri Ölçümü

Karaciğer hasarını saptamak için tipik olarak alanin aminotransferaz (ALT) kan testi kullanılmaktadır. Sıklıkla aspartat aminotransferaz (AST) ile veya karaciğer panelinin bir bölümü olarak veya karaciğer hastalığını taramak veya tanınmasına yardımcı olmak için istenir. ALT, AST'ye göre daha spesifik olmakla birlikte (102) AST ve ALT'nin en önemli testler olduğu düşünülmektedir.

Alanin ve Aspartat aminotransferaz enzim aktiviteleri standardize edilmiş UV – fotometrik ölçüm prensibine dayanan Roche/Hitachi Modular DP (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) cihazında ALT ve AST test kitiyle otomatize çalışılmıştır. Her iki testte de NADH'nın NAD⁺'ye yükseltgenmesi sırasında NADH'nın azalan miktarının fotometrik ölçümü enzim aktiviteleriyle doğru orantılıdır.

3.2.7. Seruloplazmin Oksidaz Aktivitesinin Ölçümü

Seruloplazminin enzimatik oksidaz aktivitesi *o*-dinasidin dihidrokloridin substrat olarak kullanıldığı metotla ölçüldü (163).

Seruloplazmin Oksidaz Aktivitesi Ölçüm Materyalleri

1. Asetat Tampon Solüsyonu, pH: 5

- ❖ 13,6080 gr sodyum asetat trihidrat (CH₃COONa.3H₂O) ve 5,742 ml glasiyal asetik asit yaklaşık 900 ml distile suda karıştırıldı. Son pH kontrolü yapılarak istenilen pH'ya 0,1 M NaOH veya glasiyal asetik asitle getirildi ve 1 lt'ye tamamlandı. Bu çözelti +4°C'de saklanabilir.

2. Sülfürik Asit, 9M

- ❖ 504,989 ml H₂SO₄ 250 ml distile su ile yavaşça karıştırıldı ve son hacim 1 lt'ye tamamlandı.

3. *O*-dianisidin dihidroklorid, 7,88 mM

- ❖ 0,2499 gr *o*-dianisidin dihidroklorid 100 ml distile suda hazırlandı. Bu çözelti koyu renkli şişede 2 – 8 °C’de saklandı.

Seruloplazmin Oksidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

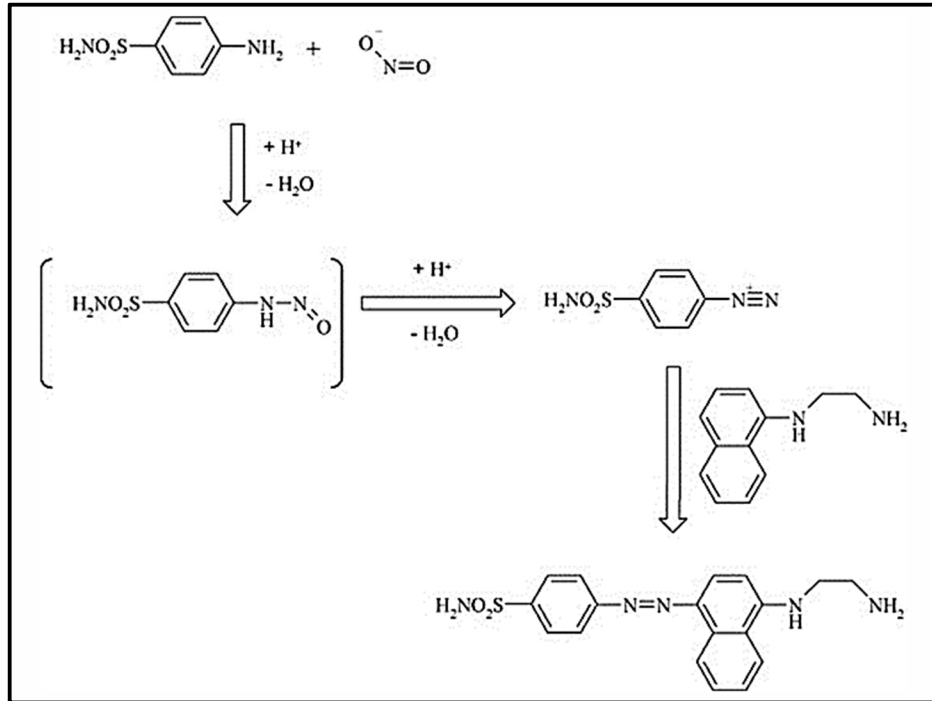
1. Aynı örneğe ait iki adet deney düzeneği hazırlandı ve düzenekteki tüplerin her birine 50 µL numune ve 750 µL asetat tamponu pipetlendi. Örnek düzeneklerinden biri 5. dakika ve diğeri 15. dakika düzeneği olarak işaretlendi.
2. Her iki düzenek te 30°C’de su banyosunda 5 dakika eşit sıcaklığa gelmesi için ön-inkübasyona bırakıldı.
3. Ardından tüm tüplere 200 µL *o*-dianisidine substratı eklendi ve 5. ve 15. dakika tüpleri için zaman ayarlaması yapıldı.
4. 5 dakika sonra 5. dakika tüpleri su banyosunda çıkartılarak üzerine 2 mL 9 M sülfürik asit eklendi. Aynı şekilde tam 15 dakika sonra 15. dakika tüpleri de aynı işleme tabi tutuldu.
5. Asit reaktifi konulduktan sonra reaksiyon ortamı rengi eflatun-kırmızıya döndü ve absorbans şiddeti 540 nm’de distile su körüne karşı okutuldu.
6. Seruloplazmin oksidaz aktivitesi Ünite/litre olarak tanımlandı.
7. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Aktivite (U/litre)} = \text{Absorbans} \times 6.25 \times 10^2$$

3.2.8. Total Nitrit (NO₂⁻) Miktarı Ölçümü

Farklı teknikler temelinde birçok metot nitrik oksidi doğrudan veya dolaylı olarak ölçmektedir. Kemilüminesans, elektrokimyasal ve kütle spektrum analizleri nitrik oksidi doğrudan ölçmekle birlikte oldukça özel ve pahalı yöntemlerdir. Nitrik oksit oksidasyonunun stabil son ürünleri olan nitrit ve nitratın ölçümü dolaylı olarak çeşitli vücut sıvılarında nitrik oksitin belirlenmesini sağlar. Endojen NO üretimi serum, plazma ve idrarda nitrit/nitrat düzeyleriyle yüksek oranda paralellik gösterir (160).

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 (176). Griess reaksiyonu, nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi *in vivo* olarak oluşan NO'nun gerçeğe yakın miktarlarda ölçümüne olanak tanımaktadır (47) (Şekil 26).



Şekil 26. Griess Reaksiyonu (177)

Total Nitrit Ölçüm Materyalleri

Total nitrit miktarı üzerinden nitrik oksit konsantrasyonu ölçümü için Cortas ve ark, Miranda ve ark, tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek çalışılmıştır (39, 121).

1. *Çinko sülfat (.7H₂O), 75 mM*

- ❖ 2,1567 gr ZnSO₄.7H₂O tartılıp dH₂O (distile su) ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. *Sodyum Hidroksit, 55 mM*

- ❖ 0,22 gr NaOH tartılıp dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı

3. *Glisin – NaOH Tamponu; pH:9,7*

- ❖ 15 gr Glisin 2 M NaOH (80 gr) ile pH'sı 9,7'ye ayarlanıp 1 lt'ye tamamlandı

4. *Sülfanilamit, 5 gr*

- ❖ 5 gr Sülfanilamit ısıtılmış 3 M HCl içerisinde çözüldü. Oda ısısında 1 yıl stabildir.

5. *N-(1-naftil) etilendiamin (NED), 50 mg*

- ❖ 50 mg NED suda çözülerek 250 ml'ye tamamlandı. 2 – 8 °C'de yaklaşık 2 ay stabildir.

6. *Bakır (II) Sülfat (.5H₂O), 5 mM*

- ❖ 1,24845 gr CuSO₄.5H₂O bir miktar dH₂O'da çözüldükten sonra 1 lt'ye tamamlandı. Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu için kullanıldı.

7. *Stok Sodyum Nitrit Standardı, 1mM*

- ❖ 0,0069 gr NaNO₂ tartılıp içerisinde 10 mM Sodyum tetraborat bulunan çözeltide 100 ml hazırlandı. Stok halde 9 ay stabildir. Ancak dilüe edildikten sonra 3 gün saklanabilir.

8. *Sodyum Tetraborat (.10H₂O), 10 mM*

- ❖ 3,8137 gr Na₂B₄O₇.10H₂O dH₂O'da çözüldükten sonra 1lt'ye tamamlandı. Stok standardın hazırlanması için kullanıldı.

9. *Sülfürik Asit, 0,1 M*

- ❖ 5,611 mL H₂SO₄ 250 mL dH₂O'ya yavaşça eklendi ve son hacim 1 lt'ye tamamlandı. Kadmiyum granüllerinin saklanması için kullanıldı.

10. *Kadmiyum Granülleri, 2,5 – 3 gr*

- ❖ Nitratın nitrite indirgenmesi amacıyla kullanıldı. Kullanmadan önce aktivasyon işlemi yapıldı. Aktivasyon işlemi takiben 10 dakika içerisinde kullanıldı. Kullanılmayan süre uzadıkça granüllerin hava ile teması artacağından redüksiyon kapasitesi azalır.
- ❖ Granüllerin Aktivasyon İşlemi: Granüller içerisinde depolandığı sülfürik asitten arındırmak için 3 kez dH₂O ile durulandı. Ardından Glisin-NaOH tamponu içerisinde bakır sülfat ile 1-2 dakika granüller karıştırıldı. Bu işlemden sonra granüllerin suyu tekrar süzüldü ve bakır sülfattan arındırmak için 3 kez glisin-NaOH tamponuyla durulandı.

11. *Hidroklorik Asit, 3 M*

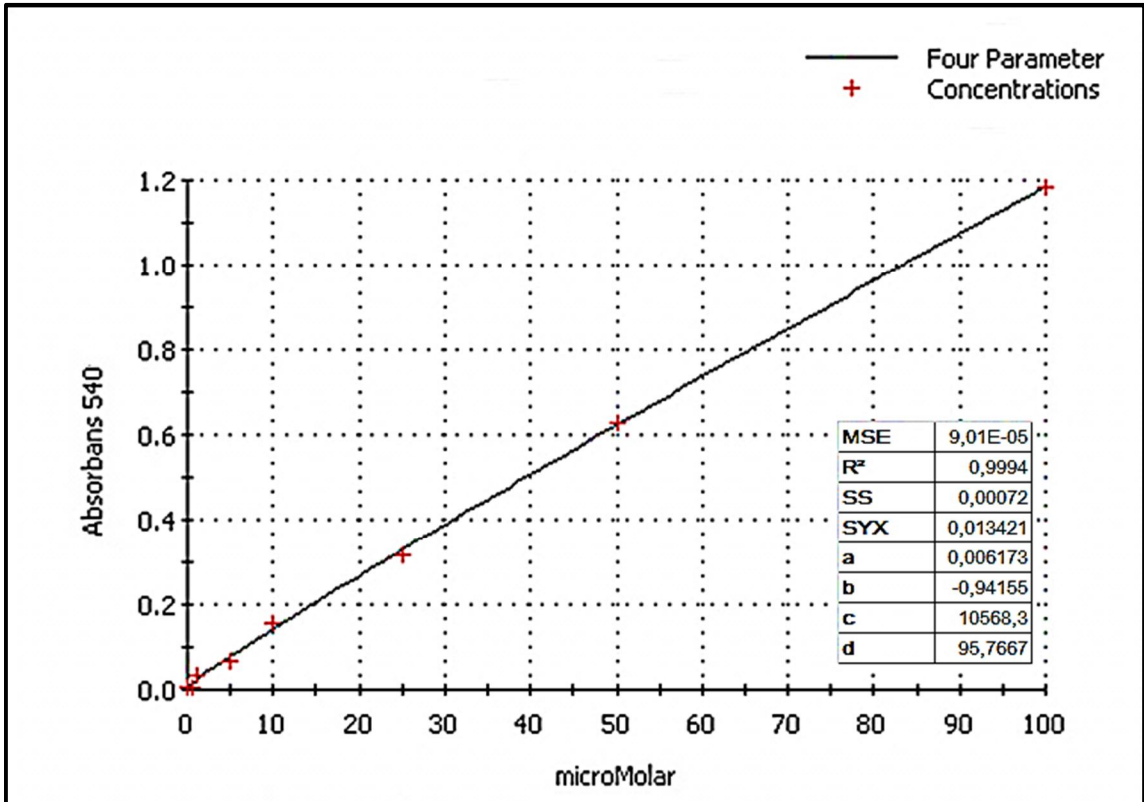
- ❖ 123,176 mL HCl 125 mL dH₂O'ya yavaşça eklenerek karıştırıldı ve 1 lt'ye tamamlandı. Isıtılarak içerisinde sülfanilamidin çözülmesi amacıyla kullanıldı.

Total Nitrit Ölçüm Yöntemi

1. Örneklerin deproteinizasyonu: Proteinlerin neden olduğu turbiditeyi elemine etmek için örneklerin deproteinizasyonu ölçümün tespit yeteneğini artırmaktadır. 100 µL örnek 100 µL çinko sülfat ve 100 µL sodyum hidroksit

ile muamele edildi. Daha sonra bu karışım 10000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı.

2. Santrifüj işleminden sonra üste kalan süpernatant kısımdan 100 µL alınarak üzerine 200 µL glisin – NaOH tamponu ilave edildi. Daha sonra tüm tüplere yaklaşık ağırlığı 2,5 – 3 gr olan kadmiyum granüllerinden atılarak oda ısısında 90 dk inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon işleminden sonra numune tüplerinden 100 µL alınarak 96 kuyucuklu plate'e aktarıldı.
4. Her bir kuyucuğa sırasıyla 50 µL NED ve 50 µL sülfanilamit ilave edildi.
5. Absorbanslar 540 nm'de okutuldu (Şekil 27).



Şekil 27. Standart [NO₂] Grafiği (Grafik VICTOR™ X3, PerkinElmer Inc., USA, Plate Okuyucuda, WorkOut 2.5, DAZDAQ LTD, England, programında çizilmiştir).

3.2.9. Arjinaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Arjinaz aktivitesi Corraliza ve ark (38), Munder ve ark (127) tarafından bildirilen yöntemler doğrultusunda serum için modifiye edilerek çalışılmıştır. Bir Ünite enzim aktivitesi dakikada 1 µmol üre oluşumunu katalize eden enzim miktarı olarak tarif edilmiştir.

Arjinaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Materyalleri

1. *TRIS-HCl Tamponu, 50 mM*

- ❖ 6,057 gr TRIZMA[®] base tartıldı. pH'sı 50 mM HCl ile 7,5'e ayarlanarak 1 lt'ye tamamlandı.

2. *Mangan Klorür (.4H₂O), 10 mM*

- ❖ 0,19791 gr MnCl₂.4H₂O tartıldı ve 50 mM TRIS-HCl tamponu içinde 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti yöntem öncesi taze hazırlandı.

3. *L-Arjinin, 0,5 M*

- ❖ 8,7099 gr L-Arjinin tartılarak 50 mL dH₂O'da çözüldü. Ardından pH'sı 0,1 M HCl ile 9,7'ye ayarlandı. Bu çözelti 2 - 8°C'de saklanabilir.

4. *α-Izonitrosopropiofenon (ISPF), % 9*

- ❖ 0,900 gr ISPF tartıldı ve bir miktar %100 etanolde çözüldükten sonra 10 ml'ye yine etanolla tamamlandı.

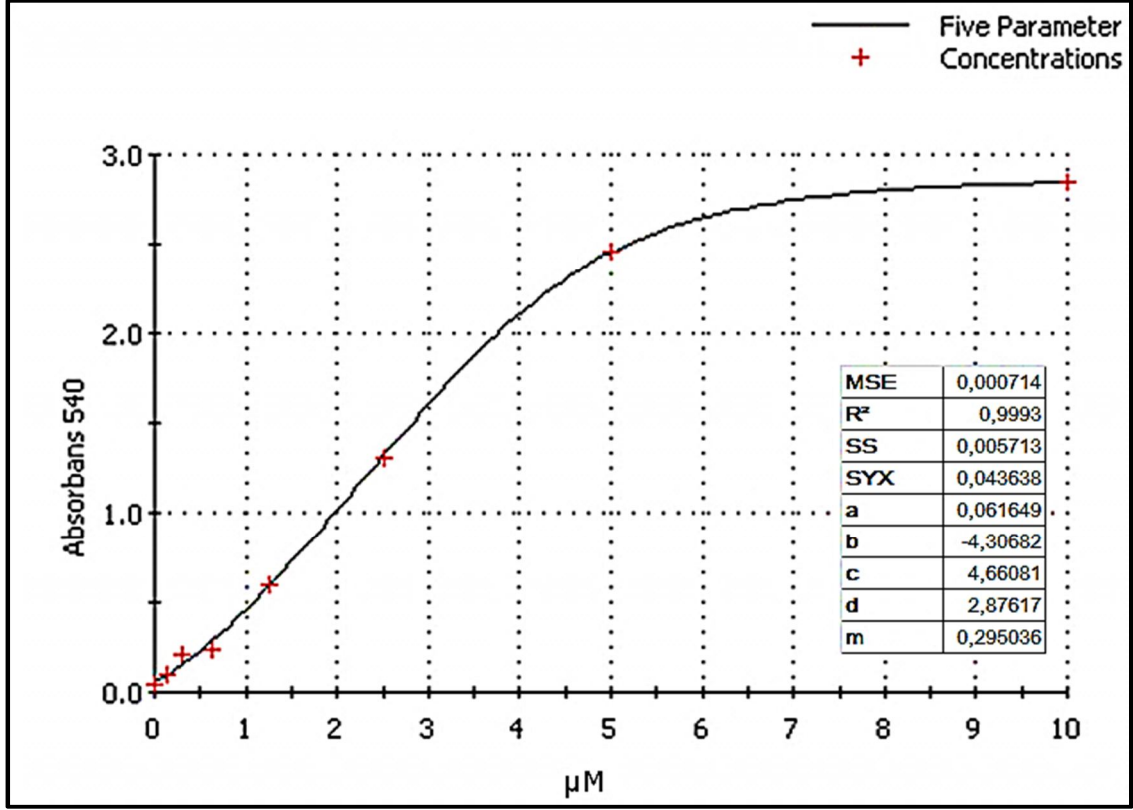
5. *Üre standardı, 60 mg/100 ml (10µmol üre)*

- ❖ 0,016 M benzoik asit içerisinde 0,06 gr üre tartılıp 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti stok üre standardı olarak kullanıldı. Deneyde bu stoktan dilüsyonla çeşitli konsantrasyonlarda standart elde edildi

Arjinaz Enzim Aktivite Ölçümü Yöntemi

1. Tüm örnekler 1:10 oranında distile su ile dilüe edildi.
2. Serum içerisindeki endojen ürenin deney sonuçlarını interfere etmemesi için örnek mL'sine 3 Ünite Ureaz hazırlanıp pipetlenerek tüm örnekler 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. % 0,1'lik Triton X-100 çözeltisinin 100 µL ile 100 µL numune karıştırılarak 30 dakika oda ısısında çalkalandı.
4. Çalkalama sonrası elde edilen homojen karışımdan 100 µL alınıp üzerine 150 µL 50 mM Tris-HCl/ 10 mM MnCl₂ karışımından eklendi. Hazırlanan bu karışım 56°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde numune içindeki arjinazın aktif hale gelmesi sağlandı.
5. Aktif hale gelen numunelerden 100 µL alınıp üzerine pH'sı 9,7'ye ayarlanmış 0,5 M L-Arjinin eklendi. Bu karışım 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak için 1:3:7 karışım oranında hazırlanan "Sülfürik Asit: Fosforik Asit: Su" asit çözeltisi eklenerek reaksiyonun durması sağlandı.
7. Ardından asit çözeltisi eklenen tüplere % 9'luk ISPF çözeltisinden 40 µL eklenerek tüpler kaynar su banyosunda (100°C) 45 dakika inkübe edildi.
8. Kaynar su banyosunda bekletilen tüm tüpler süre sonunda oda ısısında karanlık bir ortamda 15 – 30 dakika bekletildi ve soğuması sağlandı.
9. Tüm tüplerden 200 µL alınarak 96 kuyucuklu hücre kültür mikro plate'ine pipetlendi ve absorbans değişimleri 540 nm'de okutuldu.
10. Stok üre standardından oluşturulan seri dilüsyonlu üre konsantrasyonlarına (10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,62 – 0 µmol üre) karşılık gelen absorbans grafiği üzerinden sonuçlar değerlendirildi (Şekil 28).

