

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KRONİK ALKOL TÜKETEN RATLARDA PSEUDOMONAS
AERUGINOSA'YA BAĞLI İNFEKSİYONUN Pnömonide
BİYOKİMYASAL HÜCRESEL HASAR GÖSTERGELERİ VE
İNFEKSİYON HÜCRE ÖLÜMÜ

DOKTORA TEZİ

MELEK (DÜNDAR) DEMİR

DANIŞMAN

PROF. DR. GÜNGÖR KANBAK

EKİM-2009

T.C.
ESKİEHİR OSMANGAZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KRONİK ALKOL TÜKETEN RATLARDA PSEUDOMONAS
AERUGINOSA'YA BAĞLI İNFEKSİYONUN Pnömoni Modelinde
Biyokimyasal Hücresel Hasar Göstergeleri ve
Nörotoxicite Hücre Ölümü

DOKTORA TEZİ

MELEK (DÜNDAR) DEMİR

DANIŞMAN

PROF. DR. GÜNGÖR KANBAK

Proje no: 200711028 (ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu)

KABUL VE ONAY SAYFASI

Melek DÜNDAR Demir'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "Kronik alkol tüketen ratlarda Pseudomonas aeruginosa ile indüklenmiş pnömoni modelinde biyokimyasal hücresel hasar göstergeleri ve in-situ hücre ölümü" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

26.10.2009

Prof. Dr. Ömer ÇOLAK



Prof. Dr. Mine İNAL



Prof. Dr. Güngör KANBAK



Doç. Dr. Zerrin İNCESU



Yard. Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30.10.2009. tarih ve 802/3742 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Kronik alkol tüketen ratlarda Pseudomonas aeruginosa ile indüklenmi pnömoni modelinde biyokimyasal hücresel hasar göstergeleri ve in situ hücre ölümü

Bu çalı mada kronik alkol kullanımı sırasında Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa) pnömonisi varlı ında karaci er ve akci erde olu an hücresel de i iklerin; apoptotik metabolik yollar ve oksidan stres ile ili kisinin ara tırılması amaçlandı.

Erkek wistar ratlar; normal katı diyet verilen sham (n=6), normal sıvı diyet verilen (n=8) ve etanollü sıvı diyet verilen (n=7) kontrol grupları, normal sıvı diyet verilen ve P.aeruginosa pnömonisi olu turulan (n=7) ve etanollü sıvı diyet verilen ve P.aeruginosa pnömonisi olu turulan (n=5) pnömoni grupları eklinde be gruba ayrıldı. n situ hücre ölümüne TUNEL yöntemi ile bakıldı. Hücresel hasarın ve konak yanıtının biyokimyasal göstergeleri için serum ALT ve LDH aktiviteleri ile doku ve serum malondialdehid (MDA) düzeyi, serum ve doku paraoksonaz ve arilesteraz ve doku kaspaz-3 aktiviteleri ölçüldü.

Etanollü sıvı diyet verilmi kontrol ve etanollü sıvı diyet verilmi pnömoni gruplarının her ikisinde serum ALT aktiviteleri di er gruplara göre anlamlı olarak yüksekti (p<0.05). Tüm gruplarda sham grubuna göre karaci er MDA düzeyi artmı tı, ancak sadece etanollü diyet verilen pnömoni grubunda fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.05). Akci er MDA düzeyleri arasında fark saptanmadı. Karaci erde TUNEL pozitif hücre artı ı etanollü diyet verilen kontrol ve pnömoni gruplarında ve normal sıvı diyet verilen pnömoni grubunda, sham ve normal sıvı diyet verilen kontrol grubuna göre daha yüksekti (p<0.05). Karaci er ve akci er kaspaz-3 aktiviteleri gruplar arasında farklı de ildi. Serum paraoksonaz aktivitesi pnömoni gruplarında daha dü ük olmakla birlikte gruplar arasında fark bulunmadı.

Etanollü sıvı diyet verilen ve pnömoni olu turulan grupta artımı karaci er MDA düzeyinin varlı ı ve serum paraoksonaz aktivitesindeki dü me e ilimi, kronik alkol kullanımı sırasında geli en enfeksiyonun karaci erde serbest oksijen radikalleri aracılıklı hasarı artırırken, antioksidan kapasitede de azalmaya neden oldu u ekleinde yorumlanabilir.

Anahtar kelimeler: Alkol, P.aeruginosa, MDA, Paraoksonaz, TUNEL, Kaspaz-3

SUMMARY

In situ cell death and biochemical cellular damage indicators in *Pseudomonas aeruginosa* induced pneumonia model in chronic alcohol ingesting rats

Our aim was to investigate whether cellular alterations occurred in liver and lung tissue in presence of chronic alcohol ingestion and *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) pneumonia related to oxidative stress and insitu cell death.

Male wistar rats were divided into five groups: the sham group (n=6) fed by normal solid diet, two control groups, one fed by normal liquid diet (n=8), and the other fed by liquid diet with ethanol (n=7), two pneumonia groups which induced by *P.aeruginosa*, one fed by normal liquid diet (n=7), and the other fed by liquid diet with ethanol (n=5). TUNEL analysis was performed to confirm insitu cell death. Serum ALT and LDH activity, and tissue and serum malondialdehyde (MDA) levels, and tissue and serum paraoxonase and arylesterase activities, and tissue caspase-3 activities were determined as cellular damage and host response biochemical indicators.

Serum ALT activities of both ethanol control and ethanol pneumonia groups were higher than the other groups ($p<0.05$) Liver MDA levels were increased including both control and pneumonia groups than sham group, but the difference was only statistically significant in ethanol plus pneumonia group ($p<0.05$). Lung MDA levels were not different among groups. The number of TUNEL positive cells in the liver was higher in the both ethanol given (control and pneumonia) groups and normal liquid diet plus pneumonia group than sham and control group fed by normal liquid diet ($p<0.05$). Liver and lung caspase-3 activities were not different among groups. Although serum paraoxonase activities were lower in the pneumonia groups, it was not statistically significant.

The existence of increased liver MDA levels and declining tendency of activity of in the serum paraoxonase activities in the ethanol pneumonia group may be interpreted as growing infection during chronic ethanol ingestion causes both increased liver damage through free radical and decrease antioxidant capacity.

Key words: Alcohol, P.aeruginosa, MDA, Paraoxonase, TUNEL, Caspase-3

Ç NDEK LER

ÖZET	v
SUMMARY	vii
Ç NDEK LER D Z N	ix
TABLO D Z N	xii
EK L D Z N	xiii
S MGE ve KISALTMALAR	xiv
1. G R VE AMAÇ	1
2. GENEL B LG LER	3
2.1. Alkol (Etanol) Metabolizması	3
2.1.1. Alkol dehidrogenaz (ADH) yola ı	4
2.1.1.1. Gastrik ADH	5
2.1.1.2. Kolonik ADH	6
2.1.1.3. ALDH	6
2.1.2. Mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS)	7
2.1.3. Katalaz yola ı	8
2.1.4. Nonoksidatif yol	8
2.1.5. Etanol Oksidasyonu Sırasında Olu an Metabolik De i iklikler	8
2.2. Alkol ve Serbest Radikaller	9
2.3. Alkol ve Paraoksonaz	11
2.4. Alkol ve İmmün Sistem	12
2.5. Alkol ve Akci er Enfeksiyonu	14
2.6. Apoptoz - Programlanmı Hücre Ölümü	17
2.6.1. Apoptotik yollar ve kaspazlar	17
2.6.1.1. Ölüm reseptörü yolu	17
2.6.1.2. Mitokondrial Yol	18
2.6.1.3. Kaspazlar	19
2.6.2. Apoptoz ve Alkol	19
2.6.3. Apoptoz ve Bakteriyel Enfeksiyonlar	20
2.7. Pseudomonas aeruginosa	21

2.7.1. Pseudomonas aeruginosa pnömonisi alkol ve apoptozis	21
2.7.2. Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonu ve paraoksonaz	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. Çalışma Grupları	25
3.1.1. Alkol verilen ve normal kontrol grubu için sıvı diyet	25
3.1.2. Sham grubu için diyet	26
3.2. Yöntemler	26
3.2.1. Pnömoni modeli	26
3.2.1.1. P.aeruginosa süspansiyonunun hazırlanması	27
3.2.1.2. Pnömoni oluşturulması	27
3.2.1.3. Bakteriyolojik üremenin değerlendirilmesi	28
3.2.2. Dokuların histopatolojik değerlendirilmesi	28
3.2.2.1 İn situ hücre ölümünün saptanması	29
3.2.2.2. TUNEL pozitif hücre sayımı	30
3.2.3. Kaspaz-3 aktivitesinin araştırılması	30
3.2.3.1. Doku kaspaz -3 aktivitesi	30
3.2.4. Serum ve doku Malondialdehit (MDA) ölçümü	32
3.2.4.1. Serum MDA düzeylerinin araştırılması	32
3.2.4.2. Doku MDA düzeylerinin araştırılması	33
3.2.5. Serum paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinin ölçümü	33
3.2.5.1. Serum paraoksonaz aktivitesinin ölçümü	33
3.2.5.2. Serum arilesteraz aktivitesinin ölçümü	34
3.2.6. Doku paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinin ölçümü	34
3.2.6.1. Doku arilesteraz aktivitesi ölçümü	35
3.2.6.2. Doku paraoksonaz aktivitesi ölçümü	35
3.2.7. Doku protein miktarının saptanması	36
3.2.8. Diğer Biyokimyasal Parametreler	36
3.3. İstatistiksel Yöntemler	36
4. BULGULAR	37
4.1. Karaciğer dokularındaki histolojik değişiklikler	37
4.2. Serum ALT ve LDH aktivitesi	40

4.3. Pnömoni olu turulan gruptaki bakteriyel üreme	41
4.4. Akci er dokularındaki histolojik de i iklikler	42
4.5. TUNEL yöntemi ile dokulardaki apoptotik de i iklikler	45
4.6. Kaspaz-3 Aktivitesi Sonuçları	51
4.7. MDA sonuçları	53
4.8. PON ve AE aktivite sonuçları	54
5. TARTI MA	57
6. SONUÇ VE ÖNER LER	76
7. KAYNAKLAR D Z N	78
8. EKLER (Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı)	90
9. ÖZGEÇM	

TABLolar D Z N

Tablo 1. Sıvı diyetin protein, karbohidrat ve yağ içerikleri	26
Tablo 2. Kaspaz -3 çalışmaya protokolü	31
Tablo 3. Çalışmaya gruplarının 6 hafta sonundaki ağırlık (gram) değişimi	37
Tablo 4. Serum ALT ve LDH aktivitesi	41
Tablo 5. Akciğer dokusunda üreyen bakteri miktarı	42
Tablo 6. Karaciğer TUNEL pozitif hücre varlığına göre grupların kararlaştırılması	50
Tablo 7. Akciğer alveolar TUNEL pozitif hücre sayısı	51
Tablo 8. Karaciğer kaspaz-3 aktivitesi	52
Tablo 9. Sağ ve sol akciğer kaspaz-3 aktiviteleri	52
Tablo 10. Karaciğer ve Serum MDA düzeyleri	53
Tablo 11. Sağ ve sol akciğer MDA düzeyleri	54
Tablo 12. Serum PON ve AE aktiviteleri	55
Tablo 13. Karaciğer PON ve AE aktiviteleri	55
Tablo 14. Sağ akciğer PON ve AE aktiviteleri	56
Tablo 15. Sol akciğer PON ve AE aktiviteleri	56

EK LLER D Z N

ekil 1. Etanol Metabolizması	5
ekil 2. Endoplazmik retikulumda MEOS tarafından katalizlenen reaksiyon	7
ekil 3. Kronik Alkol kullanımında akci er savunma mekanizmasındaki de i iklikler	16
ekil 4. Apoptotik Yollar	18
ekil 5. P.aeruginosa quorum sensing sistemi üzerinde paroksonazın rolü	24
ekil 6. Sham grubu rat karaci erleri	38
ekil 7. Normal sıvı diyet ile beslenen rat(NSK) karaci erleri	38
ekil 8. Normal sıvı diyet ile beslenen ve pnömoni olu turulan grup (NSP) karaci eri	39
ekil 9. Etanollü diyet ile beslenen kontrol rat (ESK) karaci eri	39
ekil 10. Etanollü diyet ile beslenen ve pnömoni olu turulan (ESP) rat karaci eri	40
ekil 11. Kar ıla tırmalı olarak pnömoni olu turulmu grupların karaci eri	40
ekil 12. Sham grubu ve NSK rat akci eri	43
ekil 13. NSP rat akci eri	43
ekil 14. Etanollü diyetle beslenen ESK grubu akci eri	44
ekil 15. Etanollü diyet verilen ve pnömoni olu turulan rat (ESP) akci erleri	44
ekil 16. ESP grubu akci erleri	45
ekil 17. TUNEL boyanmı sham ve NSK grubu karaci erleri	45
ekil 18. TUNEL boyanmı NSP karaci eri	46
ekil 19. TUNEL boyanmı ESK ve ESP gruplarının karaci erleri	47
ekil 20. TUNEL boyanmı ESK ve ESP gruplarının karaci eri (x200)	48
ekil 21. TUNEL boyanmı Sham akci eri	48
ekil 22. TUNEL boyanmı NSK ve NSP gruplarının akci erleri	49
ekil 23. TUNEL boyanmı ESK ve ESP gruplarının akci erleri	49
ekil 24. NSP ve ESP grubu TUNEL boyanmı alveol hücresi (x400)	50