11. Örnek değerleri; distile su ile dilüsyon, üreaz ile karışım dilüsyonu, Triton X-100 ile karışım dilüsyonu ve total reaksiyon hacmi içerisindeki karışım dilüsyonu dikkate alınarak elde edilen dilüsyon faktörü ile çarpılarak verildi.



Şekil 28. Standart Üre Grafiği (Grafik *VICTOR™ X3*, *PerkinElmer Inc., USA*, Plate Okuyucuda, *WorkOut 2.5*, *DAZDAQ LTD, England*, programında çizilmiştir).

Histolojik İnceleme

Sağlıklı kontrol, sham, karvakrol grubu I, karvakrol grubu II, karvakrol grubu III kafeik asit ve LPS gruplarını oluşturan tüm sıçanlar Xylasin/Ketamin 10/80 mg/kg anestezi madde verilerek öldürüldü. Sıçanların karaciğer örnekleri, ışık mikroskopik düzeyde histolojik incelemelerinin yapılabilmesi için %10'luk formalin fiksatifine alınarak 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Karaciğer örnekleri şeffaflandırılmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutulmuş, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'er dakika tutularak şeffaflandırıldı. Şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı ve karaciğer örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada veriler ortalama \pm standart sapma (SD) ve medyan (25. ve 75. persantil) olarak verildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğunu test etmek amacıyla Kolmogorov-Smirnov Testi uygulandı. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirilmek amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi ve grupların farklılıklarını belirlemek için Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi, Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi ve Dunn Çoklu Karşılaştırma Testi uygulandı. Verilerin değerlendirmelerinde SPSS 13.0 for Windows (*SPSS Inc, Chicago, IL, USA*) ve Sigmastat 3.5 (*Statcon INC., B. Schäfer, Witzenhausen GERMANY*) istatistiksel paket programları kullanılmıştır. Sıfır Hipotezinin reddi için $p < 0.05$ değeri yeterli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Yaptığımız deneysel sepsis çalışmasında enjeksiyondan yaklaşık 2 – 3 saat sonra 1 mg/kg LPS i.p. verilen gruplardaki sıçanların hareketlerinde azalma, vücut sıcaklıklarını korumak için bir arada toplanma, tüylerde dikleşme, dışarıdan gelen uyarılara cevap vermekte güçsüzlük ve halsizlik belirtileri gözlemlendi. Deneklerde, adı geçen hastalık belirtilerinin görülmesi, Akın ve ark çalışması dikkate alınarak (6), örneklerde sepsis lehine değişikliklerin olabileceği izlenimi vermiştir.

Deneysel prosedür uygulanan gruplar; Sağlıklı Kontrol Grubu (Sağlıklı, n=7), çözücü madde verilen grup (SHAM, n=7), 20 mg/kg karvakrol verilip LPS enjeksiyonu yapılan grup (20 CVL+LPS, n=6), 40 mg/kg karvakrol verilip LPS enjeksiyonu yapılan grup (40 CVL+LPS, n=8), 80 mg/kg karvakrol verilip LPS enjeksiyonu yapılan grup (80 CVL+LPS, n=7), 50 mg/kg kafeik asit verilip LPS enjeksiyonu yapılan grup (50 CA+LPS, n=7) ve sadece LPS enjeksiyonu yapılan grup (LPS, n=8) olarak sınıflandırıldı.

Deneyde ölçümü yapılan parametrelerin istatistiksel olarak ortalama ve medyan değerleri Tablo 9 ve Tablo 10’da verilmiştir.

MDA düzeylerinin gruplar arasında yapılan karşılaştırılması Şekil 29’da verilmiştir.

MDA düzeylerinin oksidatif stres göstergesi olarak gruplar arası çoklu karşılaştırılması incelendiğinde **sağlıklı** ($p < 0,001$), **20 CVL+LPS** ($p < 0,01$), **40 CVL+LPS** ($p < 0,001$), **80 CVL+LPS** ($p < 0,05$) ve **50 CA+LPS** ($p < 0,001$) gruplarının **LPS** grubuyla arasında farklılık vardı ve tüm bu grupların MDA düzeyleri **LPS** grubuna göre düşüktü.

Sham grubunun ($p < 0,05$) ise **50 CA+LPS** grubuyla arasında fark bulundu ve sham grubunun MDA düzeyleri **50 CA+LPS** grubundan yüksekti.

Sağlıklı, sham, kafeik asit ve karvakrol doz gruplarının birbirleriyle aralarında MDA düzeyleri açısından farklılık tespit edilmedi ($p > 0,05$).

Tablo 9. Çalışmada ölçümü yapılan parametrelerin ortalama \pm standart sapma değerleri*

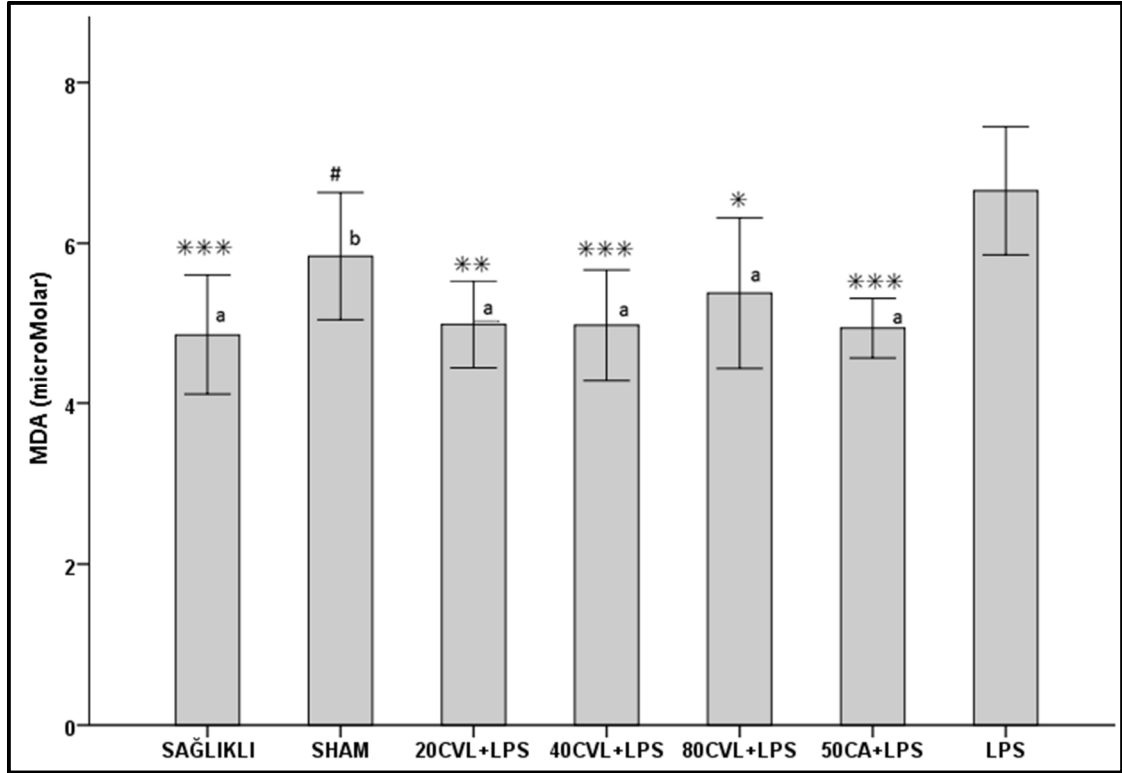
	Sağlıklı (n=7)	Sham (n=7)	20 CVL+LPS (n=6)	40 CVL+LPS (n=8)	80 CVL+LPS (n=7)	50 mg CA+LPS (n=7)	LPS (n=8)
MDA (μ M)	4,86 \pm 0,75	5,84 \pm 0,79	4,99 \pm 0,54	4,98 \pm 0,69	5,38 \pm 0,94	4,94 \pm 0,37	6,65 \pm 0,80
ALT (U/L)	33,71 \pm 4,46	44,43 \pm 5,44	33,67 \pm 3,27	25,63 \pm 4,00	34,86 \pm 8,25	52,43 \pm 15,36	61,75 \pm 13,96
TNF α (pg/mL)	3,48 \pm 1,46	4,65 \pm 2,23	4,46 \pm 2,66	4,87 \pm 2,14	4,02 \pm 2,54	13,09 \pm 2,62	15,75 \pm 2,42
Seruloplazmin (U/mL)	89,38 \pm 9,12	113,54 \pm 7,93	162,54 \pm 10,83	100,57 \pm 8,05	109,08 \pm 12,95	155,40 \pm 33,69	70,23 \pm 5,40
Arjinaz (U/mL)	233,60 \pm 35,22	285,12 \pm 63,23	312,45 \pm 60,36	300,75 \pm 61,71	277,31 \pm 53,16	300,74 \pm 89,13	356,19 \pm 43,59
NO (μ M)	13,27 \pm 1,63	13,31 \pm 1,35	27,50 \pm 6,79	24,12 \pm 4,37	16,85 \pm 3,58	19,21 \pm 9,54	25,95 \pm 7,42

Tablo 10. Çalışmada ölçümü yapılan parametrelerin ortanca (%25 - %75) değerleri**

	Sağlıklı (n=7)	Sham (n=7)	20 mg CVL+LPS (n=6)	40 mg CVL+LPS (n=8)	80 mg CVL+LPS (n=7)	50 mg CA+LPS (n=7)	LPS (n=8)
IL - 6 (pg/mL)	14,9 (14,3 - 27,3)	12,6 (11,1 - 20,1)	121, 5 (106,8 - 126,9)	41, 3 (37,8 - 61,7)	53,1 (49,6 - 58,4)	64,6 (59,2 - 87,9)	219,8 (188,9 - 236,3)
LOX (U/mL)	4,74 (4,2 - 4,9)	5,5 (5,1 - 5,5)	4,84 (4,6 - 4,9)	4,91 (4,8 - 5,1)	5,03 (4,7 - 5,2)	4,53 (4,4 - 4,7)	5,01 (4,9 - 5,3)
AST (U/L)	203 (148,5 - 263,2)	157 (152,8 - 245,8)	174,5 (163 - 189)	151,5 (142 - 176,5)	169 (146,3 - 190,3)	110 (100,7 - 123,2)	160 (136,5 - 175,5)

* Kolmogorov- Smirnov Testi uygulanarak normal dağılım gösteren parametreler Tek Yönlü Varyans Analiziyle değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi

** Kolmogorov- Smirnov Testi uygulanarak normal dağılım göstermeyen parametreler için Kruskal – Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi yapılarak sonuçlar ortanca (%25 - %75) olarak verildi.



Her bir grubun değeri ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi

a: LPS grubuna göre farklılık, *: LPS grubuna göre anlamlılık düzeyi

b: 50 CA+LPS grubuna göre farklılık #: 50 CA+LPS grubuna göre anlamlılık düzeyi

*: Anlamlı ($p < 0,05$), **: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ***: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)

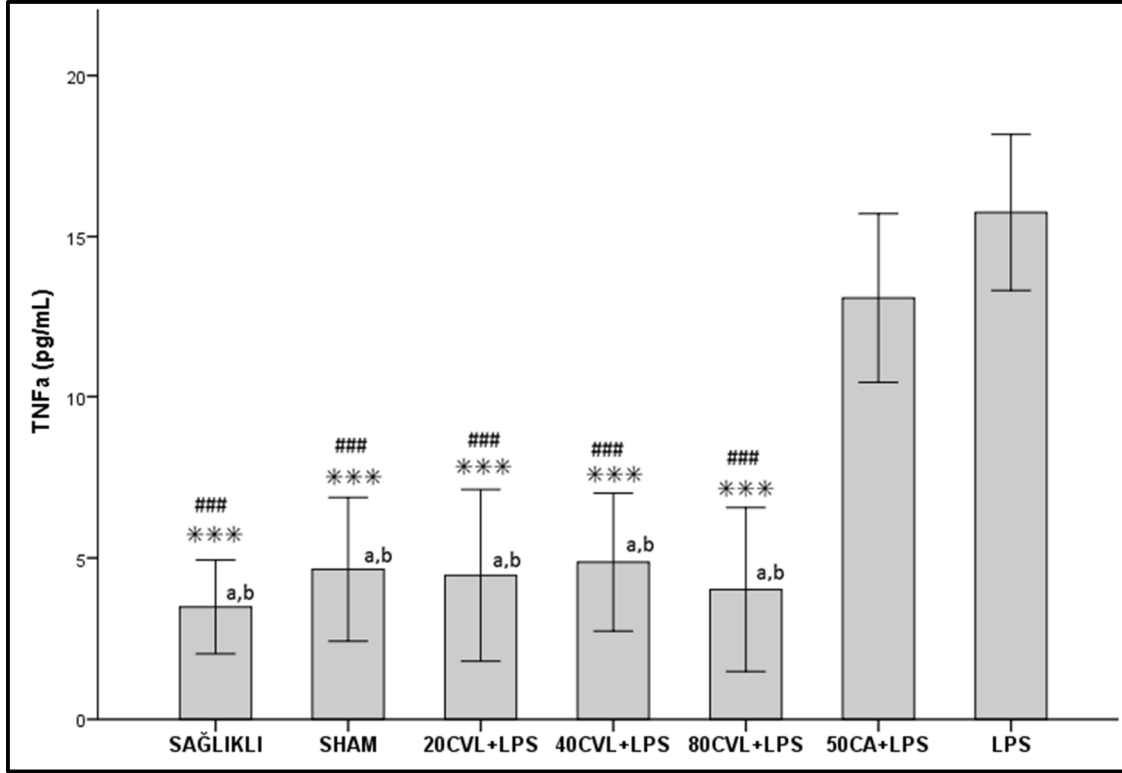
#: Anlamlı ($p < 0,05$)

Şekil 29. MDA düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

TNF- α düzeylerinin gruplar arasında yapılan karşılaştırılması Şekil 30' da verilmiştir.

TNF- α düzeylerinin pro-inflamatuar sitokin olarak değerlendirildiği bu çalışmada gruplar arası çoklu karşılaştırılması incelendiğinde **LPS** grubunun TNF- α düzeylerinin **50 CA+LPS** grubu hariç **sağlıklı** ($p < 0,001$), **sham** ($p < 0,001$), **20 CVL+LPS** ($p < 0,001$), **40 CVL+LPS** ($p < 0,001$), **80 CVL+LPS** ($p < 0,001$) gruplarına göre daha yüksek olduğu, **50 CA+LPS** grubunun ise TNF- α düzeylerinin **LPS** grubu hariç **sağlıklı** ($p < 0,001$), **sham** ($p < 0,001$), **20 CVL+LPS** ($p < 0,001$), **40 CVL+LPS**

($p < 0,001$), **80 CVL+LPS** ($p < 0,001$) gruplarına göre yüksek olduğu bulundu. Karvakrol doz grupları arasında istatistiki bir anlamlılık bulunamadı ($p > 0,05$).



Her bir grubun değeri ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi

a: LPS grubuna göre farklılık, *: LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

b: 50 CA+LPS grubuna göre farklılık #: 50 CA+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

***: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)

###: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)

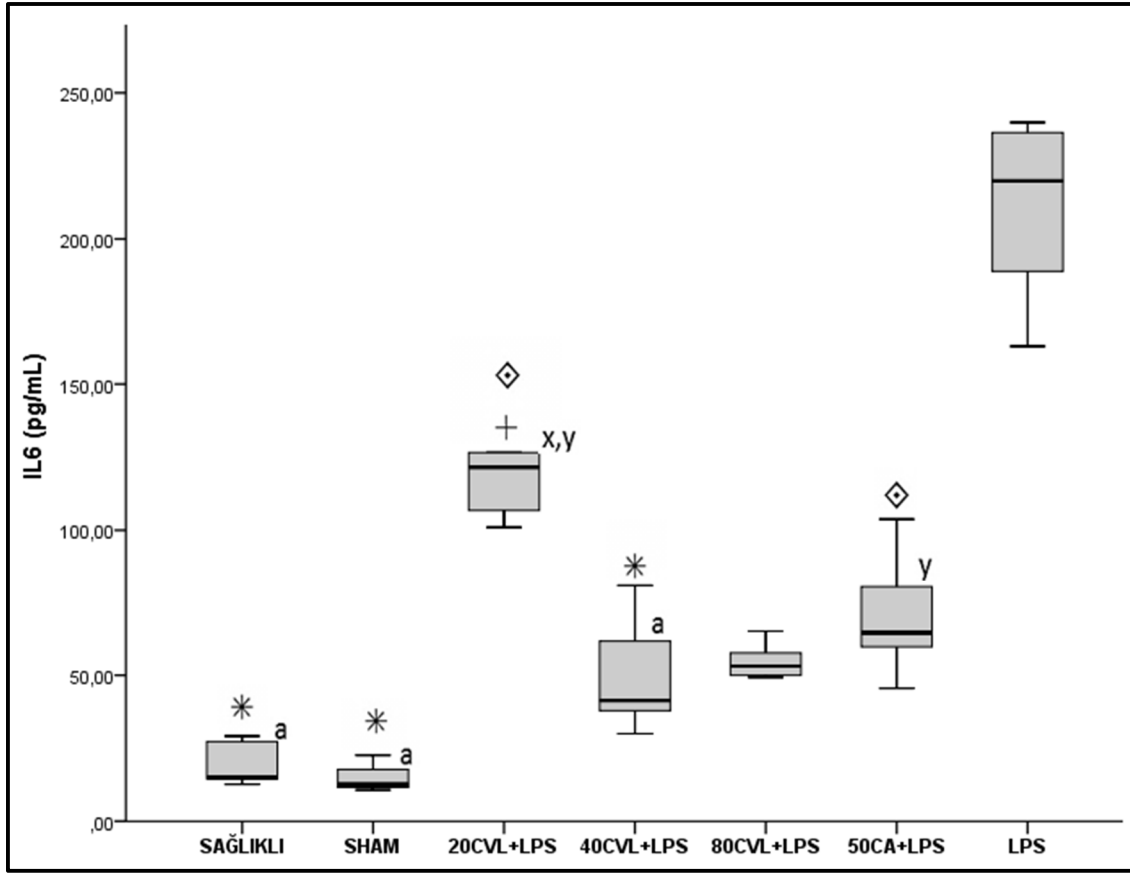
Şekil 30. TNF- α düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması

Serum IL-6 düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması Şekil 31’te verilmiştir.

Gruplar arasında anlamlılık düzeyleri açısından **sağlıklı** ($p < 0,05$), **sham** ($p < 0,05$) ve **40 CVL+LPS** ($p < 0,05$) gruplarının IL-6 düzeyleri **LPS** grubuna göre düşüktü.

20 CVL+LPS grubunun IL-6 düzeyleri ise **sağlıklı** ($p < 0,05$) ve **sham** ($p < 0,05$) grubuna göre yüksekti.

50 CA+LPS grubunun IL-6 düzeyleri **sham** ($p < 0,05$) grubuna göre yüksekti.



Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi

Gruplar arası anlamlılık düzeyleri Sigmastat paket programıyla yapıldığından anlamlılık düzeyleri $p < 0,05$ olarak verilmiştir.

a: LPS grubuna göre farklılık, *: LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

x: Sağlıklı gruba göre farklılık, +: Sağlıklı gruba göre farklılığın anlamlılık düzeyi

y: Sham grubuna göre farklılık, ◇: Sham grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

*: Anlamlı ($p < 0,05$),

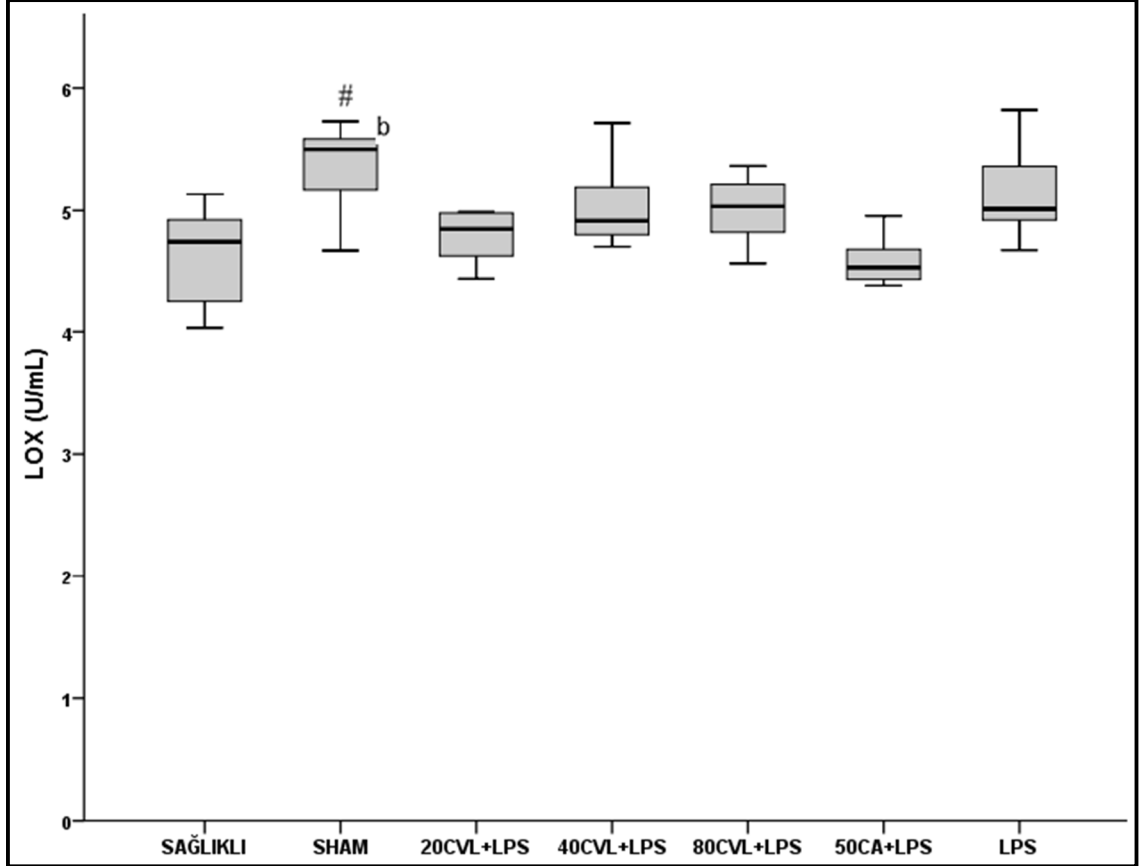
+: Anlamlı ($p < 0,05$),

◇: Anlamlı ($p < 0,05$)

Şekil 31. IL-6 düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Serum lipoksijenaz (LOX) aktivitelerinin değerlendirildiği bu çalışmada gruplar arası LOX değerlerinin karşılaştırılması Şekil 32’de verilmiştir.

Verilere göre sadece **sham** grubunun LOX düzeyleri **50 CA+LPS** grubuna göre anlamlılık gösteriyordu ($p < 0,05$) ve **kafeik asit (50 CA+LPS)** grubuna göre yüksekti. Diğer gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir artış veya azalma tespit edilememiştir.



Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi

Gruplar arası anlamlılık düzeyleri Sigmatstat paket programıyla yapıldığından anlamlılık düzeyleri $p < 0,05$ olarak verilmiştir.

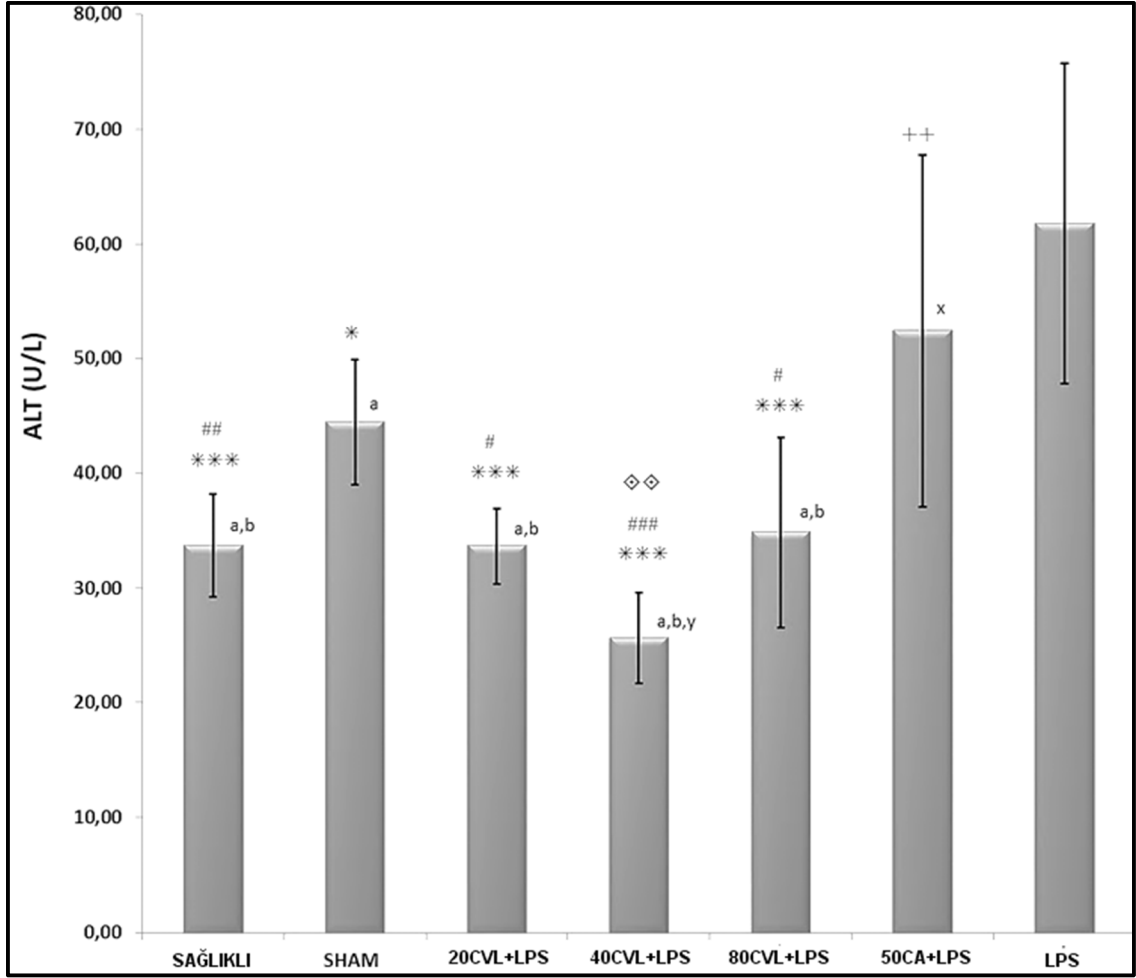
b: 50 CA+LPS grubuna göre farklılık #: 50 CA+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

#: Anlamlı ($p < 0,05$)

Şekil 32. LOX düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Karaciğer fonksiyon testi olarak değerlendirilen serum ALT düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması Şekil 33'de verilmiştir.

Sağlıklı ($p < 0,001$), sham ($p < 0,05$), 20 CVL+LPS ($p < 0,001$), 40 CVL+LPS ($p < 0,001$) 80 CVL+LPS ($p < 0,001$) gruplarının ALT düzeyleri LPS grubuna göre düşüktü.



Her bir grubun değeri ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi

- a: LPS grubuna göre farklılık, *: LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
b: 50 CA+LPS grubuna göre farklılık #: 50 CA+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
x: Sağlıklı gruba göre farklılık, +: Sağlıklı gruba göre farklılığın anlamlılık düzeyi
y: Sham grubuna göre farklılık, ◇: Sham grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

- *: Anlamlı ($p < 0,05$), **: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ***: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
#: Anlamlı ($p < 0,05$), ##: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ###: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
+: Anlamlı ($p < 0,05$), ++: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), +++: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
◇: Anlamlı ($p < 0,05$), ◇◇: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ◇◇◇: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)

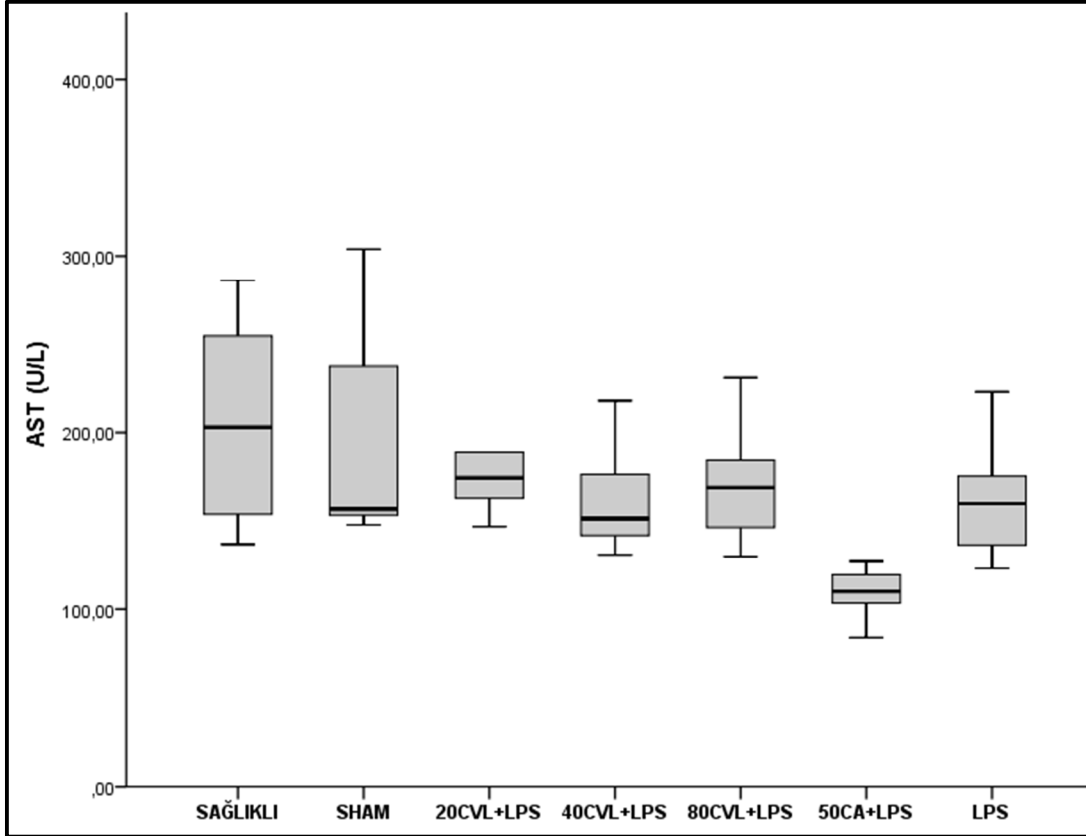
Şekil 33. ALT düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Sağlıklı ($p < 0,01$), **20 CVL+LPS** ($p < 0,05$), **40 CVL+LPS** ($p < 0,001$), **80 CVL+LPS** ($p < 0,05$) gruplarının ALT düzeyleri **50 CA+LPS** grubuna göre düşüktü.

40 CVL+LPS grubunda ise serum ALT düzeyleri yalnızca **sham** ($p < 0,01$) grubunun ALT düzeyleriyle farklılık gösterdi ve **sham** grubunun ALT düzeyleri daha yüksekti.

Serum AST düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması Şekil 34’de verilmiştir.

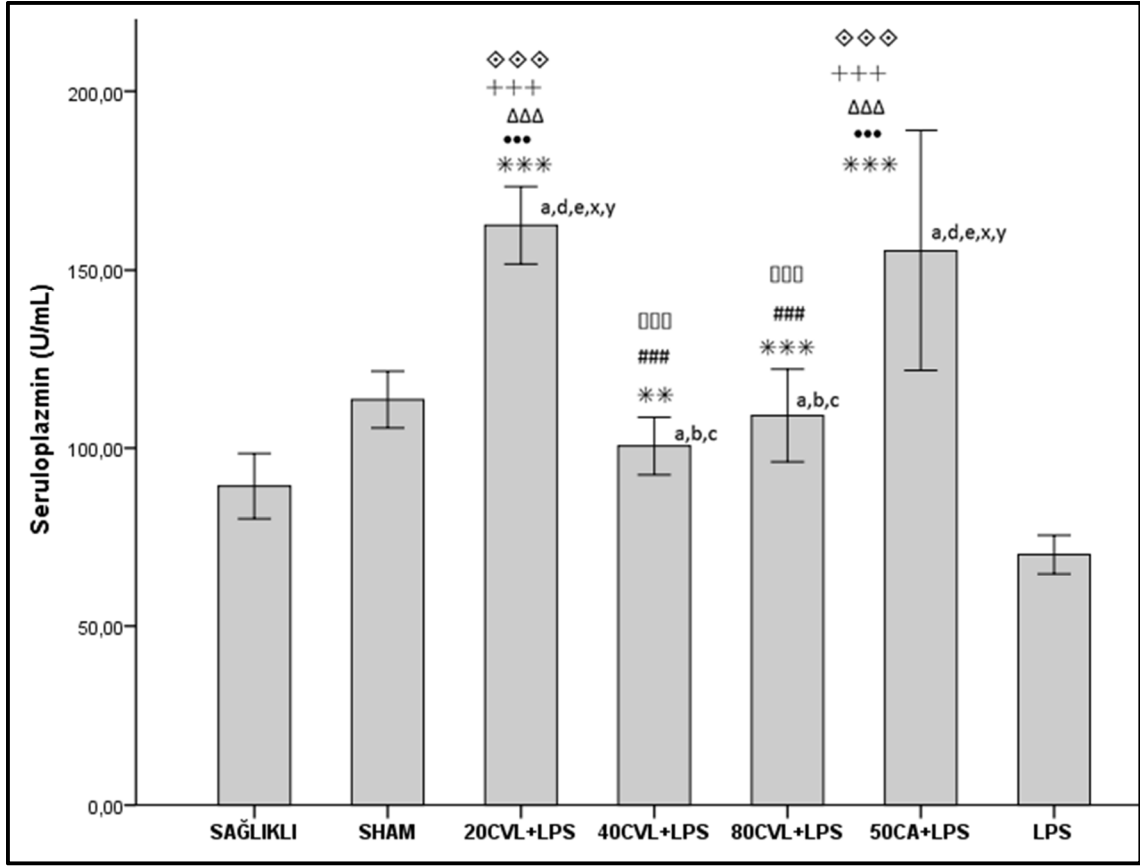
Tüm gruplar arasında AST düzeyleri açısından farklılık tespit edilemedi ($p>0,05$).



Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi
Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamadı.

Şekil 34. AST düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Serum seruloplazmin oksidaz aktivitesinin değerlendirildiği bu çalışmada karvakrol doz gruplarının (Şekil 35) hepsinin LPS grubuyla kıyaslandığında seruloplazmin oksidaz aktivite düzeyleri yüksekti.



Her bir grubun değeri ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi

- a: LPS grubuna göre farklılık, *: LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
b: 50 CA+LPS grubuna göre farklılık #: 50 CA+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
c: 20 CVL+LPS grubuna göre farklılık □: 20 CVL+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
d: 40 CVL+LPS grubuna göre farklılık, •: 40 CVL+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
e: 80 CVL+LPS grubuna göre farklılık, Δ: 80 CVL+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
x: Sağlıklı gruba göre farklılık, +: Sağlıklı gruba göre farklılığın anlamlılık düzeyi
y: Sham grubuna göre farklılık, ◇: Sham grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

- *: Anlamlı ($p < 0,05$), **: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ***: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
#: Anlamlı ($p < 0,05$), ##: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$) ###: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
+: Anlamlı ($p < 0,05$), ++: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), +++: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
◇: Anlamlı ($p < 0,05$), ◇◇: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ◇◇◇: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
Δ: Anlamlı ($p < 0,05$), ΔΔ: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ΔΔΔ: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
□: Anlamlı ($p < 0,05$), □□: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), □□□: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
•: Anlamlı ($p < 0,05$), ••: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), •••: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)

Şekil 35. Seruloplazmin oksidaz aktivitesinin gruplar arasında karşılaştırılması

20 CVL+LPS grubunun seruloplazmin oksidaz aktivitesi **sağlıklı** ($p < 0,001$), **sham** ($p < 0,001$), **40 CVL+LPS** ($p < 0,001$), **80 CVL+LPS** ($p < 0,001$) ve **LPS** grubuna ($p < 0,001$) göre **yüksek** ve bu yükseklik istatistiki olarak çok ileri düzeyde anlamlı idi.

40 CVL+LPS grubunun seruloplazmin oksidaz aktivitesi **50 CA+LPS** ($p<0,001$) grubuna göre düşük ve **LPS** grubuna göre ($p<0,01$) yüksekti. **20 CVL+LPS** grubuna göre seruloplazmin oksidaz aktivitesi ileri düzeyde anlamlı düşüktü ($p<0,001$).

80 CVL+LPS grubunun seruloplazmin oksidaz aktivitesi **20 CVL+LPS** ($p<0,001$) ve **50 CA+LPS** ($p<0,001$) grubuna göre düşük, **LPS** grubuna göre yüksekti ($p<0,001$).

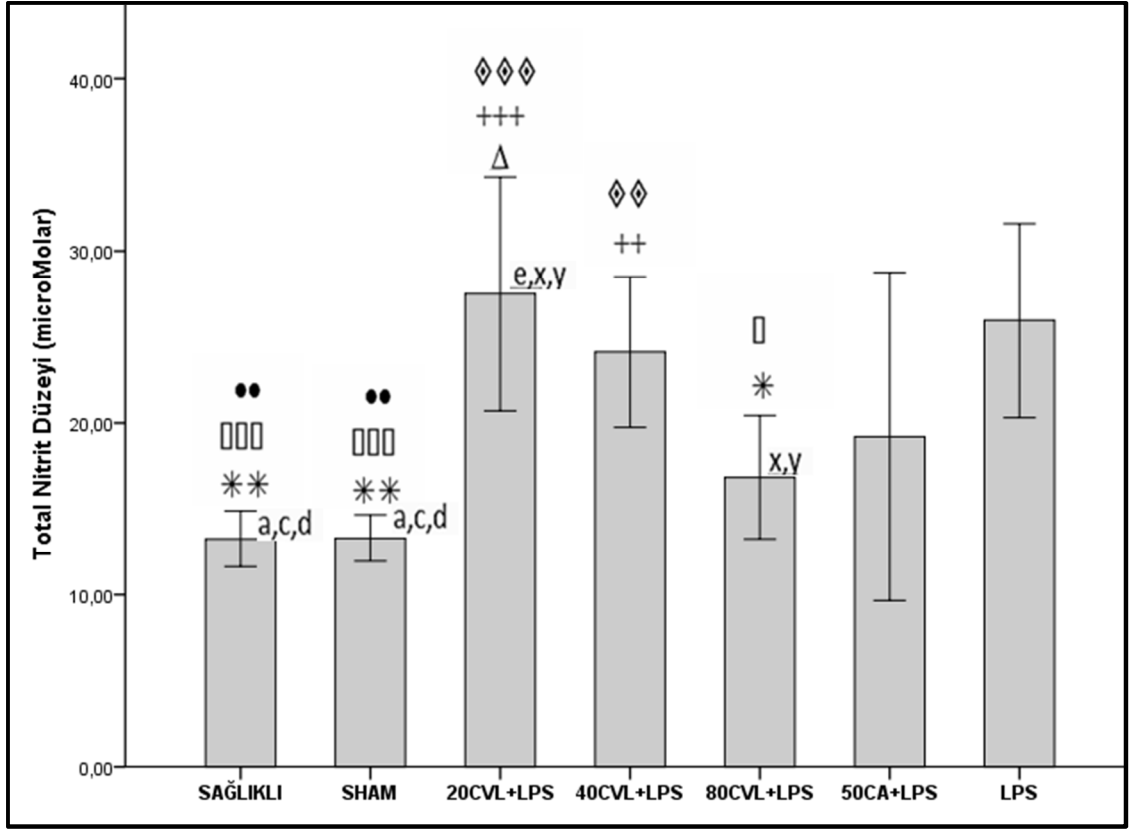
50 CA+LPS grubunun seruloplazmin oksidaz aktivitesi ise **sağlıklı** ($p<0,001$), **sham** ($p<0,001$), **40 CVL+LPS** ($p<0,001$), **80 CVL+LPS** ($p<0,001$) ve **LPS** ($p<0,001$) gruplarına göre yüksekti.

Serum NO değerleri bakımından gruplar arası karşılaştırma istatistiği Şekil 36'de verilmiştir.