KISALTMALAR D Z N

ADH:	Alkol dehidrogenaz
AE:	Ariesteraz
AHL:	Açıl-homoserin lakton
ALDH:	Aldehit dehidrogenaz
ALT:	Alanin aminotransferaz
CFU:	Koloni olu turucu birim “Colony-forming unit”
CYP2E1:	P450 karma fonksiyonlu oksidaz izoenzimi
DISC:	Death Inducing Signaling Complex
ESK:	Etanollü sıvı diyet verilen kontrol grup
ESP:	Etanollü diyet verilen ve P.aeruginosa pnömonisi olu turulan grup
FADD:	Fas-associated protein with a death domain
FasL:	Fas ligand
GGT:	Gamma glutamil transferaz
GSH:	ndirgenmi glutasyon
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HDL:	Yüksek dansiteli lipoprotein
LDH:	Laktat dehidrogenaz
LDL:	Dü ük dansiteli lipoprotein
LPS:	Lipopolisakkarit
MDA:	Malondialdehit
MEOS:	Mikrozomal etanol okside edici sistem
NADH:	ndirgenmi nikotinamid adenin dinukleotid
NAD:	Nikotinamid adenin dinukleotid
NK:	Do al öldürücü hücre
NO:	Nitrik oksit
NSK:	Normal sıvı diyet verilen kontrol grup
NSP:	Normal sıvı diyet verilen ve P.aeruginosa pnömonisi olu turulan grup
O ₂ :	Süperoksit anyonu

ONOO ⁻ :	Peroksinitrit
QS:	Quorum sensing
PBS:	Fosfat buffer saline
PON1:	Paraoksonaz 1
P.aeruginosa:	Pseudomonas aeruginosa
S:	Sham grubu
SOD:	Süperoksit dismutaz enzimi
SAM:	S-Adenozil metiyonin
TNF:	Tümör nekroz faktör
Th:	Yardımcı T lenfosit
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling

1. G R VE AMAÇ

Uzun süreli alkol kullanımı önemli bir sosyal ve sa lık sorunudur. Hafif dozda alkol alımından ba ımlılık düzeyine ula an yüksek doz alkol tüketimi tüm dünyada yaygındır. Orta düzeyde alkol alımı immün sistemi koruyucu etki gösterebilir iken, a ırı ve sürekli alkol alımı zarar verici niteliktedir (48,162). Uzun süreli ve yüksek dozda alkol tüketimi ba ta karaci er, pankreas ve gastrointestinal sistem olmak üzere birçok organ ve sistemi etkilemektedir. Alkol karaci erde iki oksidatif süreç sonrasında önce asetaldehite sonra asetata dönü ür (23). Alkolün uzun süreli kullanımı asetaldehidin karaci er hücrelerinde birikimine ba lı olarak karaci er fonksiyonlarında azalmaya neden olmakta ve hücre hasarı olu turmaktadır (93,95). Asetaldehitin birikimi redükte glutasyon düzeylerinde azalmaya yol açar ve lipid peroksidasyonunun ba lamasına neden olur (17,18,95). Apoptoz ve nekroz hücre ölümündeki iki önemli mekanizmadır. Alkole ba lı hepatositler, nöronlar ve intestinal epitel hücreleri gibi çe itli hücrelerde apoptotik de iimler gözlenmi tir. Bu hücrelerdeki de iiklikler TNF- α up-regülasyonu ve mitokondriyal kaspaz-3 aktivasyonu ile ili kilendirilmi tir (16,107,108).

Lakton hidrolaz ailesinden bir enzim olan paraoksonaz ester ba larını hidrolize eder. Özellikle paraoksonaz 1 (PON1) karaci erde eksprese olur ve seruma salınır (35, 49). Oksidatif stres varlı ında azalmı PON1 aktivitesinin lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olabilece i ileri sürülmektedir (11). Serumda ALT gibi klasik karaci er enzim aktivitelerindeki artı yanında, doku lipid peroksidasyonu, PON1 aktivitesindeki de iim ve di er oksidatif stres göstergelerindeki de iiklikler karaci er hücre hasarının biyokimyasal göstergeleri olarak kullanılabilir (11,44,45,70,78,135).

Uzun süreli alkol kullanımının immün sistem üzerindeki etkileri nedeniyle organizmada enfeksiyon hastalıklarına yatkınlık ve enfeksiyon hastalıklarında artı görülmektedir (17,48). *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) immün sistemi baskılanmı ki ilerde ya amı tehdit eden enfeksiyonlara neden olmaktadır. *P.aeruginosa* kistik fibrozisli ve kronik alkol kullanan hastalarda önemli pnömoni etkeni olarak rol alır (40,103,154). *P.aeruginosa* ile olu turulmu deneysel pnömoni

modellerinde programlanmış hücre ölümünün gerçekleştirildiğini ileri süren çalışmalar yanında (25,55,73,89), P.aeruginosa'ya bağlı olan pnömoni modelinde solunum epitel hücrelerinde apoptotik değişikliklerin gözlenmediğini bildiren yayınlar da vardır (68,131).

Bu çalışmada, kronik alkol kullanımına bağlı karaciğer ve akciğer dokularında meydana gelen hücresel değişikliklerin ve bu değişikliklerin oksidatif stresle ve insitu hücre ölümü ile ilişkisini araştırmak ve kronik alkol kullanımı sırasında meydana gelen fırsatçı akciğer enfeksiyonunun varlığının ve şiddetinin bu değişiklikler üzerine etkisi olup olmadığını ortaya koymak amacıyla planlandı.

2. GENEL B LG LER

Ço u geli mi ÷lkede alkol alımı sosyal bir sorundur. Hafif dozda alkol alımından ba ımlılık düzeyine ula an yüksek doz alkol tüketimi tüm dünyada yaygındır. Hafif ve orta düzeyde alkol alımının bazı sistemler üzerine yararlı etkileri oldu u ancak uzun süreli ve yüksek doz alkol alımının zararlı etkileri oldu u bilinmektedir (48).

Dünyada önemli ölüm nedenlerinden birinin alkole ba lı karaci er sirozu oldu u belirtilmi tir. Kronik alkol kullanımı sonrası sıklıkla nörolojik, kardiyak, muskuler ve pankreatik hastalıklara da rastlanmaktadır (23). Alkolün toksik etkileri alkol alımından sonra serum alkol düzeyi ile direkt ili kilidir. Alkol alındıktan sonra karaci erde metabolize olur. Alkol metabolizması sonrası olu an toksik metabolitlerin karaci erde birikimi sonucu öncelikle karaci er hasarı geli ir ve bunun sonucunda karaci er fonksiyonlarında bozulma olur. Karaci er fonksiyonlarındaki bozulma sonucu karaci er ya lanması ve siroz gibi birçok patolojik süreç geli ir (23, 95,126).

2.1. Alkol (Etanol) Metabolizması

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) hem ya da hem suda çözünebilen küçük bir moleküldür. Bu nedenle barsaktan pasif difüzyonla emilir. Etanol esas olarak karaci erde, daha az oranda böbrek, akci er, mide ve di er dokularda metabolize olur. A ız yolu ile alınan etanolün küçük bir kısmı (%5) gastrik mukozal hücrelerden giri yapıp burada metabolize olurken kalanı kana geçer. Bunların %85-98'i karaci erde metabolize olur. Yalnızca %2-10'u akci er ve böbrekler yoluyla atılır (96).

Etanol metabolizması karma ık süreçleri içerir. Bireysel özelliklerden oldukça etkilenir. Emilimi, atılımı ve dağılımı ki iden ki iye farklılıklar gösterir (96).

Etanolün metabolizmasıyla ili kili enzimler alkol dehidrogenaz (ADH), asetaldehit dehidrogenaz (ALDH) ve mikrozomal etanol okside edici sistem

(MEOS)'den oluşur (96). Karaciğerde alkol metabolizmasından sorumlu başlıca üç yolak tanımlanmıştır (23,70, 92-96).

- 1- ADH yolu: sitozolde yerleşik
- 2- MEOS yolu: Hepatosit endoplazmik retikulumunda yerleşik
- 3- Katalaz yolları: Hepatosit peroksizomlarında yerleşik

Ayrıca nonoksidatif alkol metabolizmasının varlığına dair kısıtlı yayın vardır (23).

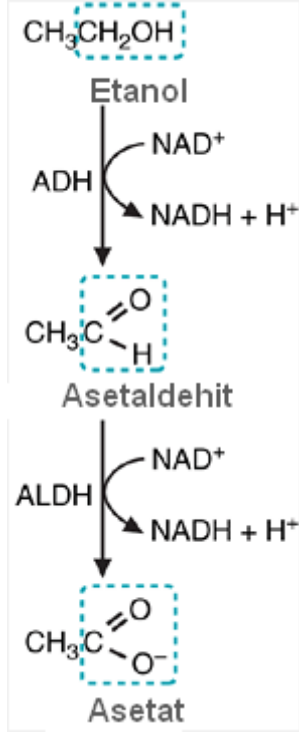
2.1.1. Alkol dehidrogenaz (ADH) yolu

Karaciğerde etanol metabolizmasının ana yolu nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD^+) indirgen nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'a indirgeyerek, etanolü asetaldehite yükseltgeyen sitozolik bir enzim olan alkol dehidrogenaz aracılığıyla gerçekleşir. Metabolizma ile ortamdan uzaklaştırılmazsa, asetaldehit karaciğerde toksik etkiler gösterir ve kan yoluyla diğer dokulara geçip onlar üzerinde toksik etkiler gösterebilir (23, 96).

İnsan ADH enzimi, dimerik çinko bağımlı bir metalloenzimdir. Bu enzim 7. gen üzerinde kodlanmıştır. ADH1-ADH7 arasında sınıflandırılmıştır (23). ADH enzimi, alkol substratının zincir uzunluğuna özgüllüğü nedeniyle izoenzim ailesine sahiptir. Etanol için en fazla özgüllüğü olan ADH sınıfı 1'dir. ADH1 için her biri allelik varyantlar gösteren 3 gen bulunmaktadır. ADH1 karaciğerde bol miktarda bulunmaktadır. Etanol için düşük K_m değerine sahiptir. 0,05-4 mM'lık bu K_m değeri yüksek affiniteyi göstermektedir. Sınıf IV ve Sınıf II enzimler etanol metabolizmasına az katkıda bulunsalar da, bunlar toksik etkilere katkıda bulunabilirler. Etanol konsantrasyonu üst gastrointestinal yolda oldukça yüksek konsantrasyonlarda olabilir ve burada sınıf IV enzimleri (gastrik ADH) tarafından oluşturulan asetaldehit ağız alkoliclerde kanser gelişme riskini artırır (96).

ADH etanolü asetaldehite dönüştürür. Asetaldehit ise aldehit dehidrogenaz (ALDH) enziminin katalizi ile asetata dönüştürülür. Karaciğerde temel toksik etki asetaldehitin birikmesine bağlı olarak oluşur (23,95,122). ADH, etanolü ne kadar hızlı

asetaldehite dönü türürse veya ALDH asetaldehiti ne kadar yava asetata dönü türürse alkole ba lı belirtiler o ölçüde belirgin olur.



ekil 1. Etanol Metabolizması. ADH: Alkol Dehidrogenaz, ALDH: Asetaldehit Dehidrogenaz (96)

ADH enziminin alfa, beta ve gamma alt birimleri olmak üzere üç adet alt birimi tanımlanmıştır. Her alt birim farklı bir gen tarafından kodlanmıştır (70,93,95). Değişik irklarda da iki ADH gen polimorfizmi bildirilmiştir. Özellikle ADH2*2 ve ADH3*1 izoenzimlerinde polimorfizm olduğu belirtilmiştir (23). ADH'nin vücudun farklı bölgelerinde yerleşimi izoformları olduğu gösterilmiştir (23).

2.1.1.1. Gastrik ADH

İnsan midesinde Sınıf I, III ve IV ADH izoenzimlerinin hem düşük hem de yüksek K_m değerinde bulunduğu gösterilmiştir (23,93). Alkol oral olarak alındığında aynı miktarın intravenöz (IV) verilmesine göre, serumda anlamlı şekilde düşük olarak saptanmaktadır. Bu fark alkolün ilk geçiş metabolizması olarak bilinir. Gastrik ADH etnik ve cinsiyet farklılıkları gösterir. Aynı doz alkol verilen kadınlarda erkeklerden anlamlı olarak daha yüksek serum alkol düzeyleri saptandığı bildirilmiştir. Ancak ya

ilerledikçe (50 ya ın üstünde) bu farkın ortadan kalktı ı belirtilmektedir. Bu dü ük ilk geçi metabolizmasının kadınlarda dü ük gastrik ADH aktivitesine, özellikle sınıf III izoenzime ba lı oldu u belirtilmi tir (23).

2.1.1.2. Kolonik ADH

Hem insan hem de rat kolon mukozasında ADH saptanmı tır. Kolonda bulunan bakteriler alkol metabolizmasında rol almaktadırlar. Normal insan flora üyesi olan bazı bakteriler yüksek ADH aktivitesine sahip olup mikroaerobik ko ullarda etanolden asetaldehit olu umuna neden olurlar (23,145,147). Buna bakteriyokolonik yol denmektedir (145). Bu yolda etanol bakteriyel ADH aracılı ı ile metabolize olmakta ve yine olu an asetaldehit bakteriyel veya kolonik mukozal ALDH aracılı ı ile asetata dönü türülmektedir. Ayrıca intrakolonik asetaldehit portal ven aracılı ı ile absorbe edilip karaci erde okside edilmektedir (23). ALDH aktivitesi kolonik mukozada dü üktür ve bu nedenle kolonda asetaldehit birikimi olur ve bu da alkole ba lı gastrointestinal belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur (23).

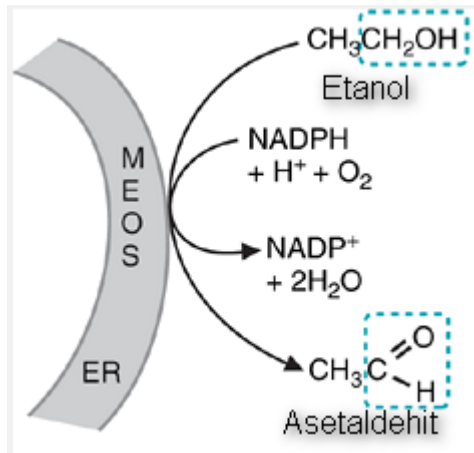
2.1.1.3. ALDH

Olu an asetaldehitin yakla ık %90'ı karaci erde asetata metabolize olur. Major enzim mitokondriyal ALDH (ALDH2)'dir. Bu enzim asetaldehiti asetata dönü türürken NADH olu ur. nsan karaci erinde asetaldehit oksidasyonunun %80'den fazlası ALDH2 tarafından gerçekte tirilir. ALDH2'de yaygın allelik varyant asetaldehit metabolizmasının kapasitesini büyük oranda azaltır. Kalan asetaldehit oksidasyonu sitozolik ALDH (ALDH1) yoluyla olu ur. Di er ALDH'lar çe itli organik alkoller, toksinler ve çevresel kirleticiler üzerine etkilidirler. Toksik etkisi olmayan asetat, asetil CoA'ya dönü üp Krebs döngüsüne girebilir veya ya asit sentezine katılabilir (96).

ALDH enziminin etanol metabolizmasından sorumlu olan ALDH2 enzimini kodlayan gen 12. kromozomda yer almaktadır. ALDH2 enzimidaki polimorfizm, ki ilerde asetaldehit miktarının daha fazla birikmesinden sorumlu tutulmu tur (70).

2.1.2. Mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS)

Karaci erde etanol oksidasyonunun di er bir temel yolu etanolü asetaldehide yükseltgeyen MEOS'dur (ekil 2). Di er birçok ilaç gibi etanol, karaci er endoplazmik retikulumunda yer alan mikrozomal enzimler aracılı ı ile de metabolize edilir. Temel ili kili mikrozomal enzim, elektron vericisi olarak indirgen adenin dinukleotid fosfat (NADPH), elektron alıcısı olarak O₂'yi kullanan sitokrom P450 karma fonksiyonlu oksidaz izoenzimi (CYP2E1)'dir (96). Akut alkol alımından farklı olarak kronik alkol alımında CYP2E1 denilen özgül bir sitokrom P450 enziminin aktive oldu u gösterilmi tir. Bu enzim sitokrom P450'nin etanolü indükleyen fraksiyonudur. CYP2E1'in Km'si göreceli olarak yüksektir (23). MEOS'un etonole ilgisi ADH'dan daha azdır. Bu yol orta derece alkol alanlarda etanol metabolizmasının %10-20'sinden sorumludur (96). Yüksek konsantrasyonda alkol veya kronik alkol kullanımında MEOS anlamlı ekilde yükselir (23). CYP2E1 göreceli olarak NADP kullanarak yüksek indirgeme potansiyeline sahiptir. Bu durum serbest oksijen radikali olu umuna neden olur (82,95). Bu enzim aynı zamanda birçok hepatotoksik bile i in metabolize edilmesinde de rol oynamaktadır. Kronik alkol kullanımı sırasında ba ka ilaçların alınması durumunda bu enzim nedeniyle di er ilaçların da metabolizması etkilenmektedir. CYP2E1 etanolla a ırı indüklendi inde karaci er hasarına neden olmaktadır (95).



ekil 2. Endoplazmik retikulumda MEOS (CYP2E1 dahil) tarafından katalizlenen reaksiyon (96).

2.1.3. Katalaz yolu

Katalaz yolu etanolün metabolize edilmesinde tanımlanmış üçüncü yoldur. Bu yol karaciğer peroksizomlarında yer alan katalaz enzimi aracılığı ile gerçekleşir. Katalaz, peroksizomlarda yağ asitlerinin beta oksidasyonu sırasında oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında rol oynar. Katalaz yolu H_2O_2 varlığında *invitro* olarak etanolü okside eder. Fizyolojik koşullarda çok az rol alan bir sistemdir. Alkolün az miktarda alındığı durumlarda NAD'nin kofaktör olarak rol almasına gerek duyulmadan çalışır bir sistemdir. Bu yolun sonunda da asetaldehit oluşur (23,70). Kronik alkol kullananlarda yağ asitlerinin oksidasyonuna katkı verebilir.

2.1.4. Nonoksidatif yol

Akut alkol intoksikasyonunda yağ asitlerinin etil esterlerinin pankreas, karaciğer, kalp ve yağ dokusunda yüksek konsantrasyonlarda biriktiği ancak bunun doğrulanması bir hipotez olduğu belirtilmektedir (23).

2.1.5. Etanol oksidasyonu sırasında oluşan metabolik denge değişiklikleri

Hem ADH hem de ALDH, NAD^+ 'nin $NADH$ 'a indirgenmesini gerektirir (23,70,94). İndirgenmiş $NADH$ artışı, laktat-piruvat oranındaki değişime neden olur, sonuçta sitozolün redoks sisteminde denge gözlenir (23). Temelde bu redoks dengesizliği karaciğer hasarının nedenidir. $NADH/NAD^+$ oranındaki artışı, alfa gliserofosfat konsantrasyonunda yükselmeye ve bu da karaciğerde trigliserit depolanmasına neden olur. Ayrıca $NADH$ artışı yağ asit sentezinde artışa neden olur ve yağ asitleri karaciğerde birikir (23,70,95,122). Karaciğerde sentezin artması, hepatik lipoprotein sekresyonunda azalma, yağ dokusunda yağ asitlerinin büyük oranda hareketi ve yağ asit oksidasyonundaki azalma sonucunda karaciğerde yağ asit birikimi olur (94,95).

Alkol alımından sonra glikojen depolarında azalma veya karbonhidrat metabolizmasında olu an anormalite sonucu ciddi hipoglisemik tablolar görülebilir. (23).

Alkol alımı ile birlikte esansiyel amino asitlerin alımı interfere olur. Aromatik amino asitlerde artı olur. Bu artı hepatic ensefalopatiye neden olur. Karaci erde albümin yapımı azalır. Azalan albümin sonucunda karın içinde anormal sıvı (asit) birikimi olur. Azalmı üre yapımı sonucunda amonyak düzeyleri artar ve hepatic ensefalopati geli ir (95). Alkol alımı ile birlikte B1 (tiamin), B2 (Riboflavin), B6 (piridoksin) C ve folik asit eksiklikleri geli ir. Ayrıca siroz geli en hastalarda belirgin olarak vitamin A eksikli i geli ir (95).

2.2. Alkol ve Serbest Radikaller

Kronik hastalıkların patogeneğinde oksidatif stres önemli rol oynar. Kronik alkol kullanımına ba lı alkolik karaci er hastalı mın patogeneğinde de oksidatif stresin önemli rol oynadı ı gösterilmi tir (93,116,132). Oksijen radikalleri olu umunda artı veya antioksidan kapasitede azalma sonucunda karaci er hücrelerinde hasar geli ir. Alkol kullanımı sırasında etkilenen karaci er organelleri mikrozomlar ve mitokondridir (126). Kronik alkol alımında hem ADH hem de CYP2E1 aracılı ı ile olu an asetaldehit oksidatif strese neden olmakta ve bunun sonucunda olu an oksijen radikalleri aracılı ı ile lipid peroksidasyonu olu maktadır (17). Etanole ba lı serbest oksijen radikallerindeki artı tan $NADH/NAD^+$ oranındaki artı sorumlu tutulmu tur. $NADH/NAD^+$ oranındaki artı demirin serbestle mesine neden olur. Bu durumda etanolün indükledi i CYP2E1 enzimi aktivitesi artar. CYP2E1'deki artı süper oksit artı na ve bu durumda NADPH varlı nda lipid peroksidasyonuna neden olur (132). Bu oksidatif durum mitokondrial DNA hasarına da yol açar. CYP2E1 yanında, asetaldehitin birikmesi de membranlarda lipid peroksidasyonuna, protein ve DNA hasarına neden olmaktadır (132).

Alkole ba lı oksidatif karaci er hasarında süperoksit (O_2^-) anyonu merkezi rol oynar. Mitokondride süperoksit dismutaz enzimi (SOD) bulunur. SOD, O_2^- anyonunu H_2O_2 'e katalize eder. Alkole ba lı karaci er hastalı nda karaci er hasarının iddeti ile SOD düzeyleri arasında zıt ili ki oldu u belirtilmi tir. Yapılan çalı malarda Cu/Zn-SOD'un veya mitokondriyal Mn-SOD'un alkole ba lı karaci er hasarını önledi i gösterilmi tir (124,132,166,167). SOD1 knockout farelerde yapılan bir çalı mada alkole ba lı karaci er hasarı çok daha iddetli bulunmu tur (79). Olu an H_2O_2 , mitokondriyal Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve peroksizomal katalaz enzimleri ile yıkılır. Demir varlı nda (Fenton reaksiyonu) H_2O_2 hidroksil ($\cdot OH$) radikali gibi daha reaktif radikallere dönebilir. Olu an $\cdot OH$, klorür ($HOCl^-$) radikalleri ve nitrik oksit (NO) aracılı peroksinitrit ($ONOO^-$) radikalleri hücelere hasar verir (126). Demir düzeyleri sıklıkla alkol kullananlarda artar. Bu durum serbest radikal aracılı doku hasarına katkı sa lar (126). Alkole ba lı karaci er hasarında NO'nun etkileri tartı malıdır. NO'nun karaci er hücelerinin apoptoza gidi ini önledi i ve antiapoptotik etki gösterdi ini öne süren görü ler yanında (82,130), kronik alkol alımı sırasında iNOS ekspresyonunun arttı nı ve arttı nı NO düzeylerinin $ONOO^-$ artı na neden oldu unu ve bu durumun hasarı artırdı nı belirten görü ler de vardır (106,173).

Alkol alımında serbest radikal aracılı hasarda rol alan di er bir mekanizma, ya molekülleri üzerine olan etkiler ile geli ir. Oksidatif stres sonucunda olu an serbest radikaller doymamı ya asitlerinden elektron alabilir ve lipid radikaller olu turur. Lipid radikaller O_2 ile reaksiyona girip sonuçta lipid peroksidasyonu geli ir (95,126).

Kronik alkol kullanıcıları günlük kalorilerinin %50'sini alkolden sa lar. Bu durum gastrik malabsorbsiyona neden olur ve sonuçta diyetle antioksidan alımı dü er (132). Alkol kullanımı sırasında glutasyon (GSH) ve vitamin E gibi antioksidan savunmada yer alan maddelerin düzeylerinde azalma görülür. GSH birçok hücre içi ve hücre dı ı sıvıda bulunan antioksidan bir tiyoldür. GSH a ırlıklı olarak karaci erde sentezlenir. Protein ve DNA sentezinde, aminoasitlerin ta nınmasında ve bazı enzimlerin aktivitesinde rol alır. GSH inflamatuvar sitokin kaskadının kontrolü, toksik moleküllerin atılımı ve konjugasyonu ve reaktif oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda önemli

rolü olan bir antioksidandır (17). Kronik alkol kullanımında asetaldehit artışı karaciğerde GSH sentezinde, GSH-Peroksidaz ve GSH-S-transferaz düzeylerinde azalmaya neden olur (92). Sonuçta, artmış serbest oksijen radikal ürünleri ve azalmış antioksidan aktiviteye bağlı olarak hücrel hasar gelişir (95,126).

Etanolün indüklediği karaciğer hasarında S-Adenozil metiyonin (SAM) düzeyinde azalma saptanmıştır. SAM'da azalma protein sentezinde ve nükleik asit sentezinde son derece önemli olan metilasyonun bozulması ile sonuçlanmaktadır. SAM yetersizliği membranlarda hasara ve sonuçta karaciğer hasarına neden olmaktadır (42,61,95).

2.3. Alkol ve Paraoksonaz

Paraoksonaz (PON) enzimi yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ile ilişkili, antioksidan özelliği olduğu düşünülen, karaciğerde sentezlenen bir ester hidrolazdır. İlk kez insan serumunda ve diğer memeli türlerinde organofosfatları hidrolize eden esterazlar olarak tanımlanmıştır (2,3,49). Organofosfatları hidrolize eden iki tip esteraz tanımlanmıştır: Birinci grupta, A tip esteraz olarak bilinen ve p-nitrofenil asetat gibi aromatik esterler içeren organofosfatları (paraokson) hidrolize eden paraoksonazlar; ikinci grupta, paraokson ve diğer organofosfatlar ile inhibe olan ve B tip esterazlar olarak tanımlanan, karboksiesteraz ve kolinesterazlar yer alır (2,3,4,35,49,175). Enzimin aktivitesi ve stabilitesi için kalsiyum gereklidir. Paraoksonazı kodlayan gen insanda 7. kromozomda, farelerde 6. kromozom üzerinde kodlanmıştır. Paraoksonaz gen ailesi üç üye içerir; PON1, PON2 ve PON3. PON1 karaciğer ve plazmada bulunur. PON3 karaciğer, böbrek, kalp, beyin gibi birçok dokuda bulunur (13,35,49).

PON-1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi vardır. Paraoksonda fenil asetat, tiyofenilasetat, 2-neftil asetatın ve lakton halkası içeren çeşitli maddelerin de PON1 enzim aktivitesi için substrat olduğu bilinmektedir (34,36). Paraokson, PON1 varlığında p-nitrofenole dönüşür. Reaksiyon sonucunda oluşan p-nitrofenol 405 nm'de görünür bölgede absorbans verir (115). PON1'in kullandığı ikinci substrat fenil asetatıdır. Fenil asetat, arilesteraz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan bir

substrattır. Arilesteraz (aril-ester hidrolaz) (AE) da bir paraoksonaz olarak sınıflandırılmaktadır (98,99). PON1 arilesteraz aktivitesi ile fenil asetatı fenol ve asetata hidrolize eder. Fenol 270 nm'de absorbans verir (60).