20 CVL+LPS grubunun NO düzeylerinin **sağlıklı** ve **sham** grubuna göre yüksekliği çok ileri düzeyde anlamlı idi ($p<0,001$). **80 CVL+LPS** grubuna göre ise yüksekliğin anlamlılık düzeyi $p<0,05$ ' idi.

40 CVL+LPS grubunun NO düzeyleri **sağlıklı** ve **sham** grubuna göre yüksek idi ($p<0,01$).

80 CVL+LPS grubunun NO düzeyleri ise **LPS** ve **20 CVL+LPS** grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0,05$). **LPS** grubunda ise NO düzeyleri **sağlıklı** ($p<0,01$), **sham** ($p<0,01$) ve **80 CVL+LPS** ($p<0,05$) gruplarına göre yüksekti.



Her bir grubun değeri ortanca (%25-%75 persantil) olarak verildi

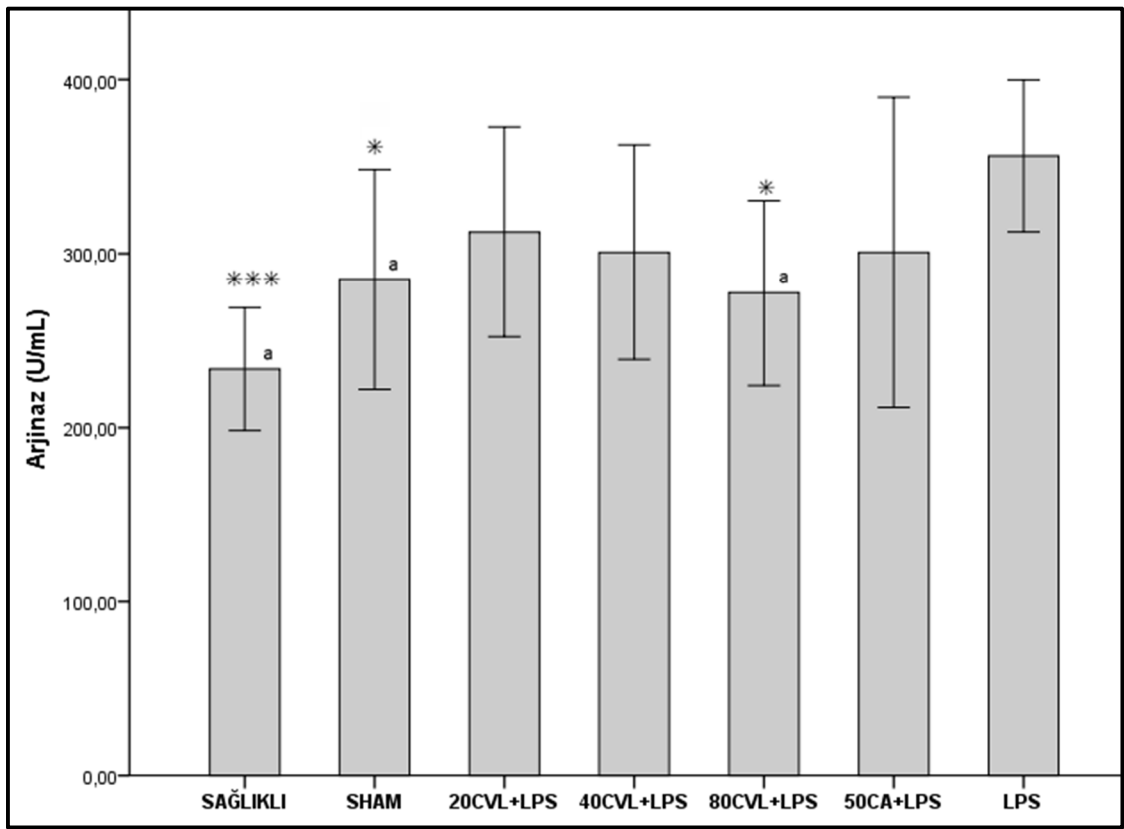
- a: LPS grubuna göre farklılık, *: LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
c: 20 CVL+LPS grubuna göre farklılık □: 20 CVL+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
d: 40 CVL+LPS grubuna göre farklılık, •: 40 CVL+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
e: 80 CVL+LPS grubuna göre farklılık, Δ: 80 CVL+LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi
x: Sağlıklı gruba göre farklılık, +: Sağlıklı gruba göre farklılığın anlamlılık düzeyi
y: Sham grubuna göre farklılık, ◇: Sham grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

- +: Anlamlı ($p < 0,05$), ++: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), +++: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
*: Anlamlı ($p < 0,05$), **: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ***: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
+ : Anlamlı ($p < 0,05$), ++: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), +++: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
◇: Anlamlı ($p < 0,05$), ◇◇: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ◇◇◇: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
□: Anlamlı ($p < 0,05$), □□: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), □□□: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)
•: Anlamlı ($p < 0,05$), ••: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), •••: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)

Şekil 36. NO düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Serum Arjinaz düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırması Şekil 37’te verilmiştir.

Arjinaz düzeyleri sadece **sağlıklı** ($p < 0,001$), **sham** ($p < 0,05$) ve **80 CVL+LPS** ($p < 0,05$) gruplarında **LPS** grubuna göre **düşüktü**. Diğer gruplar arasında çoklu karşılaştırma analizi sonucu **fark bulunamadı** ($p > 0,05$).



Her bir grubun değeri ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi

a: LPS grubuna göre farklılık, *: LPS grubuna göre farklılığın anlamlılık düzeyi

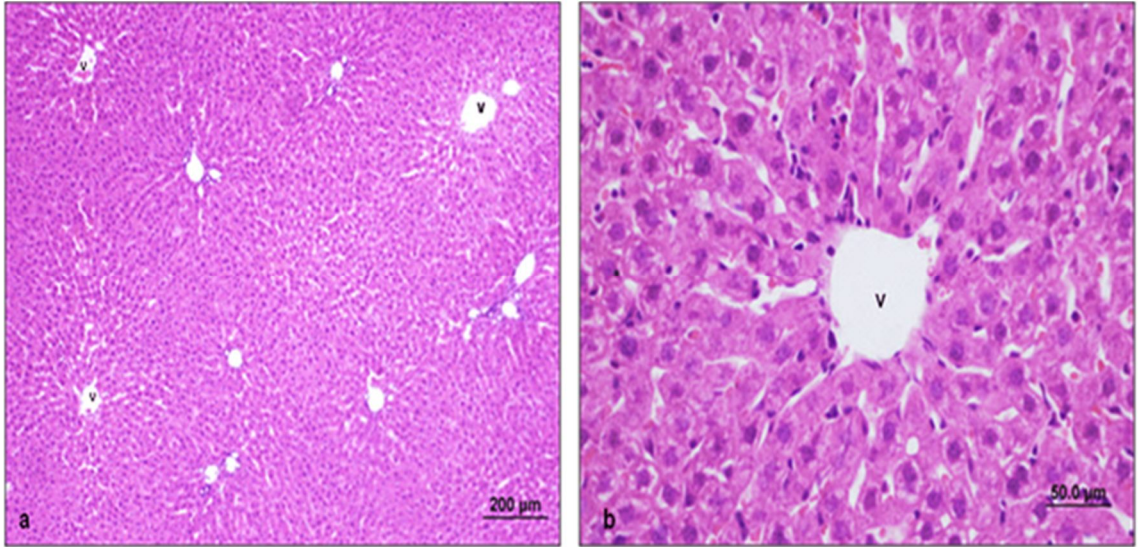
*: Anlamlı ($p < 0,05$), **: İleri düzeyde anlamlı ($p < 0,01$), ***: Çok ileri düzeyde anlamlı ($p < 0,001$)

Şekil 37. Arjinaz düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Karaciğerde Histolojik Bulgular

Çalışmamızdaki karaciğer doku örnekleri Hematoksilen-Eozin boyama yöntemiyle incelendi. Tüm gruplar, nekrotik hücre odakları, hücresel dejenerasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu açısından değerlendirildi.

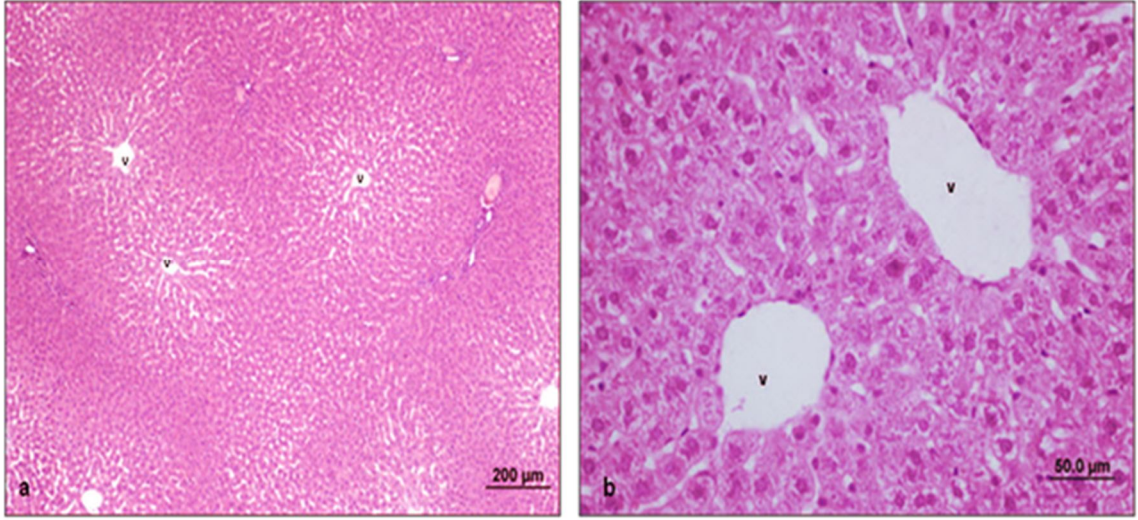
Sağlıklı-kontrol grubu: Bu grubu oluşturan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapıları, portal alan ve içerdiği yapıları ile karaciğer normal histolojik yapıda gözlendi (Şekil 38).



Şekil 38. Sağlıklı-kontrol grubu histolojik incelemesi

Hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapıları, portal alan ve içerdiği yapıları ile normal histolojik yapıdaki karaciğer izlenmekte. V:vena sentralis. (bar:200µm, bar:50.0µm, HE).

Sham grubu: Bu grubu oluşturan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapıları, portal alan ve içerdiği yapıları ile karaciğer normal histolojik yapıda gözlendi (Şekil 39).



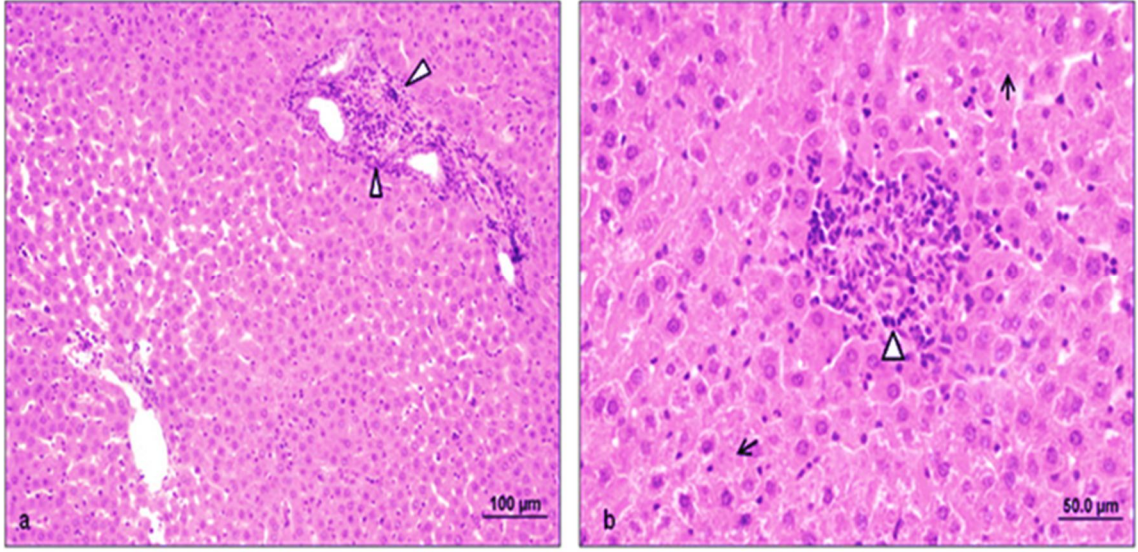
Şekil 39. Sham grubu histolojik incelemesi

Hepatosit hücreleri, sinüzoidal yapıları, portal alan ve içerdiği yapıları ile normal histolojik yapıdaki karaciğer izlenmekte. V:vena sentralis. (bar:200µm, bar:50.0µm, HE).

Sepsis grubu (1 mg/kg LPS): Bu grubu oluşturan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; özellikle parankim dokuda yoğun nekrotik hücre odakları ve hepatosit hücrelerinde karyolizis gözlemlendi. Vena sentralisin etrafında ve karaciğerin genelinde hücresel dejenerasyon dikkat çekti. Karaciğerde birçok alanda mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü. Ayrıca gerek portal alanda gerekse vena sentralislerde damar içi konjesyonlar gözlemlendi (Şekil 40).

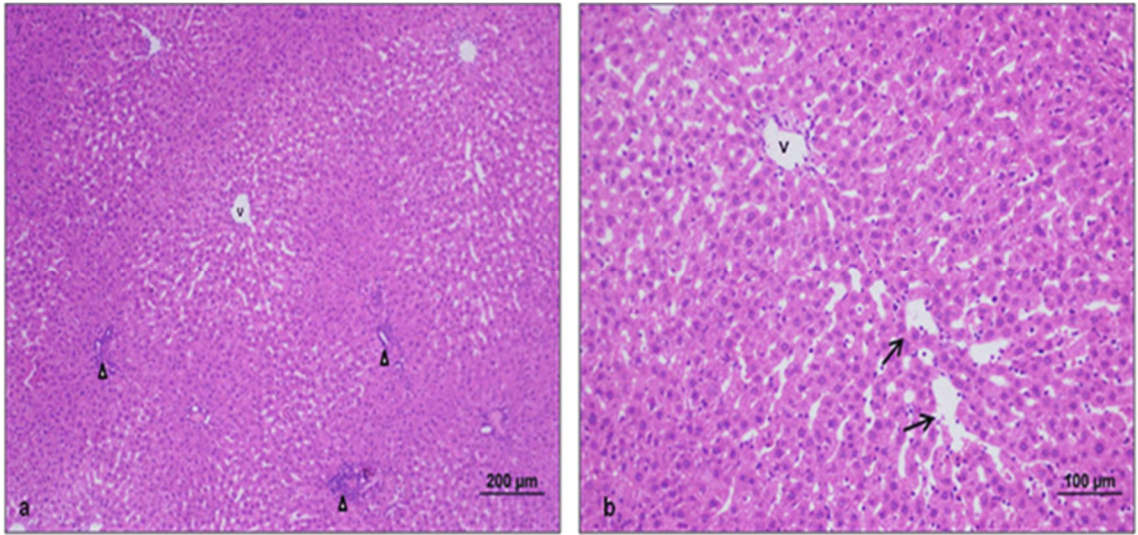
Karvakrol grubu I (20 mg/kg CVL+LPS): Bu grubu oluşturan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; sepsis grubuna göre azalmış hücresel hasar görülmekle birlikte portal alanda ise hücresel infiltrasyonun devam ettiği dikkat çekti (Şekil 41).

Karvakrol grubu II (40 mg/kg CVL+LPS): Bu grubu oluşturan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; sepsis grubuna göre azalmış hücresel hasar düzgün hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapılar ile normale yakın karaciğer yapısı görüldü. Ancak yer yer kısmi hücresel infiltrasyona rastlandı (Şekil 42).



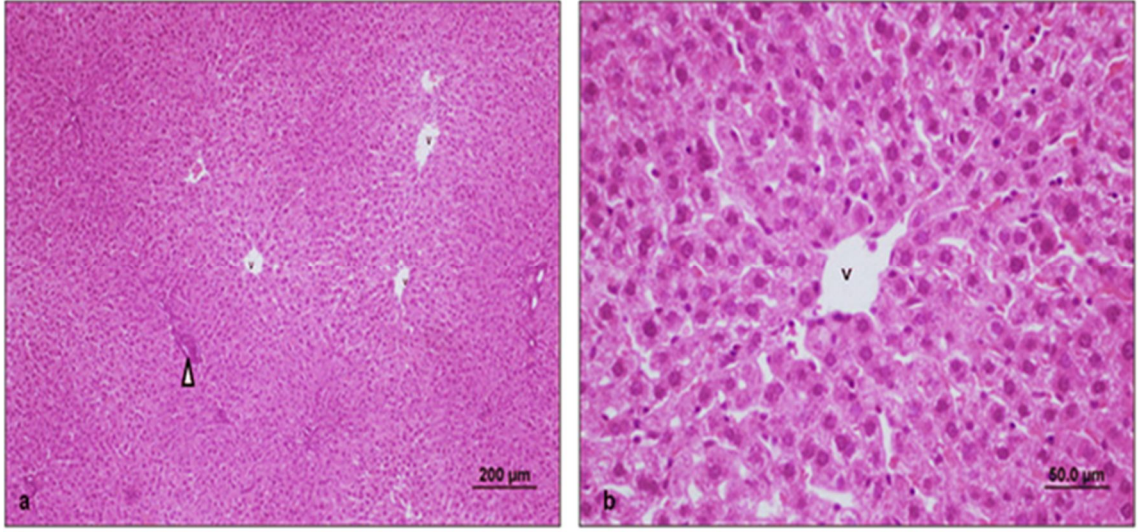
Şekil 40. Sepsis grubu (1 mg/kg LPS) histolojik incelemesi

Karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde farklı büyütmelerde parankim dokuda yoğun hücresel dejenerasyon, karyolizis (→) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (►) dikkat çekmekte (a,b) (bar:100µm, bar:50.0µm, HE).



Şekil 41. Karvakrol grubu I (20 mg CVL+LPS) histolojik incelemesi:

Karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde portal alanda azalmış hücresel infiltrasyon (►) ile kısmi sinüzoidal dilatasyon (→) görülmekte.

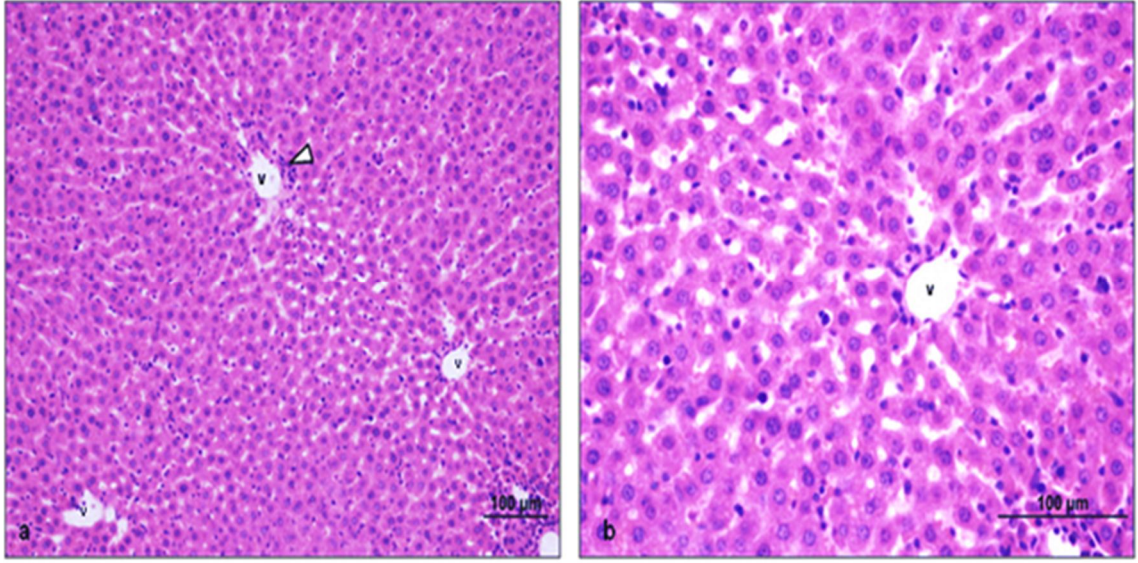


Şekil 42. Karvakrol grubu II (40 mg/kg CVL+LPS) histolojik incelemesi

Karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde azalmış hücrel hasar, düzgün hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapılar ile normale yakın karaciğer yapısının yanı sıra, kısmi hücrel infiltrasyon (▶) görülmekte. V:vena sentralis (a,b) (bar:200µm, bar:50.0µm, HE).

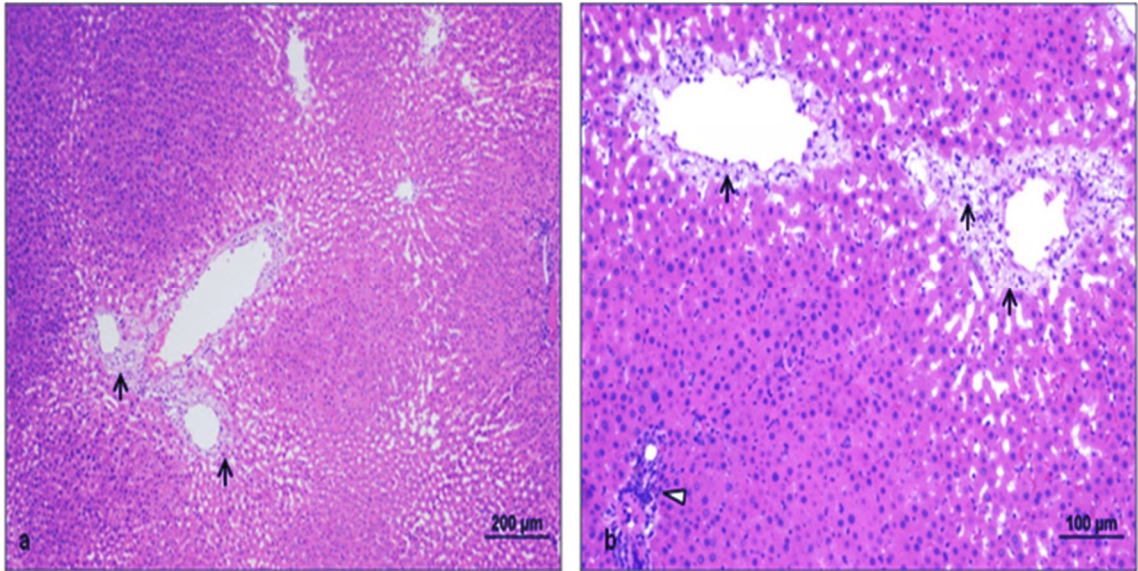
Karvakrol grubu III (80 mg/kg CVL+LPS): Bu grubu oluşturan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; sepsis grubuna göre azalmış hücrel hasar oldukça düzgün korunmuş hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapılar ile normale yakın karaciğer yapısı gözlemlendi. Bazı alanlarda sadece vena sentralis etrafında az da olsa hücrel infiltrasyon görüldü (Şekil 43).

Kafeik asit grubu (50 CA+LPS): Bu grubu oluşturan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde; özellikle vena sentralisin etrafındaki hepatositlerde hücrel dejenerasyon ve portal alanda hücrel infiltrasyon dikkat çekti (Şekil 44).



Şekil 43. Karvakrol grubu III (80 mg/kg CVL+LPS) histolojik incelemesi

Karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde oldukça düzgün korunmuş hepatosit hücreleri ve sinüzoidal yapılar ile normale yakın karaciğer yapısı gözlenmekte. Bazı alanlarda sadece vena sentralis etrafında az da olsa hücreyel infiltrasyon (►) görülmekte.



Şekil 44. Kafeik asit grubu (50 CA+LPS) histolojik incelemesi

Karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde özellikle vena sentralisin etrafındaki hepatositlerde hücreyel dejenerasyon (→) ve portal alanda hücreyel infiltrasyon (►) dikkat çekmekte

TARTIŞMA

Teşhisi ve tedavisi karmaşık bir sendrom olan sepsis, vücudun enfeksiyonlara karşı verdiği çeşitli klinik yanıtlar topluluğu olup yoğun bakımda ilk sıralardaki ölüm sebeplerinden biri olduğu bilinmektedir (192).

Hayvan modellerinin hiçbirinde yoğun bakım ünitelerinde uygulanan destekleyici tedaviye benzer bir durum oluşturmak kolay gözükmemekle beraber sepsis patofizyolojisinin anlaşılmasında, klinik deneme öncesi yeni tedavi protokollerinin (yaklaşımlarının) bulunmasında deneysel modellerin önemi hiç kuşkusuz son derece fazladır. Fakat bütün olumsuzluklara rağmen unutulmaması gereken en önemli nokta insanlar üzerindeki klinik çalışmalar öncesinde, ilaçların hayvan deneylerinde mutlaka denenmesi ve incelenmesi gerekliliğidir (86).

Bu çalışmada sepsis oluşumu için subletal doz endotoksin olarak Gram negatif bakteri hücre duvarı bileşeni olan lipopolisakkarit (1 mg/kg) kullanılmıştır. LPS dozunun düşük olması hiperdinamik fazın² gözlenmesine sebep olur ve insan kompanse sepsis tablosuna benzer bir model oluşur (54).

Sepsiste büyük oranda iyileşme sağlayacak bir tedavi seçeneği henüz bulunmamakla birlikte çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda antioksidan ajanların sepsiste mortaliteyi azaltıcı ve organ yetmezliğini önleyici etkileri gösterilmektedir. (165). Sepsis sürecindeki immün yanıt son derece karmaşık olduğu için, sağ kalımı arttırmada sadece anti-mikrobiyal tedavinin yeterli olmadığı görülmektedir. Özellikle sepsis fizyopatolojisinde mekanizmaların aydınlatılmasıyla olayda rol alan mediyatörler ve sitokinlerin etki mekanizmaları ve vücutta oluşturdukları değişimler ile ilgili çalışmalar sürerken, günümüzde oksidan ajanların rolünün her geçen gün biraz daha anlaşılmasıyla, antioksidan ajanların sepsis ve inflamasyonda koruyucu rol alabileceği düşünülmektedir (165).

Aktive edilmiş immün sistem hücreleri tarafından aşırı miktarda üretilen serbest oksijen radikallerinin (ROS) neden olduğu oksidatif hasarın sepsis patogeneğinde

² İnsan kompanse sepsis tablosunda kardiyak debi artmış, sistemik damar direnci oldukça düşmüştür (hiperdinamik durum).

önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Organizmada oksidatif stresin göstergesi olarak birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA miktarının ölçülmesi mevcut klinik ve deneysel çalışmalarda en çok kullanılan yöntemdir. Lipit peroksidasyonu endotoksin bağımlı hepatik hasarın sorumlusudur ve yıkım ürünleri en fazla karaciğer, akciğer ve plazmada birirmektedir (6).

Bu çalışmada da oksidatif hasar, tiobarbitürik asit mikro plate yöntemi ile serum MDA miktarı ölçülerek gösterilmeye çalışıldı. Çalışmamızda karvakrol, sepsis öncesi koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla 20, 40 ve 80 mg dozlarda sıçanlara gavaj ile 6 gün boyunca düzenli olarak verildi ve LPS i.p. enjeksiyonundan 24 saat sonraki serum örneklerinde MDA düzeyleri çalışıldı. 20 mg/kg karvakrolün sepsisin yol açtığı aşırı MDA üretimini baskıladığı gözlemlendi ve sağlıklı kontrol grubu MDA düzeylerine yaklaştırdığı tespit edildi. Özellikle 40 mg/kg karvakrol uygulaması yapılan grupta ise MDA'nın baskılanması LPS grubuna göre çok ileri düzeyde anlamlı idi. 80 mg/kg dozda ise MDA'nın 20 ve 40 mg/kg doza göre daha az baskılandığı görüldü. Bu durum karvakrolün doza bağlı olarak antioksidan özelliğe sahip olduğunu, düşük dozlarda bu özelliğinin daha kuvvetli olduğunu göstermektedir.

Bazı bitkilerin antioksidan aktivitesi esas olarak aromatik halkaya bağlı bir veya birden fazla hidroksil grupları ya da doymamışlık durumuna dayandırılmaktadır. Bazı çalışmalar oksijene monoterenlerin fonksiyonel gruplarına (alkoller) uygun olarak genellikle antioksidan bileşiklerin bir sınıfı olduğunu bildirmektedir. Karvakrol serbest bir radikal ile tepkimeye girdiğinde zayıf asidik karakter gösterdiği için eşleşmemiş elektron (H^{\bullet}) şeklinde hidrojen atomları verir, bu durumda başka bir radikal üretilir ki molekülün rezonans yapısı tarafından oluşturulan elektron saçılımı ile yapı stabilize edilir (65).

Crimi ve ark sepsisli hastalarda MDA düzeylerinin arttığını, bununla ters ilişkili olarak antioksidan sistemin zayıfladığını bildirmişlerdir (41).

EI-Nekeety ve ark tarafından sıçanlarda aflatoksin ile indüklenen oksidatif strese karşı kekik yağının antioksidan özelliklerini inceledikleri çalışmada aflatoksinin

neden olduğu yüksek MDA düzeylerini % 45 oranında karvakrol içeriğine sahip kekik yağının önemli oranda azalttığını, total antioksidan kapasiteyi artırdığını ve bu etkinin doza bağımlı olduğunu bildirmişlerdir (50).

Aristatile ve ark D-galaktozamin ile karaciğer hasarı oluşturdukları sıçanlarda karvakrolün lipit peroksidasyonunu önemli derecede azalttığı ve anti-oksidan enzimlerin aktivitelerinde de artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar karvakrolün süperoksit radikali ve hidrojen peroksit temizleyici etkisinin enzimatik anti-oksidanların iş yükünü hafifletebileceği ve serbest radikallerin neden olduğu enzim proteini inaktivasyonunu da bu sayede azaltabileceğini öne sürmüşlerdir. Diğer taraftan anti-oksidan savunmada merkezi bir role sahip olan glutatyonun karvakrolle artırılmasında, karvakrolün radikal temizleyici etkisinin olduğu savunulmaktadır (13).

Guimarães ve ark tarafından *in vitro* ortamda karvakrolün peroksil radikallerini temizleme yeteneğini test ettikleri çalışmada 1 ng/mL kadar düşük konsantrasyonlarda karvakrolün peroksil radikali temizleme yeteneğine sahip olduğu belirtilirken yine *in vitro* ortamda 1 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda lipoperoksidasyon koruyucu yeteneğinin olduğu bildirilmiştir. Karvakrol hidrofobik yapıda olduğu için spesifik tiobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ölçüm yönteminde olduğu gibi lipitçe zengin bir sistemde lipit türevleriyle güçlü bir şekilde etkileşime girer (65).

Karimian ve ark tarafından kekik benzeri bir bitki olan *Zataria multiflora*'da esansiyel yağ içeriğinde karvakrolün en yüksek olduğu türünün antioksidan aktivitesinin diğer türlerindeki aktiviteden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (99).

Canbek ve ark karaciğerde iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı üzerinde karvakrolün etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada karvakrolün I/R'nin yol açtığı MDA artışını düşürdüğünü bildirmişlerdir (28).

Dietilnitrozamin ile hepatoselüler karsinoma oluşturulan sıçanların serum ve karaciğer doku örneklerinde karsinoma öncesi ve sonrasında tek doz (15 mg/kg) karvakrolün oksidatif stres etkeni lipit peroksitlerini önemli düzeyde azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum serbest radikal üretimini temizleme yeteneğinin muhtemelen karvakrolün lipit peroksidasyonunu önleyici etkisine aracılık ettiğini gösterebilir (89).

Karvakrol içeriği zengin esansiyel yağların en az askorbik asit, butil hidroksitoluen (BHT) ve vitamin E kadar güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (4, 117). Bununla birlikte karvakrolün antimikrobiyal (20), antitümör (100), antimutajenik (83), antigenotoksik (84) etkilerini bildiren çalışma sonuçları da bildirilmektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlar sepsiste endotel ve organ hasarına yol açan lipit peroksitlerinin karvakrol tarafından doza bağlı olarak önemli düzeyde azaldığı yönünde olup mevcut yapılan çalışmalar ile uyumluluk göstermekte ve karvakrolün antioksidan sonuçlarını *in vivo* olarak doza bağımlı desteklemektedir.

KontROLSÜZ akut inflamatuvar cevap organ hasarı ve ölüme kadar ilerleyebilen sepsis tablosu olarak tanımlanmaktadır (105). Bakteriyel patojenin vücut tarafından tanınması ardından akut inflamatuvar cevabı getirir. Patojenle ilk karşılaşan nötrofil, makrofaj gibi fagositik bağışıklık sistemi hücreleri bakteriyel bileşeni tanıyarak aktif hale geçer ve pro-inflamatuvar sitokinler olarak adlandırılan TNF- α , IL-6, IL-1 gibi sitokinleri üretirler ve böylece enfeksiyon bölgesine hem daha çok fagositik hücrenin toplanmasını hem de aktive olmalarını sağlarlar (43).

Septik süreçte TNF- α ve IL-6'nın rol oynayabileceğini öne süren çeşitli çalışmalar mevcuttur. IL-6 ve TNF- α bazı türlerde akut faz cevabın verilmesi ve ardından sepsis benzeri semptomların ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Yine bazı türlerde endotoksik şok durumlarında IL-6 ve TNF- α düzeylerinin çok yükseldiği ve bu süreçte hayatta kalma süresi ile negatif korale olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (109).

Bu çalışmada sepsis bulgularının kan düzeyinde incelenmesi için IL-6 ve TNF- α konsantrasyonlarını ve karvakrolün doz durumuna göre bu sitokinler üzerindeki etkisini inceledik. TNF- α düzeylerinin 20, 40 ve 80 mg karvakrol verilen gruplarda sepsis grubuna göre çok ileri düzeyde azaldığını tespit ettik. Ancak karvakrol doz grupları arasında bu düşüş açısından istatistiki bir fark bulamadık. Üç doz grubunda da TNF- α 'nın sepsis grubundaki düzeyinden sağlıklı ve sham grubu düzeylerine kadar azaldığını tespit ettik. Pro-inflamatuvar bir sitokin olan TNF- α 'nın sepsis sürecinde önemli bir rol

oynadığı verilerle doğrulanmakla beraber karvakrolün TNF- α üzerindeki inhibe edici etkisi çalışmamızda en düşük ve en yüksek dozda aynı olduğundan inhibisyonun karvakrol grupları içinde dozdan bağımsız olduğu görülmektedir.

Carrageenan (kırmızı su yosunu ekstraktı) ile indüklenen inflamasyon çalışmasında karvakrolün nötrofil aktivasyonu ve enfeksiyon bölgesinde toplanmasını doza bağımlı olarak baskıladığı aynı şekilde inflamasyonda önemli bir mediyatör olan nötrofil kaynaklı TNF- α salınımının karvakrolün nötrofiller üzerindeki etkisine bağlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (66). Nötrofiller TNF- α gibi çeşitli pro-inflamatuar sitokin salınımı ve prostaglandinler gibi mediyatörler üzerinden inflamasyona bağlı ağrı oluşumunda rol oynamaktadır (101).

Bu durum dikkate alındığında nötrofil göçünün inhibe edilmesiyle inflamasyonda ve inflamasyona bağlı ağrıda karvakrol pro-inflamatuar sitokin salınımını baskılayarak iyileştirici etki gösterebilir. Çalışma verilerimize dayanarak karvakrolün anti-inflamatuar etkisi, TNF- α 'nın karvakrol gruplarında azalması ile açıklanabilir.

İnterlökin-6, T hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen, deneysel içeriğe bağlı olarak pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin olarak etki gösterebilen bir sitokindir. Lipopolisakkarit ile indüklenen sepsis modelinde 24 saat sonraki IL-6 düzeyleri sepsis grubunda tüm gruplardan daha yüksekti. Ancak karvakrol grupları arasında 6 günlük 40 mg karvakrol uygulamasının IL-6 düzeylerini önemli düzeyde düşürdüğünü tespit ettik. 20 mg karvakrol uygulamasında ise diğer karvakrol gruplarına göre istatistiki bir değişiklik olmazken sağlıklı ve sham gruplarına göre IL-6 düzeyleri yüksekti. Karvakrol uygulamasının IL-6 düzeyleri üzerindeki en anlamlı sonucu 40 mg/kg dozda elde edildi. Bu durum karvakrolün, TNF- α düzeyleriyle paralellik göstermekle birlikte doz bağımlı olarak septik süreçteki IL-6 düzeylerini azalttığını göstermektedir.

Sepsis sürecinde rol oynayan pıhtılaşma faktörleri, kompleman ve diğer akut faz proteinleri, sitokinler, kemokinler ve nitrik oksit sentaz genleri promotör bölgelerinde NF- κ B bağlanma bölgesi taşımaktadır (42,150). Çeşitli bitki ekstrelerinin, NF- κ B'nin

çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifadenmesini inhibe etmesi, inflamasyonun baskılanmasında muhtemel bir mekanizma olabilir. Nitekim bu bitki türlerinin esansiyel yağ içeriğinin büyük çoğunluğunu *timol ve karvakrol* oluşturmaktadır (27).

Cho ve ark tarafından yüksek yağlı diyet ile beslenen farelere % 0,1 karvakrol destekli diyet uyguladıkları bir çalışmada obeziteye bağlı inflamasyon durumunda sitokin üretimini incelemişlerdir. Çalışmada TLR reseptörlerinin doğal bağışıklığın patojenlere karşı gelişiminde ve pro-inflamatuar sitokin salınımını başlatmada önemli olduğunu vurgulamışlardır. Karvakrolün, TLR2 ve TLR4 ekspresyonlarını baskılayıp, NF-κB'nin çekirdek içine translokasyonunu engelleyerek TNF-α ve IFN-α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimin azaltıcı etkisiyle inflamasyonu düzeltebileceğini göstermişlerdir (34).

Belirli oranlarda *Thyme ve Oregano* esansiyel yağ kombinasyonunun kolit fare modelinde pro-inflamatuar sitokinlerden IL-1β, IL-6, GM-CSF ve TNF-α mRNA düzeylerini azalttığını gösteren bir çalışmada; özellikle esansiyel yağ içeriğinin orta dozunda (2000 ppm *Thyme* + 1000 ppm *Oregano*) bu etkinin görüldüğünü bildirmişlerdir. Daha düşük ve daha yüksek dozlarda bu sitokinler üzerindeki etkinin daha az olduğu görülmüştür (27).

Sıçanlarda oleik asitle oluşturulan akut akciğer hasarında ve parsiyel hepatektomi yapılmış sıçanlarda TNF-α ve IL-6 düzeylerinin karvakrol verilen ve verilmeyen gruplar arasında farklılık oluşturmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (133, 180). Ancak bu çalışmalar organ bazında inflamasyon süreci ve organın rejenerasyon düzeyini incelediklerinden genel bir inflamasyondaki sonuçları yansıtmayabilir. Çalışmamızda ise birincil hedef sistemik bir sepsis oluşturmak ve bu durum üzerinde karvakrolün etkinliğini göstermektir.

Araşidonik asit metabolizmasının sepsis sürecine etkisi siklooksijenaz enzimleri üzerinden daha iyi bilinmekle birlikte birçok farmakolojik uygulama bu enzimlerin inhibisyonuyla işlev göstermektedir. Ancak lipoksijenaz yolağının inflamasyon süreci içerisindeki yeri net değildir. Lipoksijenaz enzimatik aktivitesi sonucu oluşan lökotrienler içerisinde LTB₄, çok güçlü bir kemotaktik ajandır ve endotele lökosit

adezyonunu destekler. Enfeksiyon bölgesine hızlı bir lökosit göçünden sorumludur. LOX aktivitesi üzerine karvakrolün etkilerini değerlendirdiğimiz bu çalışmada karvakrol doz grupları da dahil olmak üzere, sham grubu hariç, sepsisli grupta LOX aktivitesinin değişmediğini gözlemledik. Deneyde karvakrole karşılık pozitif kontrol olarak kullandığımız kafeik asit grubunda düşüş görülmekle birlikte gruplar arası anlamlı değildi. Ancak % 5 DMSO verilen sham grubunda LOX aktivitesi pozitif kontrol kafeik asit grubuna göre yüksekti. **Zaitso ve ark** tarafından insan HL-60 hücre kültüründe yapılan bir çalışmada DMSO'nun 5-LOX mRNA düzeyini artırdığını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada DMSO'nun LTC₄ ve LTB₄ üretimini artırırken, cPLA₂ mRNA ekspresyonunun azaldığını tespit etmişlerdir (193).