Serum PON-aktivitesi, yenido an ve prematüre infantlarda eri kin düzeyin yarısı kadardır. Do umdan bir yıl sonra eri kin düzeylerine ula ır. leri ya ta PON-1 aktivitesinin azaldı ı belirlenmi tir (13). Serumdaki PON düzeyi ve aktivitesi bireyler arasında de i kenlik gösterdi i gibi etnik ve co rafi farklılık da göstermektedir (35,87).

PON1'in dü ük dansiteli lipoprotein (LDL)'nin oksidasyonunu önledi i ve oksidLDL oluşumunu azaltarak koroner arter hastalıklarında koruyucu rolü oldu u belirtilmektedir. Ayrıca PON1'in HDL'deki ApoA1 ile olan ili kisine ba lı HDL'nin koroner arter hastalıklarındaki koruyucu etkisine katkı sa ladı ı belirtilmektedir (13, 39). PON1 bir antioksidan olarak kabul edilmekte ve alkolik karaci er hastalı ında prognostik bir belirteç olarak önerilmektedir (127). Hafif alkol kullanımının insan ve ratlarda karaci er mRNA upregülasyonuna neden oldu u ve PON1'i uyardı ı, ancak a ır alkol kullananlarda benzer durumun gözlenmedi i bildirilmi tir (30,135).

PON1'in sentezinde karaci er anahtar rol oynar. Klinik ve deneysel çalı malarda azalmı PON1 düzeylerinin karaci er hücre hasar göstergesi olabilece i belirtilmi tir (6,11,80,104).

2.4. Alkol ve İmmün Sistem

İmmün sistemin fizyolojik i levi enfeksiyonları engellemek ve yerle mi enfeksiyonları yok etmektir. İmmün sistem do al ve kazanılmı ba ı klık mekanizmalarını içerir. Konak savunma mekanizmaları enfeksiyonlara kar ı ilk koruyucu engeli olu turan do al ba ı klık ve daha sonra devreye giren ve kısmen daha yava olan ancak daha etkili savunma sa layan edinsel ba ı klı ı kapsar. Epitelyal bariyerler, fagositer hücreler (nötrofil, makrofaj gibi), kompleman sistemi ve do al

öldürücü (NK) hücreler doğal bağımlılıkta rol alırken; T ve B lenfositler ve antikorlar da temel olarak edinsel bağımlılıkta rol alır. Ayrıca immün sistemin düzenlenmesinde ve aktivasyonunda birçok sitokin ve sitokin benzeri molekül görev alır (1,24,81). Akut veya kronik alkol kullanımının immün sistemin özgül elemanları üzerine baskılayıcı etkileri vardır ve bu durum enfeksiyon hastalıklarına yatkınlığı arttırdığı gibi enfeksiyonun şiddetini de artırır. Alkolün immün sistem üzerine baskılayıcı etkilerini anlamak alkol kullanan bireylerde oluşan enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yeni tedavi edici yaklaşımları belirlemek açısından önemlidir (50). Enfeksiyon hastalıklarına karşı savunmada makrofaj ve nötrofil gibi hücreler mikroorganizmalarla ilk karşılaşma anları hücreler olmaları ve fagositoz yapma özellikleri nedeniyle anahtar rol oynarlar. Alkol bu hücreler üzerine çeşitli yollar ile etki etmektedir. Alkol makrofajlarda fagositozu inhibe eder ve dolayısıyla fagositoz ile mikroorganizmaların hücre içi öldürülmeleri engellenmiş olur (18). Alkolik bireylerin kanlarından izole edilmiş olan nötrofillerde fagositoz mekanizmasının migrasyon ve kemotaksis gibi iki önemli bölümünde, fonksiyonlarının azaldığı ve bozulduğu gösterilmiştir (50,153). Kronik alkol kullanımında NK hücreleri sayıca azalırken aynı zamanda öldürme seviyeleri de azalmaktadır (50,153).

Alkolik bireylerde sitotoksik ve yardımcı T lenfositlerinde sayıca azalma gözlenmektedir. Kronik alkol kullanımında major histokompatibilite kompleks (MHC)-II ekspresyonu azalmakta, ayrıca alkol kullanımına bağımlı olarak yardımcı T lenfosit (Th) lerin Th1-Th2 dönüşümü de değişmektedir (50,153).

Deneysel olarak yapılan çalışmalarda alkol verilen farelerde B lenfositlerde sayıca azalma gözlenmiştir. Alkolik bireylerde dolağımdaki B lenfositlerinde önemli bir etkilenme olmamasına karşın IgG ve IgA alt gruplarında artış olduğu belirtilmiştir (50).

Sitokin ve benzeri maddeler immün sistem hücreleri arasında haberleşmeyi sağlar. Alkol varlığında TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeyleri değişmektedir (31,50,153,164,171). Akut alkol alımında TNF ekspresyonu baskılanırken, kronik alkol kullanımında dolağımdaki TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeyleri artmaktadır (12,50,171).

Kronik alkol alımına maruz kalan karaci erde C1, C3, C8 ve C9 kompleman komponentinin birikti i ve alkol ile C3'ün karaci er sentezinin arttı ı gösterilmi , bunun karaci er ya lanmasına katkı sundu u belirtilmi tir (20,21). Etanol ile faktör B, C1qA up-regüle, Faktör H, MASP-2, Faktör D ve terminal komponentlerden C6, C8 ve C9 down-regüle olmaktadır. Sonuçta kronik alkol kullanımı klasik ve alternatif yolun ba langıç komponentlerini indüklerken, terminal yol komponentlerini baskılamaktadır. Alkolün indükledi i karaci er hasarına çözünür düzenleyici moleküllerin katkı sundu u belirtilmektedir (21).

2.5. Alkol ve Akci er Enfeksiyonu

Uzun süreli alkol kullanımının immün sistem üzerindeki etkileri nedeniyle konak hücrelerinde enfeksiyon hastalıklarına yatkınlık ve enfeksiyon hastalıklarında artı görülmektedir (153). Özellikle toplumdan kazanılmı pnömoni, tüberküloz, bakteriyel peritonit, spontan bakteriyemi gibi klinik tablolar ve herpes, hepatit viruslarını da içeren viral enfeksiyonlar alkol kullanan ki ilerde artımı olarak bildirilmi tir (48). Alkolün immün sistem üzerinde düzenleyici etkisinin oldu u bildirilmi tir. Lenfosit popülasyonunda azalma veya lenfoid organların yapısında ve fonksiyonlarında de i ikli e neden olmaktadır (48). Alkol kullanan bireyler özellikle akci er enfeksiyonuna yatkınlık göstermektedirler. Hem gram pozitif hem de gram negatif mikrobiyal etkenler pnömoni yapmaktadır (50). Alkol kullanan bireylerde kullanmayan bireylere göre pnömoni görülme sıklı ı artımı tır (144). Toplumdan kazanılmı , özellikle P.aeruginosa ve Acinetobacter türlerine ba lı pnömonili bireylerde alkol kullanım öyküsü öne çıkmaktadır (63,103). Alkol kullanımı ba ımsız olarak akut respiratuar distress sendromu (ARDS) riskini ve ciddiyetini arttırmaktadır (17,57). Alkolün konak hücrede pnömoniyeye yatkınlı ı arttırmasında birçok mekanizma rol almaktadır. Kronik alkol kullanımı konak hücrenin do al ve kazanılmı ba lı klık mekanizmaları üzerine etki ederek yatkınlı ı arttırmaktadır. Özellikle fagositoz mekanizmasındaki bozulma, alveolar makrofajların fonksiyonunda meydana gelen de i iklikler enfeksiyon yatkınlı ını arttırmaktadır (50).

Karaci er ve gastrik mukoza ADH enziminin izoformlarına yüksek afinitededir. Ancak yüksek düzey alkol varlı ında özellikle MEOS (CYP2E1) ile alkol metabolize edilmeye çalı ılır (17,92). Akci erlerde ADH enzimi yoktur; bu nedenle akci erlerde alkol metabolizması CYP2E1 ile olmaktadır (17). Hem ADH hem de CYP2E1 ile alkolün metabolize olması sonucu olu an asetaldehit serbest oksijen radikallerinin artı ına neden olur. Olu an radikal ürünler dokulara zarar verir.

Akci er dokusundaki hasar sadece artan radikal ürünler nedeniyle de il, aynı zamanda azalmı olan antioksidan savunma sistemi nedeniyle de olur. Akci erde glutasyon antioksidan savunma mekanizması olarak merkezi bir rol oynar (17). Normal artlarda alveolar tip II hücrelerinde GSH, hem plazmaya göre hem de di er hücre dı ı sıvılara göre birkaç yüz kat daha fazla miktarlarda bulunur. Alkol kullanan ancak herhangi bir karaci er hasarı olmayan ve sa lıklı alkol kullanıcısı bireyler olarak tanımlanan ki ilerde alkol öyküsü olmayan bireylere göre alveolar epitelyal sıvıda GSH'ın %80 daha az oldu u belirtilmektedir. Azalmı glutasyon düzeyi alveolar tip II hücrelerinin ve alveolar makrofajların i levini azaltır. Sonuçta epitelyal sekresyonlarda azalma, oksidan strete artma ve fagositozda bozulma olur ve akci er dokusunda zedelenme ve enfeksiyona yatkınlık geli ir (16,17,18). Kronik Alkol kullanımında akci er savunma mekanizmasındaki de i iklikler ekil 3'de gösterilmi tir

Orofarinks

Sekresyonlarda

Gingival bütünlükte

Bakteriyel patojen kolonizasyonunda

Glottis

Öksürük refleksinde

Aspirasyonda

Hava Yolları

Mukosilyar fonksiyonda

Do al Ba ı ıklık Sistemi



Alveolar makrofajlar ve nötrofil fonksiyonlarında

(adezyon, kemotaksis, fagositoz, sitokin, kemokin üretimi gibi)

Edinsel Ba ı ıklık Sistemi



Hücre sel ve humoral ba ı ıklık yanıtta

Akci er enfeksiyon geli imi

ekil 3. Kronik Alkol kullanımında akci er savunma mekanizmasındaki de i iklikler (Kaynak 63'den düzenlenmiştir)

2.6. Apoptoz - Programlanmı Hücre Ölümü

Apoptoz, multisellüler organizmalarda görülen, organizmanın yararı için öldürölüp uzakla tırılan spesifik hücreler için düzenlenmi bir süreçtir. Apoptoz fizyolojik olarak embriogenez, eri kinlerde hormonal involüsyon (menstrual siklus), dokuların ekil de i ikli i veya tamiri, intestinal kript epiteli gibi proliferen hücre popölasyonunun azaltılması, timus geli imi sırasında immün hücrelerin ölümü gibi olaylarda izlenir. Kanseri, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar veya DNA hasarı olu an di er patolojik süreçlerde de hasarlı hücrelerin eliminasyonu sırasında apoptoz görülür (141,150).

Apoptoz hücre dı ı ve hücresele düzeylerde olu an çe itli sinyaller aracılı ı ile tetiklenir. Apoptoz, çevresel ya am sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizli i, Fas-Fas ligand veya TNF aracılı ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, iskemi, toksinler ve radyasyon gibi hücre dı ı sinyaller ile veya DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artı ı, hücre içi pH azalı ı ve metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları gibi hücre içi sinyaller ile ba latılabilir (141,150).

2.6.1. Apoptotik yollar ve kaspazlar

Apoptoz olu umunda ölüm reseptör yolu ve mitokondriyal yol olmak üzere iki yol tanımlanmı tır. Hücresele düzeyde etkili temel fizyolojik faktör, CD95L olarak da tanımlanan Fas ligand (FasL) ve tümör nekroz faktör (TNF)'dir. Ölüm faktörleri olarak belirtilen bu proteinlerin ilgili reseptörlerine ba lanması ile apoptoz ba latılır (65,150).

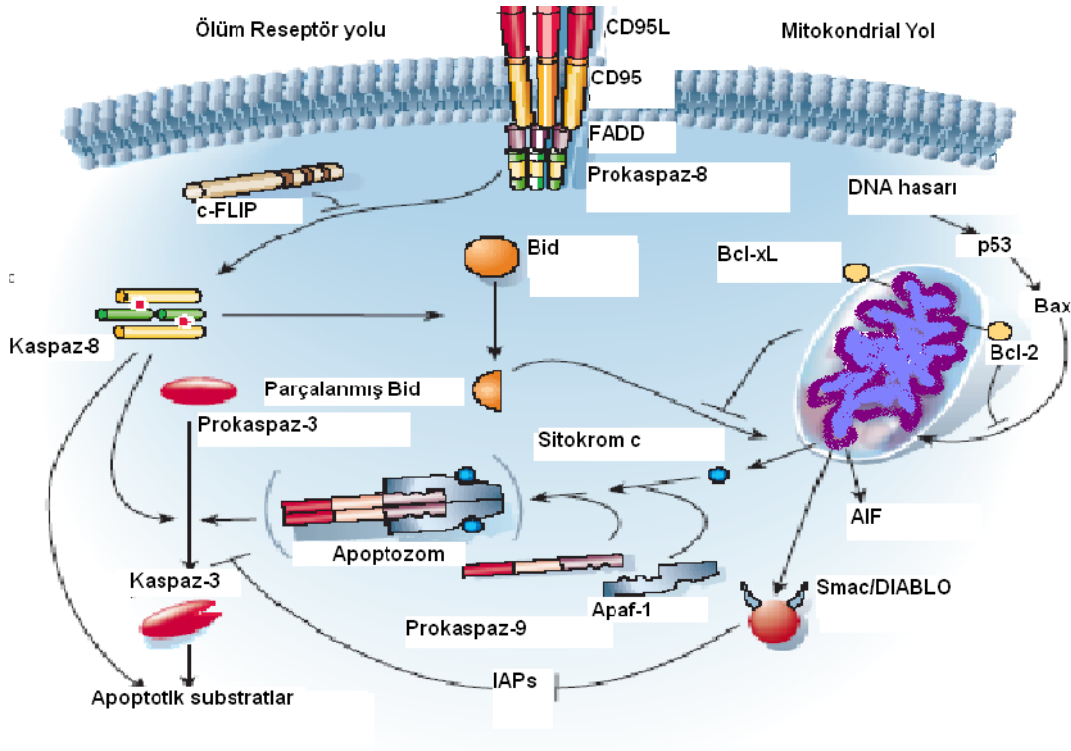
2.6.1.1. Ölüm reseptörü yolu

Ölüm reseptör yolu, CD95 ve TNF gibi ölüm reseptör süperfamilyası üyeleri tarafından tetiklenir. CD95L (FasL) veya TNF ekstrasellüler reseptörlerine ba lanarak, kaspaz 8 aktivasyonu ile sonuçlanan DISC (Death Inducing Signaling Complex) olu umuna neden olur (65). Daha sonra DISC, FADD (Fas-associated protein with a

death domain) denen moleküle ba lanır. Bu ba lanma kaspaz-8 aktivasyonuna neden olur. Kaspaz 8 ölüm sinyalinin iletiminde rol alan proteazlardandır. Kaspaz-8'in aktive olması ile di er kaspaz kaskadı kendi kendine aktive olarak, prokaspaz-3 ve kaspaz-3'ü aktive eder ve ölüm sinyalinin nükleusa kadar iletirler (ekil 4). Bu sürecin sonunda kromozomal DNA yıkıma u rar (41,59,65,141,150).