Brock ve ark tarafından dişi Wistar ratlardan izole ettikleri peritonel makrofajlarda (PM) LPS'nin lökotrien sentezine etkilerini inceledikleri bir çalışmada, 16 saat boyunca LPS'siz ortamda inkübe edilen PM'lerin kalsiyum iyonofor ile akut uyarılmasıyla çeşitli eikozanoidleri sentezlediğini bildirmişlerdir. LPS (1 µg/mL) içeren ortamda gece boyu inkübe edildiğinde ise 5-LOX ürünlerinde (LTB₄ ve 5-HETE) ciddi bir azalma olmasına karşın PGE₂ ve prostasiklin sentezinde baskın bir artış olduğunu rapor etmişlerdir. Lipoksijenaz ürünlerindeki azalma LPS maruziyet süresine ve kültür ortamındaki LPS konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Lipoksijenaz ürün oluşumunun baskılanması belirgin olarak LPS verilmesini takiben 6 – 9. saatlerde görülmeye başlanmıştır. Peritonel makrofajlardan LT üretiminin baskılanması oldukça düşük LPS dozlarında (0,1 ng/mL) etkili olmaya başlarken PGE₂ sentezi ise tam tersine düşük dozlarda ciddi artış göstermiştir. LPS'ye uzun süreli maruziyet prostaglandinler yönüne üretim artışına yol açarken hem prostasiklinler hem de PGE₂ lökosit fonksiyonlarını baskılar, lenfosit ve makrofajlardan sitokin üretimini inhibe eder. Yine bu maruziyete bağlı olarak eksprese edilen iNOS ve NO, PM'den LT sentezini inhibe ederler (25).

Coffey ve ark tarafından alveolar makrofajlarda, uzamış LPS maruziyetinin iNOS ve NO sentezinin indüklenmesi yoluyla hücrel 5-LOX metabolizmasının baskılandığı bildirilmiştir. Ancak LPS'nin rat alveolar makrofajlarda tek başına lökotrien sentezini inhibe etmede yetersiz olduğu, LPS ile birlikte IFN-γ'nın iNOS'u

artırarak lökotrien sentezinin baskılandığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada çekumun bağlanması ve delinmesiyle oluşturulan *in vivo* sepsis modelinde alveolar makrofajlarda iNOS indüklenirken lökotrien sentezinde bir azalma tespit edilmiştir. Araştırmacılar 5-LOX metabolizmasındaki azalmanın iNOS bağımlı olduğunu savunmuşlardır (36).

Uygulanan deneysel sepsis modelinin LPS dozuna ve 24 saatlik süreye bağlı olarak lipoksijenaz aktivitesini değiştirmediğini düşünmekteyiz. Ayrıca enzimatik aktiviteden ziyade, mikroorganizmaların öldürülmesi, fagositik aktiviteyi artırmaları ve enfeksiyon bölgesinde bulunmaları nedeniyle inflamatuvar koşullarda lökotrienlerin ölçülmesi daha iyi sonuç verebilir. Sepsis oluşturduğumuz gruplarda nitrik oksit son ürünü nitrit miktarının sağlıklı gruplara göre yüksek olması iNOS aktivitesinin sepsiste artışıyla birlikte NO'nun lipoksijenaz aktivitesini baskıladığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda karvakrolün lipoksijenaz enzimatik aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı görülmektedir. Karvakrolün enzim üzerinde *in vivo* etkisini değerlendirebileceğimiz herhangi bir literatür verisi mevcut olmadığından sonuç karşılaştırılması yapılamamıştır. Ayrıca deneysel aşamada enzimatik aktiviteyi çalıştığımız biyokimyasal yöntem standardize edilmiş olmakla birlikte peroksidaz aktivitesi içeren örneklerde ölçüm sırasında oluşacak lipit hidroperoksitlerinin peroksidaz aktivitesiyle azalabileceği ve böylece düşük absorbans elde edilmesine sebep olabileceği belirtilmiştir.

Lipopolisakkarit ile indüklenen sepsis sürecinde karaciğer önemli bir yer tutar. Bu çalışmada karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla ALT ve AST düzeyleri ölçüldü. Sepsis grubunda (1 mg/kg) 24 saat sonra karaciğer ALT düzeyleri tüm gruplardan daha yüksekti. Karvakrol doz gruplarında ise ALT düzeyleri sepsis grubuna göre oldukça düşüktü. Bu durum inflamasyon gerçekleşmeden önce karvakrol alımının karaciğer üzerinde inflamasyonunun zararlı etkilerini en aza indirdiğini gösterebilir.

Nitekim histolojik veriler de bu sonucu doğrulamaktadır. Karvakrol verilen gruplarda karaciğer dokusunun septik gruba göre daha iyi korunduğu görülmektedir. 40 ve 80 mg karvakrol dozunda karaciğer parankim yapısının sağlıklı gruba yakın bir

görünümde olduğu tespit edilmiştir. 20 mg karvakrol grubunda daha fazla hücresel infiltrasyonların olduğu izlenmiş ve bu durum 20 mg karvakrol dozunun karaciğeri diğer dozlara göre daha zayıf koruduğu yönünde bilgi vermiştir.

Aflatoksin ile karaciğerde oluşturulan oksidatif stres üzerine kekik yağının etkilerini izlemek amacıyla yapılan bir çalışmada düşük doz kekik yağı diyetiyle (5 mg/kg) beslenen sıçanlarda hepatositlerin daha az vakuoler dejenerasyona uğradığı, yüksek dozda ise (7,5 mg/kg) karaciğer dokusunun aflatoksinin verdiği hasardan sonra ciddi derecede iyileştiği ve hepatositlerin normale döndüğü izlenmiştir (50).

Ancak çalışmada dikkat çekici bir diğer nokta lipoksijenaz pozitif inhibitörü olarak karvakrolle aynı sürede kullandığımız 50 mg kafeik asitin karaciğeri septik etkiden korumada karvakrol kadar etkili olmadığını histolojik olarak gözlemlememizdir. Biyokimyasal olarak kafeik asit verilen grubun ALT düzeylerindeki yükseklik te hepatik hasarın önlemediğini göstermektedir.

AST'den ziyade serumda düzeyleri yükselmiş olan ALT karaciğerin yapısal bütünlüğünün bozulduğunun daha spesifik bir göstergesidir. Çünkü bu enzimler sitoplazmik ve mitokondriyal yerleşimlidir ve hücresel hasar sonrasında dolaşıma geçerler (5).

Aristatile ve ark tarafından hepatotoksisite oluşturdukları bir çalışmada hasardan sonra 20 gün boyunca ratlara 20, 40 ve 80 mg dozlarda karvakrol uygulaması yapılmıştır. ALT, AST enzim düzeylerindeki düşüşü dikkate alarak karvakrolün hepatoselüler membran bütünlüğünü koruyabilirliğini tartışmışlardır (13).

Jayakumar ve ark yaptığı bir çalışmada sıçanlarda hepatoselüler karsinomada karvakrolün koruyucu etkisini araştırmışlardır. Karvakrolün parenkimal hücre yenilenmesini sağladığı ve böylece karaciğer hücre membran bütünlüğünü koruduğunu bildirmişlerdir. Bu sayede hepatoselüler enzimlerin dolaşıma sızıntısı minimuma indirgenmektedir (89).

Uyanoğlu ve ark tarafından parsiyel hepatektomi yapılan sıçanlarda 73 mg/kg (i.p) tek doz karvakrol uygulamasının karaciğer yenilenme oranını artırdığını ancak ALT ve AST düzeyleri açısından bir farklılık oluşmadığını bildirmişlerdir (180).

Seruloplazmin antioksidan ferrokسيداز aktivitesine sahip bakır (Cu^{+2}) içerikli bir proteindir. Oysa seruloplazmin Cu^{+2} metabolizması ve taşınmasıyla ilişkili değildir. Seruloplazmin aynı zamanda bir ferrokسيدazdır ve ferrokسيدaz aktivitesi proteinin önemli bir fonksiyonudur. Çünkü eser miktarda serbest demir, fenton reaksiyonu üzerinden hidroksil radikali üretebilir ve bu durum hücrenel yapıya zarar verebilir. Seruloplazminin ferrokسيدatif aktivitesi toksik ferröz iyonunu daha az toksik ferrik iyon haline dönüştürür ve böylece lipitler, proteinler ve DNA'nın oksidatif hasarı en aza indirgenmiş olur (74).

İnflamatuvar bir durum olan kronik renal yetmezlikte seruloplazminin akut faz proteini olarak artması beklenen bir durum olmasına rağmen seruloplazmin düzeylerinin kontrole göre ciddi derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) seruloplazmine bakır bağlanmasını bozabileceği, böylece seruloplazminin normal koruyucu etkilerini engelleyebileceği muhtemel düşünüşün bir nedeni olarak gösterilmektedir (104).

Malarya etkeni parazit ile enfekte farelerde yapılan bir çalışmada seruloplazmin düzeylerinin enfekte farelerden alınan serum örneklerinde 0 – 6. günler arasında enfekte edilmeyen farelerdeki düzeylerinden farklı olmadığı tespit edilmiştir (175).

Sütten kesilen tavşanlarda *E.coli* enfeksiyonu ile oluşturulan deneysel inflamasyon modelinde, tavşanlarda *E.coli* inokülasyonundan sonraki 24 saat boyunca ciddi haptoglobin artışı gözlenirken, başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında fibrinojen ve seruloplazmin düzeylerindeki artış inokülasyondan sonraki 3. günde tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu veriler, seruloplazminin bakteriyel enfeksiyona cevaben yavaş pozitif akut faz proteini olabileceğini göstermektedir. Oysaki mevcut veriler seruloplazminin akut faz proteini olarak inflamatuvar durumlarda yükseldiğini ve LPS dozundan etkilendiğini göstermektedir: düşük ve orta düzeyde LPS'nin bu proteini

etkilemeyeceğini fakat intravenöz yüksek doz LPS (1 µg/kg)'nin önemli varyasyonları tetikleyebileceği tespit edilmiştir (60).

Deneysel aşamada oksidaz aktivitesini test ettiğimiz seruloplazminin LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra septik, sağlıklı ve sham grupları arasında bir değişim göstermediği görülmektedir. LPS dozu, veriliş şekli ve inflamasyon süresinin önemli olduğu dikkate alınacak olursa sonuçlar **Georgieva ve ark** (60) ile **Taylor-Robinson**'nun (175) verileriyle örtüşmektedir.

Sepsis oluşturduğumuz grupta oksidatif parametre olarak değerlendirdiğimiz MDA düzeylerinin diğer gruplara göre yüksek olması dikkate alınacak olursa oksidan – antioksidan dengenin inflamasyonda oksidanlar yönüne kaydığı görülmektedir. Bu durum başta karaciğer olmak üzere birçok hücre ve doku üzerinde yıkıcı sonuçlar oluşturabilir. Karvakrol verilen gruplarda MDA düzeylerinin önemli derecede düşüşü mevcut durumu tekrar antioksidanlar yönüne kaydırmaktadır. 20 mg karvakrol dozunda seruloplazmin oksidaz aktivitesi septik grup başta olmak üzere diğer gruplardan önemli derecede yüksekti. 40 ve 80 mg karvakrol doz grupları kendi aralarında fark olmaksızın septik gruba göre seruloplazmin düzeylerini artırmıştır. Bu durum karvakrolün bir akut faz proteini ve anti-oksidan özellikteki seruloplazminin oksidaz aktivitesini artırmada düşük dozlarda daha etkili olduğunu göstermektedir.

Kang ve ark tarafından aerobik koşullarda bir radikal öncülü olan AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid) ile üretilen peroksil radikalinin seruloplazminin oksidatif modifikasyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada açığa çıkan AAPH-kökenli ROS'un seruloplazminin ferroksidaz aktivitesini kaybetmesine ve proteinin kümelenmesine neden olduğunu bildirmişlerdir (94). Bu bilgi doğrultusunda sepsisin patolojik bir sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stresin seruloplazminin yapısal ve enzimatik aktivitesini etkilediği söylenebilir.

Çalışmalarda seruloplazminin inflamasyonun geç döneminde akut faz proteini olarak arttığının bildirilmesi ve karvakrolle aktivitesinin ilk 24 saat içinde artıyor olması seruloplazminin bu sürece akut faz proteinden ziyade anti-oksidan olarak katkı sağladığı yönünde bilgi verebilir.

Karvakrol fenolik bir madde olarak antioksidan özellik taşımaktadır. Bu özelliği ile karvakrolün hücrel yapıyı tehdit edecek boyutta artan ROS türlerini hem kendinin azaltması (13) hem de azaltmada görev alan proteinleri artırması (13,89) septik süreçte etkisini inflamatuvar oksidatif stresi azaltacak yönde gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.

Arjinaz/Nitrik oksit yolağı bu yolakta rol oynayan iki enzim; Arjinaz ve NOS, substrat olarak arjinini ortak kullanmaları sebebiyle, substrat düzeyinde birbiriyle yarışır. Arjinin aminoasiti immün sistemde merkezi bir konumdadır ve metabolizması özellikle T lenfositler ve makrofajlar için gereklidir. Arjinin sistemik inflamatuvar yanıt oluşumuna iki temel mekanizma üzerinden etki eder. Bunlardan biri indüklenbilir NOS enzimi aracılığıyla nitrik oksit oluşumu ve diğeri normal T lenfosit fonksiyonu ve proliferasyonu için arjinin kullanılmasıdır. Bu noktada farklı bir metabolizma ile de arjinin inflamatuvar yanıtta rol sahibidir. Arjinaz izoenzimlerinin biri veya her ikisinin birden uyarılması arjininden ornitin üretimine yol açar ve ornitin, yara iyileşmesi ve onarımı, hücrel yenilenme gibi durumlarda prolinin prekürsörüdür. Bu yolağın ilerleyen basamaklarında oluşan poliaminler ise makrofaj fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alırlar. Yine bu yolak arjinin kullanımını sınırlandırarak aşırı nitrik oksit üretiminin de önüne geçilmesini sağlar (18).

Distal bir inflamatuvar mediyatör olan nitrik oksidin, septik şok sırasında arttığı pek çok çalışmada gösterilmekle birlikte nitrit/nitrat (NOx) düzeyleri septik hayvanların vücut sıvılarında yüksek bulunmuş ve bakteri veya bakteriyel endotoksin verilen deney modellerinde de yükseldiği gösterilmiştir (99).

Çalışmamızda ansitabil NO'nun son ürünü olarak total nitrit düzeylerini değerlendirdik. Sepsis grubunda NO düzeylerinin sağlıklı ve sham gruplarına göre önemli düzeyde arttığını tespit ettik. Bu veri NO'nun sepsiste önemli bir yeri olduğunu desteklemektedir.

Karvakrol uygulanan gruplarda 80 mg karvakrol dozu NO düzeylerini ciddi derecede azalttı. Aynı şekilde 40 mg doz uygulaması da NO'yu azaltsa da sağlıklı ve sham grupları düzeylerine göre daha yüksekti. 20 mg karvakrol uygulaması ise NO'u yüksekliğini düşürmede diğeri iki doz kadar yeterli değildi. Arjinaz aktivitesi ise sepsis

grubunda diğer gruplara göre artış göstermekle birlikte sadece 80 mg karvakrol dozu sepsis indüklü arjinaz oluşumunu azaltmada yeterliydi. Ancak bu düşüş diğer gruplar arasında önemli değildi. Bu veriler de bize yine karvakrol dozunun daha çok NO üzerinde olmak üzere arjinaz aktivitesi üzerinde de baskılayıcı olabileceğini göstermektedir. Deneysel sonuçlarımız daha önceki verileri desteklemektedir ve septik grubumuzda NO düzeyleri sağlıklı ve sham gruplarına göre yüksekti.

İnsan lökositlerinde farklı esansiyel yağların nitrik oksit üzerine etkilerinin denendiği bir çalışmada karvakrolün NO üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (142).

Guimaraes ve ark tarafından karvakrolün antioksidan özelliklerinin değerlendirildiği *in vivo* bir çalışmada karvakrolün nitrit üretimini azalttığı ve karvakrolün NO – temizleyici bir ajan olarak rol üstlendiği bildirilmiştir. Bazı ROS (özellikle süperoksit) ürünleri ve NO arasındaki reaksiyon genellikle hızlı bir şekilde cereyan eder ve bazı hücrelerde NO – tetiklemeli biyolojik etkilerin durdurulmasına yol açar. Bununla beraber bazı ROS türevleri ve NO kombinasyonu peroksinitrit oluşumuna yol açar ki bu ürün fizyolojik pH’da güçlü bir oksidan özelliğe sahiptir. Araştırmacıların çalışmasında karvakrolün 100 µg/ml ve 1 mg/ml düzeylerde nitrit düzeylerini azaltması da yine doza bağımlı bir etkiyi göstermektedir (65). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan daha ileri bir çalışmada LPS ile muamele edilen makrofajlarda NO üretiminin karvakrol tarafından baskılandığı tespit edilmiştir. Ancak burada karvakrolün NO üzerindeki azaltıcı etkisi, karvakrolün PPAR (peroksizom proliferatör aktive edici reseptör) aktivasyonu üzerinden NF-κB’nin transkripsiyonunun durdurulmasına bağlanmıştır. Böylece bu inhibisyon da iNOS’un azalmasına yol açarak NO sentezini yavaşlatabilir. Daha önceki çalışmalarına atfen savundukları NO-temizleyici etkide karvakrolün bu yol üzerinden daha etkin olabileceğini belirtmişlerdir (66).

Hotta ve ark tarafından karvakrolün anti-inflamatuar etkilerinin altında yatan mekanizmalar üzerine *in vitro* ortamda U937 insan makrofaj benzeri hücre kültüründe inceledikleri çalışmada karvakrolün PPAR α ve γ aktive ederek COX-2’yi baskıladığı tespit edilmiştir (78).

Çeşitli inflamatuvar durumlarda düzeyleri artan radikallerin (süperoksit gibi) nükleer transkripsiyon faktörü olan NF-κB'yi aktive ederek inflamatuvar mediyatörlerin salınımı uyardıkları bilinmektedir. Bu durumda karvakrolün inflamasyonu geriletici etkisinde metabolik yollardaki proteinler üzerine doğrudan ya da radikalleri ortamdaki uzaklaştırarak ilgili proteinlerin üretimini azaltıp dolaylı etki gösterip göstermediği açık değildir. Karvakrolün PPAR ve NF-κB yolağı üzerinde etkisi mevcut çalışmalarda görülmekle beraber bu verilerin daha ileri *in vivo* araştırmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Lipopolisakkarit ve sitokinlerle uyarılan makrofajlarda arjinaz aktivitesinin arttığı bilinmekle birlikte izoenzimlerin inflamasyon sürecinde artışları farklıdır. iNOS ve arjinaz II LPS verilen RAW 264.7 makrofajlarda birlikte indüklenmektedir (63, 185). Fakat *in vivo* rat akciğerinde LPS sonrası iNOS ile birlikte arjinaz I'in indüklendiği de belirtilmiştir (170). Ancak arjinaz II inflamasyonda erken aşamada uyarılırken, arjinaz I geç aşamada uyarılmaktadır. Arjinaz II'nin uyarılması daha çok doku ve hasarlı bölgede hücrelerin yenilenmesi için gerekli hücrel aktivatörleri etkilerken arjinaz I aktivitesi NO üretiminin aşırı üretimini kontrol altında tutmakta görev yapabilir (125).

Hem NO'nun hem de arjinazın 80 mg karvakrol verilen grupta düşüş göstermesi karvakrolün anti-inflamatuvar etkisinin bir başka göstergesi olabilir. Sepsis grubunda arjinaz aktivitesi ve NO üretiminin artması beklenen bir durum olmakla birlikte arjinazın iNOS ile birlikte uyarıldığına bir kanıtı olabilir. Böylece NO'nun meydana getireceği zararlı durumlar hücre tarafından arjinin her iki enzim arasında dengeli kullanımına bağlı olarak engellenmiş olabilir.

Karvakrol çalışmalarında etkiler iyileştirici yönde fikir oluştursa da bazı çalışmalar dozun önemli olduğunu bildirmişlerdir. Karvakrolün doz etkilerine dair *in vivo* çalışma verileri kısıtlıdır. **Azirak ve Rencuzogullari**'nin karvakrolün *in vivo* genotoksik etkilerini değerlendikleri bir çalışmada sıçan kemik iliği hücreleri üzerinde doza bağımlı olarak karvakrolün genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek kromozom anomali yüzdesi ve total kromozom anomalisinin 70 mg/kg dozda 12 saatte olduğu belirtilirken, 50 ve 70 mg/kg dozda 24 saatte kromozom anomali sayısının en yüksek olduğu tespit edilmiştir (17). **Aydın ve ark**

tarafından yapılan bir çalışmada karvakrolün toksik olmayan dozlarda (< 0,05 mM) lenfositleri heterosiklik amin IQ ve mitomisin C'nin genotoksik etkilerinden koruduğu belirtilirken en yüksek karvakrol konsantrasyonunda (0,1 mM) kendisinin DNA hasarını indüklediği tespit edilmiştir (16).

Çalışmamızda kafeik asit grubunu karvakrolün lipoksijenaz üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla pozitif kontrol olarak (88,112) deneye dahil ettik. Kafeik asit verilerini incelediğimizde bu grupta MDA düzeylerinin düşük, seruloplazmin düzeylerinin yüksek olması kafeik asitin anti-oksidan etkisinin olabileceğini göstermektedir. Ancak histolojik veriler üzerinden kafeik asitin karaciğerdeki iyileşme sürecine etkisinin çok az olduğunu söyleyebiliriz. Kafeik asitin çalışmamızda hedef olarak sadece lipoksijenaz aktivitesi üzerindeki etkinliği dikkate alınmıştır.

Elde ettiğimiz verilere göre kekik başta olmak üzere birçok bitkinin fenolik yapıda uçucu bileşeni olan karvakrol, septik süreçte antioksidan ve anti inflamatuvar etki göstermekte ve bu özelliği sepsiste rol oynayan parametreler üzerinde doza göre değişmektedir.

Özetle oksidatif stres belirteci MDA'nın yükselen düzeylerinde azalma ve seruloplazmin oksidaz aktivitesinde artma, pro-inflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-6 düzeylerinde düşüş, histolojik inceleme verileriyle korale olarak ALT düzeylerindeki azalma karvakrolün sırasıyla anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve hepatoprotektif etkilere sahip olduğunu gösterebilir. Bu deneysel çalışma verileri karvakrol başta olmak üzere diğer esansiyel uçucu yağlarla ilgili araştırmalara önemli bir katkı sağlayabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sepsiste mortalite ve morbiditeyi en aza indirebilmek için erken tanı konulması ve uygun tedaviye derhal başlanması gerekmektedir. ‘Erken hedefe yönelik tedavi’ olarak adlandırılan hemodinamik destek tedavisinin sepsisin ilk 6 saati içerisinde uygulanması; uygun antimikrobiyal tedaviyle birlikte mortaliteyi azaltıcı ve prognozu iyileştirici en önemli tedavi yaklaşımıdır. Bunların dışında sepsiste büyük oranda iyileşme sağlayacak bir tedavi seçeneği henüz bulunmamaktadır. Sepsisteki kötü gidiş ve mortaliteden asıl sorumlu olan aşırı ve düzensiz immün yanıtı kontrol etmek ve önlemek amacıyla günümüze kadar sepsis kaskatının değişik basamaklarını hedefleyen birçok antiendotoksin, antiinflamatuvar ve immünmodülatör tedavi denenmiştir (165).

Sepsis çalışmalarında her ne kadar insan modeli dikkate alınsa da sepsis oluşturma protokolü farklılığı, hayvanın cinsiyeti ve *in vivo* *in vitro* çalışma ortamı, karvakrolün dozu, sıçana veriliş yöntemi (*i.p.*, gavaj, diyetek), sonuçlar arasında farklılık oluşturabilir.

Masif oksidatif stresin arttığı durumlarda hastanın bitkisel kaynaklı antioksidan tedavi alması gerek masrafının ucuzluğu, gerekse olumsuz etkilerin tersine çevrilmesi açısından faydalı olabilir.

Karvakrol çalışmalarının büyük çoğunluğu *in vitro* ortamda yapılmakla birlikte *in vivo* çalışmalar oldukça azdır. Bu nedenle antioksidan, sitotoksik vb. diğer biyolojik etkileri doğrudan *in vivo* çalışmalarda gözlemlemek daha güvenilir sonuçlar verecektir.

Seruloplazmin oksidaz aktivitesinin artması, MDA oluşumunun baskılanması, anti-oksidan, arjinaz/NO yolağının inhibe edilmesi, TNF- α ve IL-6 düzeylerinin azaltılması ise karvakrolün anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu destekleyen bulgulardır. Aynı zamanda histolojik verilerle de karvakrolün doz düzeyinde hepatoprotektif etki gösterdiği açıkça belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde karvakrolün 40 ve 80 mg dozlarda hem biyokimyasal hem de histolojik bulgular açısından anti-oksidan ve anti-inflamatuvar etkilerinin olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak karvakrol yaşam boyunca karşılaşılabilecek çeşitli inflamatuvar durumlar karşısında immün fonksiyonların korunması ve desteklenmesi, oksidatif hasarın azaltılması, inflamatuvar durumun düzeltilmesi amacıyla faydalı olabilir. Ancak bu bilgilerin klinik ve insan deney çalışmalarıyla desteklenmesi sonuçların güvenilirliğini artırmada fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., 2007, Temel İmmünoloji, İmmün sistemin işlev ve bozuklukları, İstanbul medikal yayıncılık, İstanbul, 34-35 s.
2. Abbas A.K., Lichtman A.K., Rober J.S., (Eds).,1997, Cytokines. Cellular And Molecular Immunology 3 nd Ed. Philedelphia: WB Saunders Company, 249–278 p.
3. Abraham E., 2000, NF-kappaB activation, Crit Care Med, 28, 4 Suppl, N100-4 p.
4. Aeschbach R., Löliger J., Scott B.C., Murcia A., Butler J., Halliwell B., Aruoma O.I., 1994, Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol, Food Chem Toxicol., 32, 1, 31-6 p.
5. Ahmed M.B., Khater M.R., 2001, Evaluation of the protective potential of Ambrosia maritima extract on acetaminophen-induced liver damage, J Ethnopharmacol., 75, 2-3, 169-74 p.
6. Akın B., Settar B., Nilüfer E., Okan H., Gülhan Ö., Ayşe D., Atila K., 1999, The role of oxygen free radicals in an experimental sepsis model, The Turkish Journal of Gastroenterology, 10, 4, 427-431 p.
7. Akira S., Takeda K., 2004, Toll-like receptor signalling, Nat Rev Immunol, 4, 7, 499-511 p.
8. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O., 2006, Pathogen recognition and innate immunity, Cell, 124, 4, 783-801 p.
9. Alexander C., Rietschel E.T., 2001, Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, J Endotoxin Res, 7, 3, 167-202 p.
10. Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S., Chinou I.B., 2001, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species, J Agric Food., 49, 9, 4168-70 p.
11. Altıntaş D.Ö., İskit, A.T., 2005. Sepsis Tanısı, Yoğun Bakım Dergisi, 5, 2, 85-91 s.
12. Aristatile B., Al-Numair K.S., Al-Assaf A.H., Pugalendi K.V., 2011, Pharmacological effect of carvacrol on D-galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis, J Nat Med., 65, 3-4, 568-77 p.

13. Aristatile B., Al-Numair K.S., Veeramani C., Pugalendi K.V., 2009, Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats, *Fundam Clin Pharmacol.*, 23, 6, 757-65 p.
14. Ash D.E., 2004, Structure and function of arginases, *J Nutr.* 2004, 134, 10 Suppl, 2760S-2764S p.; discussion 2765S-2767S p.
15. Atreya R., Mudter J., Finotto S., Müllberg J., Jostock T., Wirtz S., Schütz M., Bartsch B., Holtmann M., Becker C., Strand D., Czaja J., Schlaak J.F., Lehr H.A., Autschbach F., Schürmann G., Nishimoto N., Yoshizaki K., Ito H., Kishimoto T., Galle P.R., Rose-John S., Neurath M.F., 2000, Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo, *Nat Med.*, 6, 5, 583-8 p.
16. Aydın S., Başaran A.A., Başaran N., 2005, The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutat Res.*, 581, 1-2, 43-53 p.
17. Azirak S., Rencuzogullari E., 2008, The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells, *Environ Toxicol.*, 23, 6, 728-35 p.
18. Bansal V., Ochoa J.B., 2003, Arginine availability, arginase, and the immune response, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, 6, 2, 223-8 p.
19. Baser K.,H.,C., 2008, Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils, *Curr Pharm Des.*, 14, 29, 3106-19 p.
20. Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P., 2006, Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *Lett Appl Microbiol.*, 43, 2, 149-54 p.
21. Beutler B., 2004, Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling, *Nature.*, 430, 6996, 257-63 p.
22. Bone R.C., 1991, The pathogenesis of sepsis, *Ann Intern Med*, 15, 115, 6, 457-69 p.
23. Bouchra C., Achouri M., Idrissi Hassani L.M., Hmamouchi M., 2003, Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr, *J Ethnopharmacol.*, 89, 1, 165-9 p.
24. Bounatiroua S., Smitia S., Miguelb M.G., Faleirob L., Rejebe M.N, effatid M., Costae M.M., Figueiredoe A.C., Barrosoe J.G., Pedro L.G., 2007, Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link., *Food Chemistry*, 105, 1, 146-165 p.

25. Brock T.G., McNish R.W., Mancuso P., Coffey M.J., Peters-Golden M., 2003, Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 71, 3-4, 131-45.
26. Bronte V., Zanovello P., 2005, Regulation of immune responses by L-arginine metabolism, *Nat Rev Immunol.*, 5, 8, 641-54 p.
27. Bukovská A., Cikos S., Juhás S., Il'ková G., Reháč P., Koppel J., 2007, Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice, *Mediators Inflamm.*, 2007, 23296.
28. Canbek M., Uyanoglu M., Bayramoglu G., Senturk H., Erkasap N., Koken T., Uslu S., Demirustu C., Aral E., Husnu Can Baser K., 2008, Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver, *Phytomedicine.*, 15, 6-7, 447-52 p.
29. Cankurtaran M., Kıyıkım A., 2002, Sepsiste renal hemodinami ve mediyatörler, *Erciyes Tıp Dergisi*, 24, 4, 202-208 s.
30. Cederbaum S.D., Yu H., Grody W.W., Kern R.M., Yoo P., Iyer R.K., 2004, Arginases I and II: do their functions overlap?, *Mol Genet Metab.*, 81, Suppl 1, S38-44 p.
31. Chandel N.S., Trzyna W.C., McClintock D.S., Schumacker P.T., 2000, Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin, *J Immunol.*, 165, 2, 1013-21 p.
32. Chen X.S., Sheller J.R., Johnson E.N., Funk C.D., 1994, Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene, *Nature.*, 372, 6502, 179-82 p.
33. Chicoine L.G., Paffett M.L., Young T.L., Nelin L.D., 2004, Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 287, 1, L60-8 p.
34. Cho S., Choi Y., Park S., Park T., 2012, Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet, *J Nutr Biochem.*, 23, 2, 192-201 p.
35. Closs E.I., Simon A., Vékony N., Rotmann A., 2004, Plasma membrane transporters for arginine, *J Nutr.*, 134, 10 Suppl, 2752S-2759S p.
36. Coffey M., Phare S., Peters-Golden M., 2004, Induction of inducible nitric oxide synthase by lipopolysaccharide/interferon gamma and sepsis down-regulates 5-lipoxygenase metabolism in murine alveolar macrophages, *Exp Lung Res.*, 30, 7, 615-33.
37. Cohen J., 2002, The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420, 885-91 p.

38. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M., 1994, Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod, *J Immunol Methods.*, 174, 1-2, 231-5 p.
39. Cortas N.K., Wakid N.W., 1990, Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method, *Clin Chem.*, 36, 8 Pt 1, 1440-3 p.
40. Coskun S., Girisgin O., Kürkcüoglu M., Malyer H., Girisgin A.O., Kirimer N., Baser K.H., 2008, Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae), *Parasitol Res.*, 103, 2, 259-61 p.
41. Crimi E., Sica V., Williams-Ignarro S., Zhang H., Slutsky A.S., Ignarro L.J., Napoli C., 2006, The role of oxidative stress in adult critical care, *Free Radic Biol Med.*, 40, 3, 398-406 p.
42. Cristofaro P., Opal S.M., 2006, Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications, *Drugs*, 6, 1, 15-29 p.
43. Cross A.S., Opal S.M., 2003, A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy?, *Ann Intern Med.*, 138, 6, 502-5 p.
44. Daniels R., Nutbeam T., (eds), 2010. *The ABC of Sepsis*. Chichester: Wiley Blackwell, 6 p.
45. De Carolis E., Denis D., Riendeau D., 1996, Oxidative inactivation of human 5-lipoxygenase in phosphatidylcholine vesicles, *Eur J Biochem.*, 235, 1-2, 416-23 p.
46. De Vincenzi M., Stamatii A., De Vincenzi A., Silano M., 2004, Constituents of aromatic plants: carvacrol, *Fitoterapia.*, 75, 7-8, 801-4 p.
47. Dejam A., Hunter C.J., Schechter A.N., Gladwin M.T., 2004, Emerging role of nitrite in human biology, *Blood Cells Mol Dis.*, 32, 3, 423-9 p.
48. Dienz O., Eaton S.M., Bond J.P., Neveu W., Moquin D., Noubade R., Briso E.M., Charland C., Leonard W.J., Ciliberto G., Teuscher C., Haynes L., Rincon M., 2009, The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells, *J Exp Med.*, 206, 1, 69-78 p.
49. Dubois R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., Van De Putte L.B., Lipsky P.E., 1998, Cyclooxygenase in biology and disease, *FASEB J.*, 12, 12, 1063-73 p.
50. El-Nekeety A.A., Mohamed S.R., Hathout A.S., Hassan N.S., Aly S.E., Abdel-Wahhab M.A., 2011, Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats, *Toxicol.*, 57, 7-8, 984-91 p.
51. Eminagaoglu O., Tepe B., Yumrutas O., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., 2007, The in vitro antioxidative properties of the essential oils and

- methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten, *Food Chemistry*, 100, 1, 339-343 p.
52. Erbaş H., Erten O., Dağlar A., İrfanoğlu M.E., 2006, Meme Kist Sıvısı Arginaz Aktivitesi, Ornitin ve Üre Düzeyleri, *Turk J Biochem*, 31, 3, 131–136 s.
 53. Figiel A., Szummy A., Gutierrez-Ortiz, A., Carbonell-Barrachina A., 2010, Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method, *Journal of Food Engineering*, 98, 2, 240-247 p.
 54. Fink M.P., Morrissey P.E., Stein K.L., Clement R.E., Fiallo V., Gardiner W.M., 1988, Systemic and regional hemodynamic effects of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase inhibition in normal and hyperdynamic endotoxemic rabbits, *Circ Shock.*, 26, 1, 41-57 p.
 55. Fitzgerald D.C., Meade K.G., McEvoy A.N., Lillis L., Murphy E.P., MacHugh D.E., Baird A.W., 2007, Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells, *Vet Immunol Immunopathol.*, 116, 1-2, 59-68 p.
 56. Fitzgerald K.A., O'Neill A.J., Andy J.H., Callard G., Callard R.E., 2001, *The Cytokine FactsBook and Webfacts*, Academic Press, London, 515 p.
 57. Folco G., Murphy R.C., 2006, Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses, *Pharmacol Rev.*, 58, 3, 375-88 p.
 58. Funk C.D., 2001, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science.*, 294, 5548, 1871-5 p.
 59. Gauldie J., Richards C., Harnish D., Lansdorp P., Baumann H., 1987, Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84, 20, 7251-5 p.
 60. Georgieva T.M., Georgiev I. P. Tanev S., Vachkov A., Petrov V., Eckersall P.D., Sotirov L., Lazarov L., Christov TS., Nikolov J., 2009, Variations of acute phase protein (haptoglobin, fibrinogen and ceruloplasmin) concentrations in weaning rabbits after experimental infection with *E.coli*, *Revue Méd. Vét.*, 160, 3, 133-139 p.
 61. Glover S., de Carvalho M.S., Bayburt T., Jonas M., Chi E., Leslie C.C., Gelb M.H., 1995, Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen, *J Biol Chem.*, 270, 25, 15359-67 p.
 62. Goetz F.W., Planas J.V., MacKenzie S., Tumor necrosis factors, *Dev Comp Immunol.*, 28, 5, 487-97 p.

63. Gotoh T., Sonoki T., Nagasaki A., Terada K., Takiguchi M., Mori M., 1996, Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line, *FEBS Lett.*, 395, 2-3, 119-22 p.
64. Göçmen C., 2005, Lipid Kökenli Otakoidler:Prostaglandinler ve Lökotrienler, *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 1, 1, 1-9 s.
65. Guimarães A.G., Oliveira G.F., Melo M.S., Cavalcanti S.C., Antonioli A.R., Bonjardim L.R., Silva F.A., Santos J.P., Rocha R.F., Moreira J.C., Araújo A.A., Gelain D.P., Quintans-Júnior L.J., 2010, Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 107, 6, 949-57 p.
66. Guimarães A.G., Xavier M.A., de Santana M.T., Camargo E.A., Santos C.A., Brito F.A., Barreto E.O., Cavalcanti S.C., Antonioli A.R., Oliveira R.C., Quintans-Júnior L.J., 2012, Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 385, 3, 253-63 p.
67. Guschin D., Rogers N., Briscoe J., Witthuhn B., Watling D., Horn F., Pellegrini S., Yasukawa K., Heinrich P., Stark G.R., et al., 1995, A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6, *EMBO J.*, 14, 7, 1421-9 p.
68. Haeggström J.Z., Funk C.D., 2011, Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease, *Chem Rev.*, 111, 10, 5866-98 p.
69. Haeggström J.Z., Wetterholm A., 2002, Enzymes and receptors in the leukotriene cascade, *Cell Mol Life Sci.*, 59, 5, 742-53 p.
70. Hallemeesch M.M., Lamers W.H., Deutz N.E., 2002, Reduced arginine availability and nitric oxide production, *Clin Nutr.*, 21, 4, 273-9 p.
71. Hargrave B.Y., Tiangco D.A., Lattanzio F.A., Beebe S.J., 2003, Cocaine, not morphine, causes the generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB in transiently cotransfected heart cells, *Cardiovasc Toxicol*, 3, 2, 141-51 p.
72. Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Müller-Newen G., Schaper F., 2003, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem J.*, 374, Pt 1, 1-20 p.
73. Helal G.K., 2010, Thymoquinone supplementation ameliorates acute endotoxemia-induced liver dysfunction in rats, *Pak J Pharm Sci.*, 23, 2, 131-7 p.
74. Hellman N.E., Gitlin J.D., 2002, Ceruloplasmin metabolism and function, *Annu Rev Nutr.*, 22, 439-58 p.