2.6.1.2. Mitokondrial yol

Hüresel streslerle aktive edilir. Olu an sinyal veya intrasellüler de i iklik sitozole sitokrom c salınımına neden olur. Sitokrom c, Apaf-1 ve prokaspaz-9'a ba lanarak apoptozom olu turur ve kaspaz 9 aktivasyonunu sa lar. Bunun sonucunda prokaspaz-3 kaspaz-3'e dönü ür (ekil 4) ve sonuçta ölüm sinyali nükleusa iletilir ve apoptoz gerçekte ir (65,141).



ekil 4. Apoptotik Yollar (Kaynak 65'den düzenlenmiştir)

2.6.1.3. Kaspazlar

Sistein proteazlardır. Sitoplazmada inaktif öncüller olarak bulunurlar. IL-1 beta converting enzim (ICE) prekürsörü olarak tanımlanırlar. nsanda yakla ık 14 kaspaz tanımlanmı tır. Bu enzimler tetrapeptid motifler olarak bilinirler ve proteinleri aspartat kalıntılarının karboksil bölgesinden bölerler. Bu nedenle c-asp-ase adını alırlar. Ba laticı ve efektör kaspazlar olarak iki grupta sınıflandırılmı lardır. Ba laticı kaspazlar (kaspaz **2, 8, 9, 10**) efektör kaspazları (kaspaz **3, 6, 7**) aktive ederler (65,141, 150).

Bazı kaspazlar özellikle efektör kaspazlar, DNA tamir enzimleri, lamin, gelsolin bir p53 inhibitörü olan MDM2, protein kinaz C gibi canlı hücre proteinlerini parçalar ve inaktive ederler. Belli kaspazlar örne in kaspaz 3, kinaz P-21'in aktive etti i protein kinaz2'den negatif düzenleyici domainlerini alabilirler. Bunun sonucunda plazma membran tomurcuklanması tetiklenir. Kaspazla aktive olmu DNaz (CAD) normalde bir inhibitor olan iCAD (DNA fragmentasyon faktör (DFF)) ile ba lanarak inhibe olur. Ancak apoptoz sırasında iCAD, kaspazlar ile inaktive edilir ve bu da aktif endonukleazların salınmasına ve sonuçta karakteristik olarak internukleozomal DNA parçalanmasına neden olur (65,150).

Kaspazların özellikle kaspaz 3'ün apoptozdaki bu merkezi rolünden dolayı hayvan ve insan çalı malarında patolojik süreçlerdeki kaspaz aktivitesi ara tırılmaktadır (74,86,102,118,177).

2.6.2. Apoptoz ve alkol

Kronik alkol kullanımı ciddi ve potansiyel olarak ölümcül karaci er hastalıklarına neden olmaktadır. Kronik alkol kullanımı sırasında karaci er hücrelerinde apoptotik de i ikliklerden nekroza varan düzeyde doku hasarı görülmektedir. Apoptoz ve nekroz hücre ölümündeki iki önemli mekanizmadır. Alkole ba lı hepatositler, nöronlar ve

intestinal epitel hücrelerinde apoptotik de i imler gözlenmi tir (52,107,108). Alkole ba lı hepatositlerdeki apoptozun karaci er hastalıklarının geli iminde rol aldı ı bildirilmi tir (176). Alkol aracılı apoptoz multifaktöryel bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Bu süreçte,

- 1) Oksidatif stres mekanizmaları
- 2) Özellikle TNF- , TGF- gibi sitokinler
- 3) Ölüm reseptör yolları (TNF-reseptör ve Fas/CD95 gibi) rol almaktadır (52, 108).

Alınan alkol miktarı ve süresi, hücrelerin apoptoze mi yoksa nekroza mı gidece ini belirlemektedir. Yüksek miktarlarda alkol alımı apoptozda azalma ancak nekrotik hücre sayısında artı yapmaktadır. Olasılıkla bu durumun mikrozomal sitokrom komponentlerinin uyarılmasından kaynaklandı ı ve özellikle CYP2E1e ba lı oldu u dü ünülmektedir. Dü ük doz alkol alımında daha çok apoptoz gözlenmekte ve burada da Fas reseptör sistemi rol almaktadır (52,108).

2.6.3. Apoptoz ve bakteriyel enfeksiyonlar

Bakterilerin tetikledi i apoptoz çe itli mekanizmalar ile gerçe klemektedir. Bakteriler tarafından salgılanan çe itli moleküller apoptotik mekanizmaları tetikleyebilmektedir. Por-olu turan toksinler, di er toksinler, efektör proteinler, süperantijenler, moleküllerin aktive etti i endojen ölüm mekanizmaları, lipopolisakaritler gibi farklı yapı ve moleküller apoptozu tetiklemektedir (54,88,165).

Birçok bakterinin farklı moleküller aracılı ı ile sonuçta Fas/FasL ve mitokondriyal yolu tetikleyerek apoptozu ba lattı ı bildirilmi tir. Ancak halen bakterilere ili kin yollar tam olarak anla ılamamı olup, bu yöndeki çalı malar devam etmektedir (54,62,84). Bakterilere ba lı apoptoz iki yönlü de erlendirilmektedir:

1-Hücrelerde apoptozun indüksiyonu hücre bütünlü ünü bozar ve bakterilerin submukozaya, kana ve uzak organlara yayılımının artmasına neden olarak enfeksiyonun ilerlemesine neden olur.

2-Bakteri ile infekte hücrelerde apoptotik cisimciklerin fagositozu ile patojen hızla ortadan kaldırılır (54).

Belirtilen her iki görü nedeniyle bakterilerin indükledi i apoptoz bazen kona ın yararına bazen de zararına olabilmektedir. Bu nedenle bakterilerin tetikledi i apoptotik yolların tanımlanması yeni tedavi yakla ımlarında yol gösterici olabilecektir.

2.7. Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa) gram negatif nonfermentatif aerobik bir basildir. P.aeruginosa özellikle immün yetmezlikli ve kistik fibrozisli hastalarda hastane enfeksiyon etkenleri arasında önemli yer tutmaktadır. Yanık ünitelerinde baskın patojenlerdir. P. aeruginosa fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir. P.aeruginosa su larına ba lı olarak endokardit, solunum sistemi enfeksiyonları, bakteriyemi, menenjit ve beyin absesi, kemik, eklem enfeksiyonları ve üriner enfeksiyonlar geli mektedir (10, 40,85). P.aeruginosa su ları çe itli genler aracılı ı ile hücre dı ı proteinler ile ili kili virulans faktörleri salgılar. Adezinler, pyosiyenin, proteazlar, hemolizinler, ekzotoksin ve ekzoenzim S, biyofilm yapımı P.aeruginosa su larında tanımlanmı bazı virulans faktörleridir (32).

2.7.1. Pseudomonas aeruginosa pnömonisi alkol ve apoptoz

P.aeruginosa su ları ile enfeksiyonlar özellikle normal konak savunmasının bozuldu u durumlarda geli mektedir. Doku bütünlü ünün bozuldu u, immün sistemin baskılandı ı durumlarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle P.aeruginosa pnömonisi uzun süre hastanede yatan ve solunum cihazına ba lı hastalarda, kronik obstüriktif akci er enfeksiyonu olan hastalar ve kronik alkol kullanan ki ilerde artmı tır (27,43,103).

P.aeruginosa ile olu turulmu deneysel pnömoni modellerinde CD95/CD95L up-regülasyonu oldu u gösterilmi tir. Bu reseptör ligand ba lanmasının kaspazları aktive etti i ve mitokondriyal de i im sonucu apoptozun gerçekleşti i ileri sürülmektedir (25,73,89,142). P.aeruginosaya ba lı olu an pnömoni modelinde solunum epitelinde apoptotik de i iklikleri inceleyen ve virulans özelliklerinin apoptotik de i imdeki rolü

üzerine yapılan çalı malar vardır (5, 68, 72,146, 160).

2.7.2. *Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonu ve paraoksonaz*

Birçok bakteri gibi *P.aeruginosa* su ları da ço almak için atmosfer, besin gibi çevresel faktörlere ve çe itli virulans özelliklerine gereksinim duyar. Bazı bakteriler kendi aralarında haberle meyi sa layan ve toplu ya am ko ulları olu turan bazı sinyaller salgılar. Bu toplu ya ama çabası otoindüksiyon fenomeni veya “quorum sensing” (QS) ve burada rol alan sinyaller de otoindükleyici sinyaller olarak isimlendirilmektedir (152). Ço u otoindükleyici serbestçe diffüze olup membrandan geçip transkripsiyon ailesinden LuxR’ye ba lanarak aktivitenin düzenlenmesini bozar. Gram pozitif bakteriler 5-17 aminoasit uzunluktaki otoindükleyicileri sentezlerken, gram negatif basiller küçük açıl-homoserin lakton (AHL) olarak isimlendirilen molekülleri sentezlerler. *P. aeruginosa* su ları da AHL olarak bilinen quorum sensing sinyaller olu tururlar. *P.aeruginosa* ile olu an enfeksiyonların ba langıç döneminde quorum sensing molekülleri miktar olarak dü üktür. Ancak bakteri ço almaya devam ettikçe otoindükleyici miktarı artar ve ba langıçta dü ük olan bakteri miktarı da gittikçe artar ve biyofilm denen olu umu gerçekleştirir (152). *P.aeruginosa* sentezledi i ekzotoksin A, alkalın proteaz, elastaz ve piyosiyenin gibi virulans faktörleri aracılı ı ile quorum sensingi düzenler ve bu da biyofilm olu umunun ba langıcını kontrol eder (32).

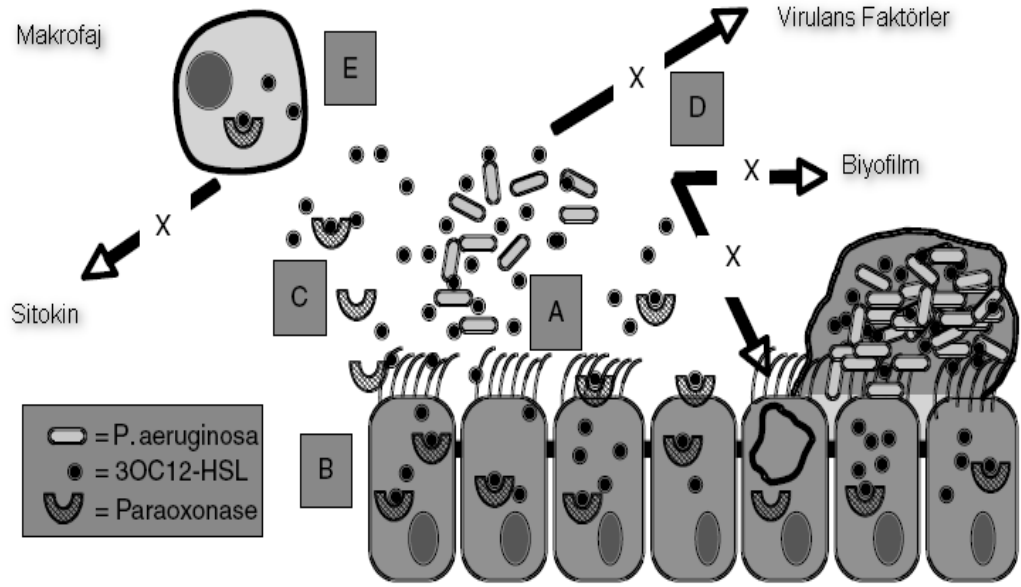
P.aeruginosa su larında tanımlanmı iki grup AHL vardır. Bunlar Las ve rhl sistemleridir. LasI N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) sentezleyen bir enzimi kodlar iken, LasR 3OC12-HSL’na yanıt veren transkripsiyon faktörüdür. RhII, N-butanoyl homoserine lactone (C4-HSL) sentezleyen bir enzimi kodlar. RhR ise, C4-HSL yanıt veren transkripsiyon faktörüdür. C4-HSL üretimi, 3OC12-HSL ile pozitif olarak düzenlenir (152). *P.aeruginosa* QS sinyalleri *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında ve kona ın bu enfeksiyonlara immün yanıtında kritik rol oynar (128,156).