75. Hensley K., Floyd R.A (Eds.), Williamson K.S., Hensley K., Floyd R.A., 2003, Fluorometric and colorimetric assessment of thiobarbituric acid-reactive lipid aldehydes in biological matrices, *Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress*, Humana Press, New Jersey, 57–65 p.
76. Heumann D., Roger T., 2002, Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria, *Clin Chim Acta.*, 323, 1-2, 59-72 p.
77. Hotchkiss R.S., Karl I.E., 2003, The Pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348/2, 138-150 p.
78. Hotta M., Nakata R, Katsukawa M., Hori K., Takahashi S., Inoue H., 2010, Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression, *J Lipid Res.*, 51, 1, 132-9 p.
79. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=10364>
80. Huie R.E., Padmaja S., 1993, The reaction of NO with superoxide, *Free Radic Res Commun.*, 18, 4, 195-9 p.
81. Hurst S.M., Wilkinson T.S., McLoughlin R.M., Jones S., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Fuller G.M., Topley N., Jones S.A., 2001, IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation, *Immunity.*, 14, 6, 705-14 p.
82. Iizuka Y., Okuno T., Saeki K., Uozaki H., Okada S., Misaka T., Sato T., Toh H., Fukayama M., Takeda N., Kita Y., Shimizu T., Nakamura M., Yokomizo T., 2010, Protective role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in murine inflammatory colitis, *FASEB J.*, 24, 12, 4678-90 p.
83. Ipek E., Tüylü B.A., Zeytinoğlu H., 2003, Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures, *Cytotechnology.*, 43, 1-3, 145-8 p.
84. Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M., Baser K.H.C., 2005, Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test, *Food Chemistry*, 93, 3, 552-556 p.
85. Ishii N., Ikenaga H., Carmines P.K., Aoki Y., Ogawa Z., Saruta T., Suga T., 2004, High glucose augments arginase activity and nitric oxide production in the renal cortex, *Metabolism.*, 53, 7, 868-74 p.
86. İskit A.B., 2005, Sepsiste Deneysel Modeller, *Yoğun Bakım Dergisi*, 5, 2, 133-136 s.
87. Jäättelä M., 1991, Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-alpha/cachectin, *Lab Invest.*, 64, 6, 724-42 p.
88. Jatana M., Giri S., Ansari M.A., Elango C., Singh A.K., Singh I., Khan M., 2006, Inhibition of NF-kappaB activation by 5-lipoxygenase inhibitors protects brain

- against injury in a rat model of focal cerebral ischemia, *J Neuroinflammation*, 11, 3:12 p.
89. Jayakumar S., Madankumar A., Asokkumar S., Raghunandhakumar S., Gokuladhas K., Kamaraj S., Divya M.G., Devaki T., 2012, Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats, *Mol Cell Biochem.*, 360, 1-2, 51-60 p.
 90. Jerala R., 2007, Structural biology of the LPS recognition, *Int J Med Microbiol.*, 297, 5, 353-63 p.
 91. Jiang W., Hall S.R., Moos M.P., Cao R.Y., Ishii S., Ogunyankin K.O., Melo L.G., Funk C.D., 2008, Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury, *Am J Pathol.*, 172, 3, 592-602 p.
 92. Jones S.A., 2005, Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6, *J Immunol.*, 175, 6, 3463-8 p.
 93. Kabe Y., Ando K., Hirao S., Yoshida M., Handa H., 2005, Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus, *Antioxid Redox Signal.*, 7, 3-4, 395-403 p.
 94. Kang J.H., Kim K.S., Choi S.Y., Kwon H.Y., Won M.H., 2001, Oxidative modification of human ceruloplasmin by peroxy radicals, *Biochim Biophys Acta.*, 1568, 1, 30-6.
 95. Kaniyas G.D., Souleles C., Loukis A., Philotheou-Panou E., 1998, Trace elements and essential oil composition in chemotypes of the aromatic plant *Origanum vulgare*, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 227, 1-2, 23-31 p.
 96. Kaplanski G., Marin V., Montero-Julian F., Mantovani A., Farnarier C., 2003, IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation, *Trends Immunol.*, 24, 1, 25-9 p.
 97. Karaali R., Tabak F., 2009, Sepsis Patogenezi, *Klinik Gelişim*, 22, 3, 71-76 s.
 98. Karaböcüoğlu M., 1999, Sepsis ve septik şok tedavisinde nitrik oksitin rolü, *ANKEM Derg*, 13, 3, 380-385 s.
 99. Karimian P., Kavooosi G., Saharkhiz M.J., 2011, Antioxidant, nitric oxide scavenging and malondialdehyde scavenging activities of essential oils from different chemotypes of *Zataria multiflora*, *Nat Prod Res.* [Epub ahead of print].
 100. Karkabounas S., Kostoula O.K., Daskalou T., Veltsistas P., Karamouzis M., Zelovitis .I, Metsios A., Lekkas P., Evangelou A.M., Kotsis N., Skoufos I., 2006, Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol, *Exp Oncol.*, 28, 2, 121-5 p.

101. Kasama T., Miwa Y., Isozaki T., Odai T., Adachi M., Kunkel S.L., 2005, Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.*, 4, 3, 273-9 p.
102. Kew M.C., 2000, Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage, *Lancet.*, 355, 9204, 591-2 p.
103. Kirkebøen K.A., Strand O.A., 1999, The role of nitric oxide in sepsis--an overview, *Acta Anaesthesiol Scand.*, 43, 3, 275-88 p.
104. Kolagal V., Karanam S.A., Dharmavarapu P.K., D'Souza R., Upadhya S., Kumar V., Kedage V., Muttigi M.S., Shetty J.K., Prakash M., 2009, Determination of oxidative stress markers and their importance in early diagnosis of uremia-related complications, *Indian J Nephrol.*, 19, 1, 8-12 p.
105. Kumar R., Clermont G., Vodovotz Y., Chow C.C., 2004, The dynamics of acute inflammation, *J Theor Biol.*, 230, 2, 145-55 p.
106. Kuralay F., Çavdar Z., 2006, İnflamatuvar medyatörlere toplu bakış, *Genel Tıp Der.*, 16, 3, 143-152 s.
107. Kuyumcu A., Düzgün Polat A., Özmen M.M., Besler H.T., 2004, Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü, *Ulus Travma Derg.*, 10, 3, 149-159 p.
108. Lancaster J.R. Jr., 1996, Diffusion of free nitric oxide, *Methods Enzymol.*, 268, 31-50 p.
109. Leon L.R., White A.A., Kluger M.J., 1998, Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice, *Am J Physiol.*, 275, 1 Pt 2, R269-77 p.
110. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G., SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS, 2003, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Crit Care Med*, 31, 4, 1250-6 p.
111. Li Z., Choi D.Y., Shin E.J., Hunter R.L., Jin C.H., Wie M.B., Kim M.S., Park S.J., Bing G., Kim H.C., 2008, Phenidone protects the nigral dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity, *Neurosci Lett.*, 7, 445(1), 1-6 p.
112. Liolios C.C., Gortzi O., Lalas S., Tsaknis J., Chinou I., 2009, Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity, *Food Chemistry*, 112, 1, 77-83 p.
113. Luiking Y.C., Hallemeesch M.M., Lamers W.H., Deutz N.E., 2005, The role of NOS2 and NOS3 in renal protein and arginine metabolism during early endotoxemia in mice, *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, 4, F816-22 p.

114. Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C., Pessoa A Jr., 2007, Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci*, 10, 3, 388-404 p.
115. Marks F., Fürstenberger G., 1999, Prostaglandins, Leukotrienes and Other Eicosanoids: From Biogenesis to Clinical Application, Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany.
116. Marnett L.J., Rowlinson S.W., Goodwin D.C., Kalgutkar A.S., Lanzo C.A., 1999, Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition, *J Biol Chem.*, 274, 33, 22903-6 p.
117. Marwah R.G., Fatope M.O., Deadman M.L., Ochei J.E., Al-Saidi S.H., 2007, Antimicrobial activity and the major components of the essential oil of *Plectranthus cylindraceus.*, *J Appl Microbiol.*, 103, 4, 1220-6 p.
118. Mastelić J., Jerković I., Blazević I., Poljak-Blazi M., Borović S., Ivancić-Baće I., Smrecki V., Zarković N., Brcić-Kostic K., Vikić-Topić D., Müller N., 2008, Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives, *J Agric Food Chem.*, 56, 11, 3989-96 p.
119. Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee, 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 20, 864–874 p.
120. Meram İ., Ahi S., Tarakçioğlu M., 2000, Kanserde Serum Arginaz Aktivitesi, *Van Tıp Dergisi*, 7, 1, 20-23 s.
121. Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A., 2001, A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite, *Nitric Oxide.*, 5, 1, 62-71 p.
122. Mire-Sluis A.R., Thorpe R., 1998, Cytokines, Academic Press, London, 87-100 p.
123. Moncada S., Higgs A., 1993, The L-arginine-nitric oxide pathway, *N Engl J Med.*, 329, 27, 2002-12 p.
124. Mori M., 2007, Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling, *J Nutr.*, 137, 6 Suppl 2, 1616S-1620S p.
125. Mori M., Gotoh T., 2000, Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes, *Biochem Biophys Res Commun.*, 275, 3, 715-9 p.
126. Morris S.M. Jr, Kepka-Lenhart D., Chen L.C., 1998, Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells, *Am J Physiol.*, 275, 5, Pt 1, E740-7 p.

127. Munder M., Eichmann K., Morán J.M., Centeno F., Soler G., Modolell M., 1999, Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells, *J Immunol.*, 163, 7, 3771-7 p.
128. Murphy R.C., Gijón M.A., 2007, Biosynthesis and metabolism of leukotrienes, *Biochem J.*, 405, 3, 379-95 p.
129. Netea M.G., van der Meer J.W., van Deuren M., Kullberg B.J., 2003, Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing?, *Trends Immunol.*, 24, 5, 254-8 p.
130. Nicholson B., Manner C.K., Kleeman J., MacLeod C.L., 2001, Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2, *J Biol Chem.*, 276, 19, 15881-5 p.
131. Noguchi M., Miyano M., Kuhara S., Matsumoto T., Noma M., 1994, Interfacial kinetic reaction of human 5-lipoxygenase, *Eur J Biochem.*, 222, 2, 285-92 p.
132. Opal S.M., 2010, Endotoxins and other sepsis triggers, *Contrib Nephrol*, 167, 14-24 p.
133. Önal İ.Ö., Erden İ.A., Akıncı S.B., Erden G., Karabulut İ., Zeybek N.D., Fadilloğlu E., Müftüoğlu S., Sarıcaoğlu F., Balkancı Z.D., Başer K.H.C., 2011, Sıçanlarda karvakrolün oleik asitle oluşturulan akut akciğer hasarına etkisi, *Anestezi Dergisi* 19, 2, 90-8 s.
134. Özer F., Yosunkaya Ş., 2005, Astım ve lökotrienler, *Genel Tıp Derg.*, 15, 2, 91-99 s.
135. Palá-Paúla J., Brophyb J.J., Goldsackb R.J, Fontaniellaa B., 2004, Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 1, 55-62 p.
136. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S., 1987, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature.*, 327, 6122, 524-6 p.
137. Pande A.H., Qin S., Tatulian S.A., 2005, Membrane fluidity is a key modulator of membrane binding, insertion, and activity of 5-lipoxygenase, *Biophys J.*, 88, 6, 4084-94 p.
138. Parameswaran N., Patial S., 2010, Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 20, 2, 87-103 p.
139. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O., 2009, The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex, *Nature*, 458, 7242, 1191-5 p.

140. Penrose J.F., Spector J., Lam B.K., Friend D.S., Xu K., Jack R.M., Austen K.F., 1995, Purification of human lung leukotriene C4 synthase and preparation of a polyclonal antibody, *Am J Respir Crit Care Med.*, 152, 1, 283-9 p.
141. Pérez-Rosés R., Risco E., Vila R., Peñalver P., Cañigüeral S., 2009, Inhibitory activity of nine essential oils on nitric oxide production by human leukocytes, *Planta Med.*, 75, PI7 p.
142. Persson P.B., Baumann J.E., Ehmke H., Nafz B., Wittmann U., Kirchheim H.R., 1992, Phasic and 24-h blood pressure control by endothelium-derived relaxing factor in conscious dogs, *Am J Physiol.*, 262, 5 Pt 2, H1395-400 p.
143. Peters-Golden M., Brock T.G., 2001, Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets, *FEBS Lett.*, 487, 3, 323-6 p.
144. Peters-Golden M., McNish R.W., 1993, Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation, *Biochem Biophys Res Commun*, 196, 1, 147-53 p.
145. Peters-Golden M., Song K., Marshall T., Brock T., 1996, Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis, *Biochem J.*, 318, Pt 3, 797-803 p.
146. Qin H., Wilson C.A., Lee S.J., Zhao X., Benveniste E.N., 2005, LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia, *Blood.*, 106, 9, 3114-22 p.
147. Rådmark O., 2002, Arachidonate 5-lipoxygenase, Prostaglandins Other Lipid Mediat., 68-69, 211-34 p.
148. Rådmark O., Samuelsson B., 2010, Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis, *Biochem Biophys Res Commun.*, 396, 1, 105-10 p.
149. Raetz C.R., Whitfield C., 2002, Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700 p.
150. Reitsma P.H., Branger J., Van Den Blink B., Weijer S., Van Der Poll T., Meijers J.C., 2003, Procoagulant protein levels are differentially increased during human endotoxemia, *J Thromb Haemost*, 1, 5, 1019-23 p .
151. Riendeau D., Falgoutyret J.P, Guay J., Ueda N., Yamamoto S., 1991, Pseudoperoxidase activity of 5-lipoxygenase stimulated by potent benzofuranol and N-hydroxyurea inhibitors of the lipoxygenase reaction, *Biochem J.*, 274, Pt 1, 287-92 p.
152. Rinaldo-Matthis A., Haeggström J.Z., 2010, Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade, *Biochimie.*, 92, 6, 676-81 p.

153. Rodig S.J., Meraz M.A., White J.M., Lampe P.A., Riley J.K., Arthur C.D., King K.L., Sheehan K.C., Yin L., Pennica D., Johnson E.M. Jr, Schreiber R.D., 1998, Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses, *Cell*, 93, 3, 373-83 p.
154. Rodriguez P.C., Zea A.H., Culotta K.S., Zabaleta J., Ochoa J.B., Ochoa A.C., 2002, Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine, *J Biol Chem*, 277, 24, 21123-9 p.
155. Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A., 1997, Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment, *Immunity*, 6, 3, 315-25 p.
156. Rouzer C.A., Samuelsson B., 1985, On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 18, 6040-4 p.
157. Ruberto G., Biondi D., Meli R., Piattelli M., 2006, Volatile flavour components of Sicilian *Origanum onites* L., *Flavour and Fragrance Journal*, 8, 4, 197-200 p.
158. Salimuddin, Nagasaki A., Gotoh T., Isobe H., Mori M., 1999, Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide, *Am J Physiol*, 277, 1, Pt 1, E110-7 p.
159. Santos P.A.G., Barroso J.G., Figueiredo A.C., Pedro L.G., Salgueiro L.R., Fonrinha S.S., Deans S.G., Scheffer J.J.C., 2005, Chemical polymorphism of populations of *Thymus caespititius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira, assessed by analysis of their essential oils, *Plant Science*, 169, 6, 1112-1117 p.
160. Sastry K.V., Moudgal R.P., Mohan J., Tyagi J.S., Rao G.S., 2002, Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy, *Anal Biochem*, 1, 306, 1, 79-82 p.
161. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S., 2011, The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6, *Biochim Biophys Acta*, 1813, 5, 878-88 p.
162. Schievella A.R., Regier M.K., Smith W.L., Lin L.L., 1995, Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum, *J Biol Chem*, 270, 51, 30749-54 p.
163. Schosinsky K.H., Lehmann H.P., Beeler M.F., 1974, Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride, *Clin Chem*, 20, 12, 1556-63 p.

164. Sehgal P.B., Zilberstein A., Ruggieri R.M., May L.T., Ferguson-Smith A., Slate D.L., Revel M., Ruddle F.H., 1986, Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 14, 5219-22 p.
165. Seydanoğlu A., Gül M., Erdem S., Cander B., Ayan M., Toy H., Bircan M., Girişgin S., 2010, Deneysel Sepsis Modelinde Oksidan-Antioksidan Sistem ve Akciğer Histopatolojisi Üzerine Oktreotid'in DozaBağımlı Etkileri, *Selçuk Üniv. Tıp Derg*, 26, 3, 90-94 s.
166. Sharon J., 1998, *Basic Immunology*, Baltimore: Williams & Wilkins A Waverly Company, 107–123 p.
167. Silva W.J., Dória G.A., Maia R.T., Nunes R.S., Carvalho G.A., Blank A.F., Alves P.B., Marçal R.M., Cavalcanti S.C., 2008, Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides, *Bioresour Technol.*, 99, 8, 3251-5 p.
168. Singh R., Pervin S., Karimi A., Cederbaum S., Chaudhuri G., 2000, Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells, *Cancer Res.*, 60, 12, 3305-12 p.
169. Sonoki T., Nagasaki A., Gotoh T., Takiguchi M., Takeya M., Matsuzaki H., Mori M., 1997, Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide, *J Biol Chem.*, 272, 6, 3689-93 p.
170. Sriskandan S., Altmann D.M., 2008, The immunology of sepsis, *J Pathol.*, 214, 2, 211-23 p.
171. Steinhilber D., Rådmark O., Samuelsson B., 1993, Transforming growth factor beta upregulates 5-lipoxygenase activity during myeloid cell maturation, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90, 13, 5984-8 p.
172. Tabanca N., Demirci B., Crockett S.L., Başer K.H., Wedge D.E., 2007, Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils, *J Agric Food Chem.*, 55, 21, 8430-5 p.
173. Takeda K., 2005, Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors, *J Endotoxin Res.*, 11, 1, 51-5 p.
174. Takemoto Y., Yoshiyama M., Takeuchi K., Omura T., Komatsu R., Izumi Y., Kim S., Yoshikawa J., 1999, Increased JNK, AP-1 and NF-kappa B DNA binding activities in isoproterenol-induced cardiac remodeling, *J Mol Cell Cardiol.*, 31, 11, 2017-30 p.
175. Taylor-Robinson A.W., 2000, Increased production of acute-phase proteins corresponds to the peak parasitaemia of primary malaria infection, *Parasitol Int.*, 48, 4, 297-301 p.

176. Thomson A.W., Lotze M.T., (Eds), 2003, *The Cytokine Handbook*, 4rd Ed., Vol. 1, Academic Press, London, 281 p., 837-860 p.
177. Tsikas D., 2007, Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 851, 1-2, 51-70 p.
178. Tunçtan, B., 2005, Nitrik oksit miktarlarının Griess yöntemi ile ölçülmesi. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı Nitrik oksidin Farmakolojisi, 27 Mayıs, Mersin, 61-68 s.
179. Ueda N., Kaneko S., Yoshimoto T., Yamamoto S., 1986, Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids, *J Biol Chem.*, 261, 17, 7982-8 p.
180. Uyanoglu M., Canbek M., Aral E., Baser K.H.C., 2008, Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy, *Phytomedicine.*, 15, 3, 226-9 p.
181. Villar J., Maca-Meyer N., Pérez-Méndez L., Flores C., 2004, Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis, *Crit Care.*, 8, 3, 180-9 p.
182. Wahli W., Michalik L., 2012, PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation, *Trends Endocrinol Metab*, 23, 7, 351-63 p.
183. Wang T., Zhang X., Li J.J., 2002, The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses, *Int Immunopharmacol*, 2, 11, 1509-20 p.
184. Wang W.W., Jenkinson C.P., Griscavage J.M., Kern R.M., Arabolos N.S., Byrns R.E., Cederbaum S.D., Ignarro L.J., 1995, Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide, *Biochem Biophys Res Commun.*, 210, 3, 1009-16 p.
185. Wolf D., Hallmann R., Sass G., Sixt M., Küsters S., Fregien B., Trautwein C., Tiegs G., 2001, TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1--relevance for concanavalin A-induced hepatitis, *J Immunol.*, 166, 2, 1300-7 p.
186. Woods J.W., Coffey M.J., Brock T.G., Singer I.I., Peters-Golden M., 1995, 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation, *J Clin Invest.*, 95, 5, 2035-46 p.
187. Woods J.W., Evans J.F., Ethier D., Scott S., Vickers P.J., Hearn L., Heibin J.A., Charleson S., Singer I.I., 1993, 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes, *J Exp Med.*, 178, 6, 1935-46 p.

188. Wu G., Bazer F.W., Cudd T.A., Jobgen W.S., Kim S.W., Lassala A., Li P., Matis J.H., Meininger C.J., Spencer T.E., 2007, Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals, *J Nutr.*, 137, 6 Suppl 2, 1673S-1680S p.
189. Wu G., Bazer F.W., Davis T.A., Kim S.W., Li P., Marc Rhoads J., Carey Satterfield M., Smith S.B., Spencer T.E., Yin Y., 2009, Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease, *Amino Acids.*, 37, 1, 153-68 p.
190. Wu G., Morris S.M. Jr., 1998, Arginine metabolism: nitric oxide and beyond, *Biochem J.*, 336, Pt 1, 1-17 p.
191. Yasukawa K., Hirano T., Watanabe Y., Muratani K., Matsuda T., Nakai S., Kishimoto T., 1987, Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene, *EMBO J.*, 6, 10, 2939-45 p.
192. Yorgancı K., Sayek İ., 2005, Sepsis ve İlgili Tanımlamalar, *Yoğun Bakım Dergisi*, 5, 2, 75-79 s.
193. Zaitso M., Hamasaki Y., Yamamoto S., Kita M., Hayasaki R., Muro E., Kobayashi I., Matsuo M., Ichimaru T., Miyazaki S., 1998, Effect of dexamethasone on leukotriene synthesis in DMSO-stimulated HL-60 cells, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, 59, 6, 385-93 p.
194. Zhao L., Moos M.P., Gräbner R., Pédrone F., Fan J., Kaiser B., John N., Schmidt S., Spanbroek R., Lötzer K., Huang L., Cui J., Rader D.J., Evans J.F., Habenicht A.J., Funk C.D., 2004, The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm, *Nat Med.* 10, 9, 966-73 p.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Mehmet KARA
Doğum tarihi ve yeri : 1982 - BARTIN
Uyruğu : T. C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : mkara_78@hotmail.com

Eğitim Durumu:

Lisans:

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004),

Yüksek Lisans:

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD (2008)

Doktora:

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD (2012)

Mesleki Deneyim

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Yayımlar:

Bilimsel Etkinlikler