Endojen paraoksonaz substratları tam olarak bilinmemektedir. PON1, 2 ve 3’ün birden fazla substratı kullandı ı, arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi oldu u

bilinmektedir. Ayrıca PON enzimlerinin laktonaz aktivitesi olduğu bildirilmiştir (37). Her üç PON enzimi ile lakton hidrolizi gerçekleştirilmektedir. PON1 ve PON3 yirminin üzerinde aromatik ve alifatik laktonu hidrolize eder iken PON2 bu yönden daha zayıftır. Doymamı ya asitlerinin lakton metabolitleri her üç PON enzimi için substrat görevi yapmaktadır. P.aeruginosa'nın salgıladığı AHL ürünleri özellikle PON2 aracılığı ile inhibe olmaktadır. Son çalışmalar insan ve fare PON1 enziminin P.aeruginosa QS sistemi üzerinde düzenleyici rolü olduğunu göstermektedir (121). PON2'nin hem bakterinin AHL sinyalleri aracılığı ile virülansını azalttığı hem de enfeksiyona konakçıya yanıtını modüle ettiği düşünülmektedir (37,157).

P.aeruginosa ile akciğer enfeksiyonu geliştiğinde ortamda artan 3OC12-HSL molekülleri hava yolu epitel hücrelerine diffüze olmaya başlarlar. Bu durum quorum sensing genlerinin aktivasyonuna yol açar. Bu arada PON enzimleri enfeksiyon bölgesine salınır ve quorum sensing sinyallerini yıkar. Quorum sensing sinyallerinin yıkılması sonucu bakteriler biyofilm oluşumuna gidemez veya çok az oranda biyofilm yaparlar. Bunun sonucunda konakta daha az şiddette enfeksiyon gelişir (152). P.aeruginosa suşlarından 3OC12-HSL defektif olanların biyofilm oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (32,152).

P.aeruginosa quorum sensing sistemi üzerinde paraoksonazın rolü ekil 5'de gösterilmiştir (152).



ekil 5. *P.aeruginosa* quorum sensing sistemi üzerinde paraoksonazın rolü (Kaynak 152'den düzenlenmiştir)

- A: Çok alan *P.aeruginosa* su larından 3OC12-HSL salınımı
- B: 3OC12-HSL moleküllerinin hava yolu epiteline difüzyonu
- C: PON enzimlerinin infekte bölgeye salınımı ve 3OC12-HSL moleküllerini inaktive etmesi
- D: Virulans faktörlerinin salınımının azalması ve biyofilm oluşumunun engellenmesi
- E: PON enzimlerinin 3OC12-HSL inaktive etmesi sonucu, 3OC12-HSL moleküllerine bağımlı konak savunma mekanizmalarında düzenlemeler (sitokin salınımı gibi)

Quorum sensing moleküllerinden 3OC12-HSL ve diğer uzun zincirli AHL'lar memeli hücrelerinde proinflamatuar mediyatörlerin salınımını arttırdı ve apoptozu indükledi ve QS defektli su ların daha az virulan oldukları belirtilmektedir. (37).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalı ma için Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kuruluna başvuruldu ve etik kurul onayı (Ek-1) alındı. Çalı ma öncesi alkol ve enfeksiyon modeli için ön denemeler yapıldı. Deney hayvanlarında alkol modeli için yapılan ön denemelerde, etanollü diyet verilen ratlarda karaci er üzerine etkiler histolojik olarak gözlemlenildi ve enfeksiyon modeli için ön denemelerde uygun doz ve süre belirlendikten sonra çalı ma modeli oluşturuldu.

Deney sel çalı malarda kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich, Merck, Fluka-Riedel-deHaen'den sağlanmıştır.

3.1. Çalı ma Grupları

Çalı mada erkek Wistar ratlar kullanıldı. Her gruptaki ratların ortalama a ırlıklarının di er bir gruba benzer olmasına dikkat edildi ve ratlar be gruba ayrıldı. A a ıda belirtilen sayılarda rat kullanılarak çalı maya başlandı.

- 1- Normal katı diyet verilen sham grubu (S) (n=6)
- 2- Normal sıvı diyet verilen kontrol (NSK) grup (n=8)
- 3- Normal sıvı diyet verilen ve P.aeruginosa pnömonisi oluşturulan (NSP) grup (n=8)
- 4- Etanol (alkol)lü sıvı diyet verilen kontrol (ESK) grup (n=8)
- 5- Etanollü sıvı diyet verilen ve P.aeruginosa pnömonisi oluşturulan (ESP) grup (n=8)

3.1.1. Alkol verilen ve normal kontrol grubu için sıvı diyet

Diyet içeri i daha önce tanımlanan izokalorik sıvı diyet temel alınarak hazırlandı (91,170). Alkol verilen gruplara günlük enerji kalorisinin %36'sını alkolden sağlayacak şekilde (Tablo 1) düzenlenmiş olan sıvı diyet verildi (91, 170).

Tablo 1. Sıvı diyetin protein, karbohidrat ve yağ içerikleri

çerik (g/L)	Kontrol gruplar için normal sıvı diyet	Alkol verilen gruplar için etanollü sıvı diyet
Kazein	41.4 g	41.4 g
Maltodekstrin	115.2 g	25.6 g
Zeytin yağı	28.4 g	28.4 g
Mısır Yağı	8.5 g	8.5 g
Ayçiçek yağı	2.7 g	2.7 g
Etanol (%95)	-	50 g

Sıvı diyet her iki grupta günlük olarak hazırlandı. Alkol verilen gruplarda etanol kullanım anında eklendi. Alkol ve normal sıvı diyet verilen her rat ayrı bir kafeste olmak üzere günlük olarak taze hazırlanmış olan sıvı diyet ile beslendi. Deney hayvanları laboratuvar koşullarında genel durumları ve gelişimleri yönünden düzenli olarak izlendi.

3.1.2. Sham grubu için diyet

Sham grubu normal katı diyetleri ile beslendi. Sham grubundaki ratlar normal deney hayvanları laboratuvar koşullarına uygun olarak izlendi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Pnömoni modeli

Tüm gruplar belirtilmiş olan diyetlerle 6 hafta süresince beslendi. Altı haftanın sonunda 7. haftanın başında 3. ve 5. grupta yer alan sıçanlarda deneysel olarak *P.aeruginosa* pnömonisi oluşturuldu. Pnömoni modelinde *P. aeruginosa* PAO1 suyu

(Kullanılan su Prof. Dr. Abdul N. Hamood ve Dr. Jane Colmer Hamood'dan (Texas Tech University Health Sciences Center Department of Microbiology and Immunology) alınmıştır) kullanıldı.

3.2.1.1. *P.aeruginosa* süspansiyonunun hazırlanması

Deneyde kullanılacak bakteri miktarı ön denemelerden alınan sonuçlara göre belirlendi. Kanlı agarda bir gece 37 °C'de üremi olan *P.aeruginosa* PAO1 su undan Luria Bertani (LB) broth içine subkültür yapıldı ve yeniden 37 °C'de bir gece etüvde inkübasyona bırakıldı. Deney öncesinde LB broth içinde bir gece üremi olan bakteri süspansiyonu taze LB broth içinde yeniden süspansiyon edildiikten sonra 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra bakteri pelleti iki kez steril posfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkandı (136). Son işlemden sonra bakteri pelleti bakteri yoğunluğu 2×10^9 CFU/ml olacak şekilde PBS ile resüspansiyon edildi. Pnömoni modeli için hazırlanan bu bakteri süspansiyonları kullanıldı (89,136). Hazırlanmış olan bu süspansiyondan kontrol amacıyla ekimler yapıldı ve bir gecelik inkübasyondan sonra bakteri varlığı ve yoğunluğu açısından değerlendirildi.

3.2.1.2. Pnömoni oluşturulması

Pnömoni oluşturulacak ratlar kısa süreli anestezi ile (ketamin 90 mg/kg-ksilazin 10mg/kg) uyutuldu ve ön boyun bölgesi cilt insizyon ile açıldı ve trakea görünüldükten sonra enjektör ile intratrakeal bakteri süspansiyonu uygulandı (9). Hazırlanmış olan bakteri süspansiyonu 0.5 ml/kg'a insülin enjektörü (26G iğne uçlu) ile intratrakeal olarak verildi ve hemen ardından 0.5 ml hava enjekte edilerek bakteriyel süspansiyonun alt solunum yollarına geçi sağlandı (89,136). Kontrol grubu (NSK ve ESK) ratlarda bakteri süspansiyonu yerine benzer şekilde steril serum fizyolojik verildi. Tüm ratlarda açılan insizyon bölgeleri uygun şekilde steril koşullarda dikildi.

Çalışmaya alınan ratlardan Grup 4'deki bir ve Grup 5'deki bir rat intratrakeal uygulamadan hemen sonra öldü. Tüm ratlar genel durumları yönünden izlendi. Grup

5'deki iki rat intratrakeal P.aeruginosa PAO1 uygulamasından sonraki 20. saatte, Grup 3'deki bir ratın 21. saatte ölmesi üzerine tüm ratlar 21. saatte uygun anestezi altında uyutulduktan sonra mikrobiyolojik, biyokimyasal ve histolojik çalı malar için akci er ve karaci er dokuları ve serum örnekleri alındı. Mikrobiyolojik de erlendirme için alınan doku örnekleri steril ko ullarda uygun kaplar içerisinde mikrobiyoloji laboratuvarına ula tırıldı. Biyokimyasal çalı malar için serum ve doku örnekleri (sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra) -20 °C'de çalı ma anına kadar uygun ko ullarda saklandı.

Histolojik çalı malar için alınan doku örnekleri %10 Formaldehit solüsyonu içinde tespit edildikten sonra incelemeye alındı.

3.2.1.3. Bakteriyolojik üremenin de erlendirilmesi

Tüm gruplardaki doku örnekleri steril kaplarda ve steril ko ullarda tartıldı ve 1 ml PBS içinde homojenize edildi ve daha sonra seri dilüsyonlar yapılarak ölçülü öze ile Kanlı ve EMB agara ekimler yapıldı. Bir gece 37°C'de etüvde inkübe edildikten sonra P.aeruginosa üremeleri yönünden koloniler de erlendirildi, mikrobiyolojik olarak tanımlandı ve sayıldı. Üremeler log10 CFU/g doku olarak hesaplandı.

3.2.2. Dokuların histopatolojik de erlendirilmesi

Tüm doku örnekleri %10 formaldehit solüsyonu içinde tespit edildikten sonra histolojik doku takibine alındı. Parafin bloklama ve kesit sonrası hemotoksilen ve eosin (HE) boyama yöntemi ile boyandı ve doku bütünlü ündeki de i iklikler yönünden ı ık mikroskopu ile de erlendirildi.

3.2.2.1. *nsitu hücre ölümünün saptanması*

Daha önceden parafin bloklara gömülmü olan karaci er ve akci er doku örneklerinden 10 mikronluk seri kesitler alındı ve lizinli lamlar üzerine iki kesit tespit edildi. *n situ hücre ölümü*, “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling” (TUNEL) yöntemi ile ticari kit (Roche Diagnostics – Germany) kullanılarak ara tırıldı.

Deparafinizasyon: Lamlar gece boyu (12 saat) 55 derecelik etüvde durduktan sonra oda ısısında 60 dakika ksilen içerisinde bekletildi.

Rehidrasyon: Tüm lamlar birer kez sırası ile %100, %90, %80, %70’lik 5 dakikalık etanol inkübasyonlarına alındı. Etanol serisinden geçirilen lamlar son olarak distile suda 5 dakika bekletilerek rehidrasyon i lemi tamamlandı.

Dokuların geçirgenli inin artırılması: Lamlar %0,1’lik sodyum sitrat tampon çözeltisi içine kondu ve 400 watta mikrodalga fırında 5 dakika bırakıldı. Mikrodalga fırından çıkarılan lamlar PBS ile 5 dakika yıkandı. Lamların etrafı kurutma ka ıdı ile dokulara dokunulmadan kurutuldu.

aretleme solüsyonunun hazırlanması: aretleme solüsyonun 400 µl’si içine 50 µl enzim solüsyonu eklendi böylece 450 µl karı ım elde edildi. Bu karı ım pipetle homojenize edildi.

aretleme protokolünün uygulanması: Etrafı i aretlenmi olan lamlarda bulunan dokuların üzerine 50 µl hazırlanmı i aretleme karı ımı damlatıldı. Dokular 37 derecelik etüvde 60 dakika bekletildikten sonra PBS ile 5 dakika yıkandı ve etrafları kurulandı. aretlenmi dokuların üzerine 50 µl alkalen fosfataz konjugat eklendi. Lamlar 30 dakika 37 °C etüvde bekletildikten sonra PBS ile 5 dakika yıkandı ve dokuların etrafı kurulandı.

Substrat Solüsyonunun eklenmesi: Alkalen fosfataz enziminin substratından (BM purple AP substrate, Roche Diagnostic) 50 µl dokular üzerine eklendi. Lamlar kapalı nemli bir kutuda 12 saat bekletildi. Bekleme sonrasında 1 ık mikroskopunda apoptotik hücreler görüldü ünde lamlar PBS ile yıkandı ve kurulamadan 5 saniye eosinde bekletilip tekrar yıkandı. Son olarak dokular entelan ve lamel ile kapatıldı.

3.2.2.2 TUNEL pozitif hücre sayımı

TUNEL boyanımı olan lamlar 1 ık mikroskopu (Olympus) ile 20x okuler mercek ile uzman bir histolog tarafından kör olarak de erlendirildi. Gruplarda yer alan tüm ratların örnekleri i leme alındı, ancak gruplarda i lemler sonrasında doku bütünlü ü korunmu ve boyanma sonrası mikroskopta de erlendirmeye olanak tanıyan preparatlar de erlendirildi. Karaci er dokularında her preparatta alanlar HE boyanımı benzer alanlarla kar ıla tırıldı ve yakla ık her biri 250 hücre içeren her bir rat için 3 alan de erlendirilerek alandaki pozitif boyanımı hücreler sayıldı ve sonuçlar sham grubuna göre artı oranı olarak verildi. Akci er örneklerinde her preparat 3 alanda yer alan toplam benzer büyüklükteki alveollerdeki TUNEL pozitif alveolar epitel hücreleri sayılarak yapıldı. Alveol ba ına pozitif hücre belirlendi.

3.2.3. Kaspaz-3 Aktivitesinin Ara tırılması

3.2.3.1. Doku kaspaz 3 aktivitesi

Karaci er ve akci er doku kaspaz-3 aktivitesi mikroplate yöntemiyle ticari kolorimetrik aktivite ölçüm kiti (Chemicon International Temecula Co. USA) kullanılarak ara tırıldı (102). Testin prensibi, kaspaz-3 varlı ında substrat olarak kullanılan Ac-DEVD-p-NA'nın parçalanması ve aç ı a çıkan kromofor p-nitroanilin (pNA)'nin olu turdu u rengin 405 nm'de absorbansının ölçülerek pNA standartları ile birlikte de erlendirilmesi temeline dayanmaktadır.

Doku homojenizasyonu: Sıvı nitrojen ile dondurulmuş ve -20 °C’de saklanmış olan dokular tartıldı ve çözündürüldü. Tartılmış olan dokular lysis buffer (20 mM HEPES (pH 7.3), 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10 µM digitonin, 2 mM dithiothreitol) içinde doku homojenizatörü ile (1:10) homojenize edildi (168). Homojenize edilmiş olan dokular 13,000xg’de 15 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Supernatant kısmı kaspaz-3 ara tırması ve protein ölçümü için kullanıldı. Kaspaz aktivitesinin ara tırılmasında 10 µl supernatant kısmı kullanıldı (109). Kaspaz-3 aktivitesi 96 kuyucuklu mikropiplaklar kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda Tablo 2’de tanımlandı 1 ekilde çalışıldı.

Tablo 2. Kaspaz -3 çalışması protokolü

Örnek	5X ölçüm tamponu (µl)	Örnek (µl)	Deiyonize su (µl)	Substrat (µl)	Toplam volüm (µl)
Tampon körü	20	0	80	0	100
Substrat körü	20	0	70	10	100
Test örneği	20	10	60	10	100

Tüm örneklerin mikropiplak kuyucuklarına substrat eklenmeden önce background absorbansları 405 nm’de (Biotek- ELx808) ölçüldü. Daha sonra substrat eklendi ve mikropiplağın üzeri kapatıldı, tüm örnekler ve körler 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı süre sonunda 405 nm de absorbanslar yeniden okutuldu. Kit içinde bulunan pNA stok standartından 1X ölçüm tamponu ile seri dilüsyonlarla çalışması standartları hazırlandı. Hesaplamalardan önce üretici firmanın önerisi doğrultusunda örneklerden elde edilen absorbanslardan background absorbanslar ve tampon körünün absorbansları çıkarıldıktan sonra yeni absorbanslar elde edildi. Elde edilen son absorbans değerleri pNA standart sonuçlarına göre değerlendirildi. Sonuçlar µM-pNA/saat/mg protein olarak hesaplandı (109) ve sham grubuna göre artış oranları belirlendi. Çalışması kontrolü olarak bazı örnekler üretici firmanın önerileri doğrultusunda inhibitörlü (Ac-DEVD-CHO) ve inhibitörsüz olarak çift kuyucukta çalışıldı.

3.2.4. Serum ve doku Malondialdehit (MDA) ölçümü

Serum ve doku MDA varlığı, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorpsiyonunun ölçülmesi prensibine dayanan Ohkawa ve arkadaşlarının yöntemi uyarlanarak ölçüldü (117). MDA standartı için 1,1,3,3-tetrametoksipropan kullanıldı. Sonuçlar standartlardan elde edilen absorpsiyon değerlerine göre hesaplandı ve serum örnekleri için nmol/ml, doku örnekleri için nmol/g doku olarak verildi.

Kullanılan reaktifler

1. Sodyum dodesil sulfat (%8.1'lik)
2. Asetik asit (%20'lik (pH:3.5))
3. Tiyobarbitürik asit (%0.8'lik)
4. Butanol: piridin karışımı (15:1)
5. 0.15 N KCl

3.2.4.1. Serum MDA düzeylerinin araştırılması

MDA ölçümü için; 0.5 ml serum üzerine 0.2 ml %8.1 sodyum dodesil sülfat, 1.5 ml %20'lik asetik asit (pH; 3.5) ve 1.5 ml %0.8 tiyobarbitürik asit solüsyonu karıştırıldı ve daha sonra toplam volüm 4 ml olacak şekilde distile su eklendi. Bu reaksiyon karışımı 95 °C'de 60 dakika ısıtıldı. Soğuduktan sonra 1 ml distile su ve 5 ml butanol: piridin karışımı (15:1) eklenip karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakanın absorpsiyonu 532 nm'de ölçüldü. Serum MDA düzeyleri nmol/ml olarak hesaplandı.

3.2.4.2. Doku MDA düzeylerinin araştırılması

Daha önceden sıvı nitrojen ile dondurulmuş ve çalışmaya anına kadar -20 °C'de saklanmış olan dokular derin dondurucudan çıkarıldı, tartıldı ve çözündürüldü. Tartılmış olan dokular 1/10, 0.15 N KCl tamponu içinde homojenize edildi. 0.4 ml homojenat üzerine 0.2 ml %8.1 sodyum dodesil sülfat, 1.5 ml %20'lik asetik asit (pH; 3.5) ve 1.5

ml %0.8 tiyobarbitürik asit solüsyonu ve toplam volüm 4 ml olacak şekilde distile su eklenerek 95 °C'de 60 dakika ısıtıldı. Soğuduktan sonra 1 ml distile su ve 5 ml butanol: piridin karışımı (15:1) eklenip karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçüldü. Doku MDA düzeyleri nmol/g doku olarak hesaplandı.

3.2.5. Serum paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinin ölçümü

3.2.5.1. Serum paraoksonaz aktivitesinin ölçümü

Serum PON1 enziminin paraoksonaz aktivitesi, paraoksonun (O,O-diethyl-O-(4-nitrophenyl) phosphate) P-nitrofenole dönüşümünün 412 nm'de verdiği absorbansın 5 dakika süre ile izlenmesiyle ölçüldü (14).

ki mM paraokson ve 2 mM CaCl₂ içeren, 100 mM Tris-HCl (pH:8.0) ölçüm solüsyonunun içine toplam volüm 800 µl olacak şekilde 20 µl serum eklendi (14). Ölçümler 37 °C'de inkübasyonda 5 dakika süre ile absorbans değeri (Shimadzu UV-1601) izlenerek yapıldı (60).

Enzim aktivitesi hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı (22).

$$\text{Enzim Ünitesi (U/L)} = \frac{\Delta A/dk \times V_T \times 10^6}{\epsilon \times V_0 \times l}$$

$\Delta A/dk$: dakikalık absorbans değeri

V_T : Toplam ölçüm volümü

10^6 : Sonuçları µmol/dk/L= U/L çevirme katsayısı

ϵ : molar ekstinksiyon katsayısı

l : Işık yolu (1 cm)

V_0 : Örnek volümü

p-nitrofenol molar ekstinksiyon katsayısı ϵ_{412} : 18290 M⁻¹.cm⁻¹ olarak kullanılarak aktivite hesaplandı (14). Sonuçlar U/L olarak verildi.

3.2.5.2. Serum arilesteraz aktivitesinin ölçümü

PON1 enziminin aril esteraz aktivitesi, PON1 enziminin fenil asetatı parçalamasıyla oluşan fenolün 270 nm'de absorbansı ölçülerek saptandı (14).

100 µM fenil asetat ve 2 mM CaCl₂ içeren, 100 mM Tris-HCl (pH:8.0) ölçüm solüsyonu içine toplam volüm 3 ml olacak şekilde 10 µl serum eklendi ve 25 °C'de 3 dakika süre ile 270 nm'de absorbans değeri izlendi. Sonuçlar bir dakikada oluşan ürün miktarı olarak hesaplandı. Arilesteraz enzim aktivitesi hesaplanmasında yukarıda belirtilmiş olan enzim aktivitesi hesaplama formülü kullanıldı. Fenolün molar ekstinksiyon katsayısı ϵ_{270} : 1310 M⁻¹.cm⁻¹ olarak kullanılarak aktivite hesaplandı (14). Sonuçlar kU/L (kilo ünite/L) olarak verildi (98).

3.2.6. Doku paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinin ölçümü

Dokuların homojenizasyonu

Daha önceden sıvı nitrojen ile dondurulmuş ve çalışmaya anına kadar -20 °C'de saklanmış olan karaciğer ve akciğer dokuları derin dondurucudan çıkarıldı, tartıldı ve çözdürüldü. Bu dokular 1/10 oranında, 50 mM Tris-HCl ve 2mM CaCl₂ içeren tampon içinde homojenize edildi. Homojenize dokular 10,000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi ve supernatant kısmı aril esteraz, paraoksonaz ve protein ölçümü için ayrıldı. Enzim aktivitesi ölçümlerinden önce PON1 ölçümü ile interfere olan B tip esterazları inhibe etmek amacıyla yukarıda açıklandığı gibi hazırlanmış olan doku supernatantları 10 µM paraokson varlığında 15 dakika inkübe edildikten sonra çalışıldı (14).

3.2.6.1. Doku arilesteraz aktivitesi ölçümü

Doku süpernatantında fenil asetata karşı arilesteraz aktivitesi serumdakine benzer yöntemle ölçüldü (14).

Karaci er ve akci er arilesteraz aktivitesinin ölçümü

ki mM fenil asetat ve 2mM CaCl₂ içeren, 100 mM Tris-HCl (pH:8.0) ölçüm solüsyonu içine toplam volüm 3 ml olacak şekilde karaci er dokuları için 10 µl, akci er dokuları için 50 µl doku süpernatantı kullanıldı ve 25 °C'de 3 dakika süre ile 270 nm'de absorbans değeri izlendi (14).

Doku arilesteraz aktiviteleri, bir dakikada oluşan ürün miktarı olarak yukarıda belirtilmiş olan enzim aktivitesi hesaplama formülü kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar mU/mg protein olarak verildi.

3.2.6.2. Doku paraoksonaz aktivitesi ölçümü

Doku süpernatantlarından paraoksone karşı paraoksonaz aktiviteleri, daha önce tanımlanan yöntemde (14) spektrofotometrik okumaya uygun minör uyarlamalar yapılarak araştırıldı.

Karaci er ve akci er paraoksonaz aktivitesinin ölçümü

ki mM paraokson ve 2 mM CaCl₂ içeren, 100 mM Tris-HCl (pH:8.0) ölçüm solüsyonunun içine toplam volüm 800 µl olacak şekilde 25 µl doku süpernatantı eklendi (14). Karaci er dokuları için ölçümler 37 °C'de inkübasyonda 5 dakika süre ile, akci er dokuları için 37 °C'de 5 dakikalık aralıklarla 30 dakika süre ile 412 nm'de absorbans değeri izlenerek yapıldı (14).

Doku paraoksonaz aktiviteleri bir dakikada oluşan ürün miktarı olarak yukarıda belirtilmiş olan enzim aktivitesi hesaplama formülü kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar mU/mg protein olarak verildi.

3.2.7. Doku protein miktarının saptanması

Çalı malarda kullanılan örneklerin protein miktarları daha önceden tanımlanmış olan Lowry Yöntemi ile belirlendi. Protein standartları sı ır serum albümininden hazırlandı (100).

3.2.8. Di er biyokimyasal parametreler

Serumda alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve gama glutamil transferaz (GGT) enzim aktiviteleri ticari kitler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) kullanılarak Roche/Hitachi Modular sistemde ölçüldü (155).

3.3. istatistiksel Yöntemler

statistiksel kar ıla tırmalar için SPSS 10.5 bilgisayar programı kullanıldı. Ölçümsel sürekli de i kenlerin kar ıla tırılmasında grupların normal da ılıma uygunluk testi yapıldı; normal da ılıma uyanlarda one-way ANOVA (Post-hoc Bonferroni) uymayanlarda non parametrik testlerden Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi. Karaci er TUNEL pozitifli i için toplam alanda de erlendirilen hücre sayısı dikkate alındı. Analiz için ki-kare testi ve odds oranı (%95 güven aralı ı) kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalı maya alınan tüm ratlar haftalık a ırlık izlemi ile kilo de i imi yönünden izlendi. Grupların ortalama kilo de i imleri Tablo 3’de verilmiştir. Alkol verilen ve normal sıvı diyetle beslenen grupların her ikisinde de sham grubuna göre kilo artışı çok yavaş veya azalma ekinde gözlemlendi.

Çalı maya alınan ratlardan ESK grubundaki bir ve ESP grubundaki bir rat intratrakeal uygulamadan hemen sonra öldü. Tüm ratlar intratrakeal uygulamadan sonra genel durumları yönünden izlendi. intratrakeal *P.aeruginosa* PAO1 uygulamasından sonra ESP grubundaki iki rat 20. saatte ve NSP grubundaki bir rat 21. saatte öldü.

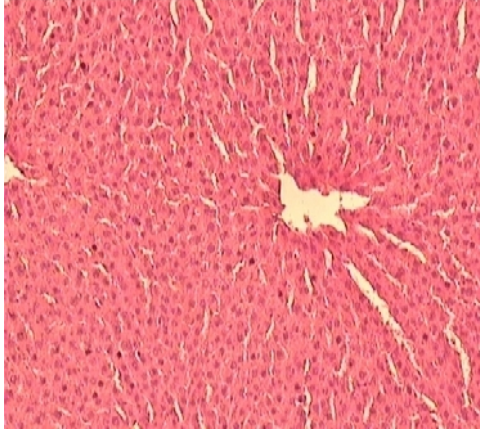
Tablo 3. Çalı maya gruplarının 6 hafta sonundaki a ırlık (gram) de i imi

Gruplar	Ba langıç a ırlık (Ortalama \pm SS)	6 hafta sonundaki a ırlık (Ortalama \pm SS)
Sham (n=6)	286,3 \pm 39,2	310,1 \pm 45,4
NSK (n=8)	226,1 \pm 54,3	210,6 \pm 36,8
NSP (n=7)	180,1 \pm 32,2	170,1 \pm 18,3
ESK (n=7)	213,5 \pm 46,9	174,1 \pm 22,5
ESP (n=5)	243,6 \pm 55,6	206,8 \pm 49,6

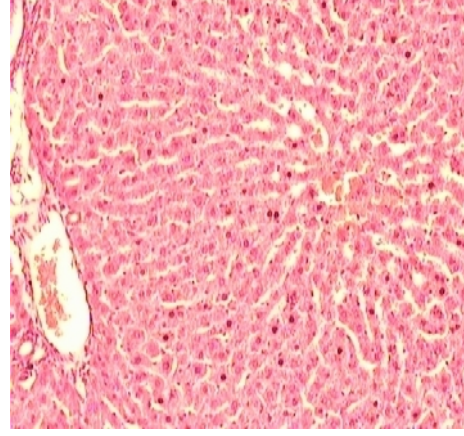
4.1.Karaci er Dokularındaki Histolojik De i iklikler

Karaci er dokuları, hücresel bütünlü ün bozulup bozulmadığı, hücresel dejenerasyon, nekroz varlığı ve karaci er yağlanması olup olmadığı yönünden histolojik olarak değerlendirildi. Sham grubu ve kontrol grubundaki ratların karaci erleri histolojik olarak normal görünümde değerlendirildi. Etanol eklenmiş sıvı diyet ile beslenen gruplardaki ratların karaci erlerinde sham grubuna ve kontrol grubuna göre yoğun karaci er yağlanması ve ileri hepatik dejenerasyondan, hafif yağlanma ve

minimal hepatik dejenerasyona de i en oranlarda histopatolojik de i imler gözlendi. HE boyanmı karaci er doku örneklerindeki de i imler ekil 6-11'de gösterilmi tir.

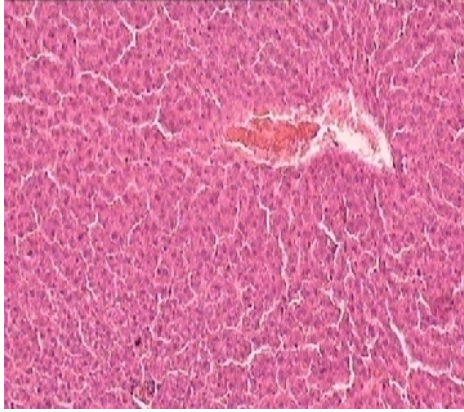


A

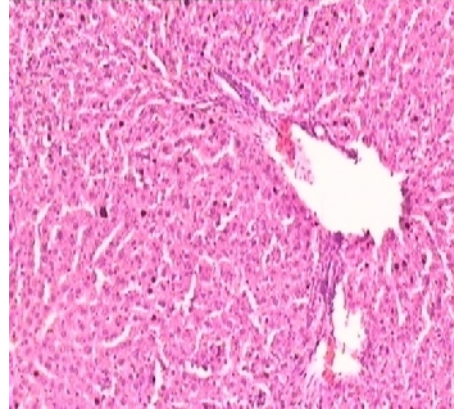


B

ekil 6. Sham grubu rat karaci erleri (HE x100). Sham grubu rat karaci erleri normal görünümde izlenmi tir (A ve B).

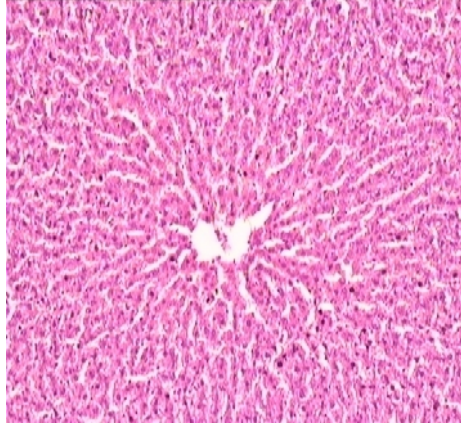


A

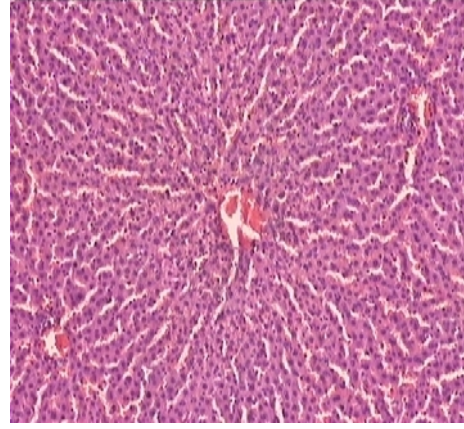


B

ekil 7. Normal sıvı diyet ile beslenen rat (NSK) karaci erleri (HE x100)

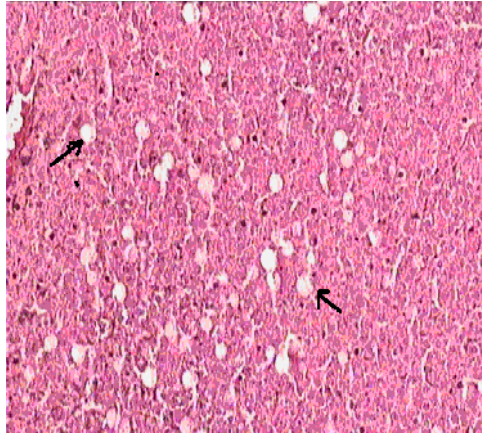


A

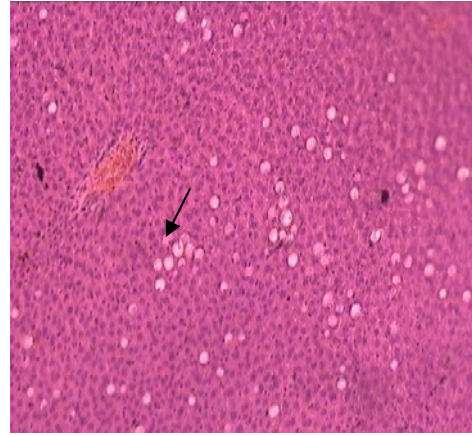


B

ekil 8. Normal sıvı diyet ile beslenen ve pnömoni olu turulan grup (NSP) karaci eri (HE x100). NSK ve NSP gruplarında normal morfolojide karaci er izlendi (A ve B).

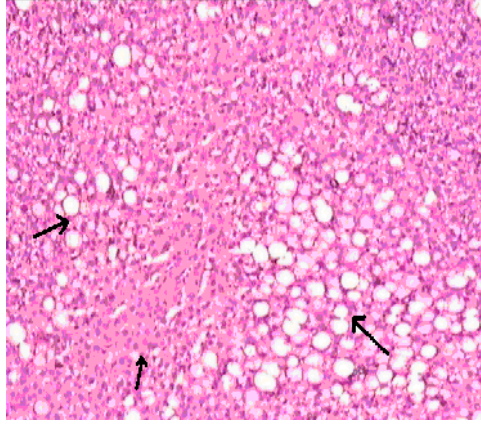


A

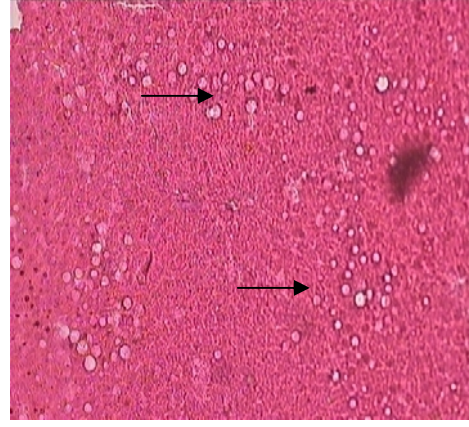


B

ekil 9. Etanollü diyet ile beslenen kontrol rat (ESK) karaci erleri (HE x100). Karaci er ya lanma alanları ve hepatositlerde dejenerasyon izlenmektedir(A ve B).

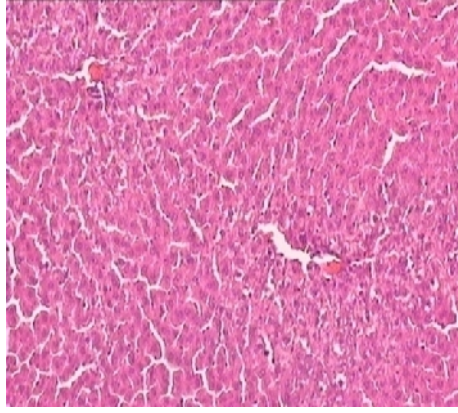


A

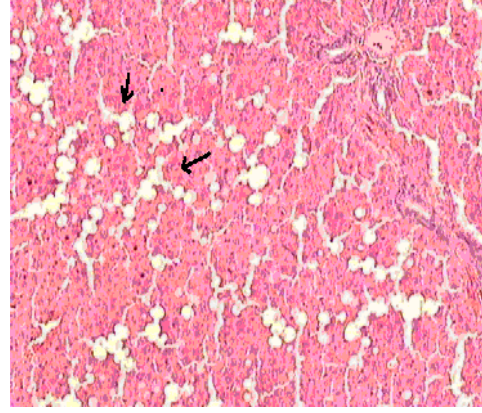


B

ekil 10. Etanollü diyet ile beslenen ve pnömoni olu turulan (ESP) rat karaci erleri (HEx100). Hepatositlerde dejenerasyon ve karaci er ya lanma alanları izlenmektedir (A ve B).



A: NSP



B: ESP

ekil 11. Kar ıla tırmalı olarak pnömoni olu turulmu grupların karaci eri (HE x100)

4.2. Serum ALT ve LDH Aktivitesi

Çalı maya alınan gruplarda serum ALT ve LDH aktiviteleri Tablo 4’de verilmi tir. Alkol ve normal izokalorik sıvı diyet verilen her iki gruptaki ratlarda sham grubuna göre ALT aktivitesi yükselmi bulundu ancak normal sıvı diyet verilen gruptaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmaz iken, alkol verilen gruplardaki fark anlamlı idi ($p<0,05$). LDH aktivitesi kar ıla tırıldı nda alkol verilen gruplardaki LDH aktivitesi hem sham hem de normal sıvı diyet verilen gruba göre daha dü ük olmakla birlikte, aradaki fark anlamlı de ildi ($p>0.05$).

Tablo 4. Serum ALT ve LDH aktivitesi

Grup	ALT (U/L)			LDH (U/L)		
	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)
Sham (n=6)	38,3±2,8	38,5	34-42	1158±184	1204	825-1347
NSK (n=8)	48,3±6,7	49,5	37-59	1030±358	974	369-1508
NSP (n=7)	47,5±6,2	46,0	38-55	926±343	1086	484-1289
ESK (n=7)	60,7±8,2*	59,0	54-77	824±187	829	545-1083
ESP (n=5)	64,0±7,1*	62,0	56-72	791±187	694	608-1031

*: p<0.05 Sham, NSK, NSP gruplarına kar ı

4.3. Pnömoni Olu turulan Gruplardaki Bakteriyel Üreme

P. aeruginosa PAO1 ile olu turulan pnömoni modelinde alkol alan ratların klinik tablosunun alkol almayan gruba göre daha kötü seyretti i NSP grubunda 21. saatte bir rat öürken, alkol alan ve pnömoni olu turulan gruptaki iki ratın 20. saatte öldü ü gözlemlendi.

Akci er enfeksiyonu yönünden gruplar de erlendirildi inde her iki grupta da 10^3 CFU/g dokunun üzerinde bakteri üremesi ve histolojik olarak enfeksiyon bulguları saptandı. ESP ve NSP grubunda sa akci erde üreyen bakteri miktarı benzer iken sol akci erde alkol verilen gruptaki üremenin daha fazla oldu u ve farkın da istatistiksel olarak anlamlı oldu u saptandı (p<0.05) (Tablo 5). Sa ve sol akci erde üreyen bakteri miktarları birlikte de erlendirildi inde ESP grubundaki üreme NSP grubundan fazlaydı (p<0.05).

Tablo 5. Akci er dokusunda üreyen bakteri miktarı

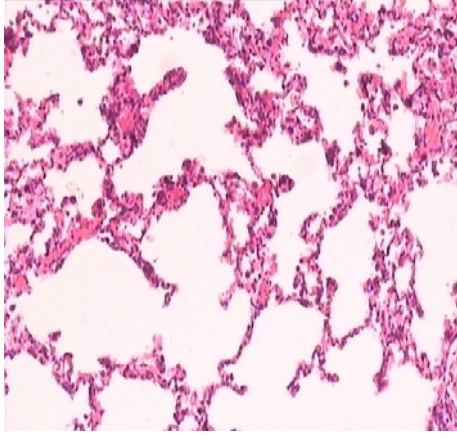
Grup	Sa akci er Log10 CFU/g doku		Sol Akci er Log10 CFU/g doku		Akci erde üreyen bakteri miktarı (total) Log10 CFU/g doku	
	Ortalama±SS	Ortanca (Minimum- Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca (Minimum- Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca (Minimum- Maksimum)
Sham (n=6)	-	-	-	-	-	-
NSK (n=8)	-	-	-	-	-	-
NSP (n=7)	4,57±0,58	4,34 (3,88-5,51)	4,43±0,39	4,33 (4,06-4,98)	4,50±0,29	4,5 (3,98-4,86)
ESK (n=7)	-	-	-	-	-	-
ESP (n=5)	4,94±0,91	4,70 (4,09-5,91)	5,41±0,57*	5,39 (4,49-5,93)	5,17±0,56*	5,02 (4,60-5,89)

*: P< 0.05 NSP grubuna karşı, -: üreme saptanmadı

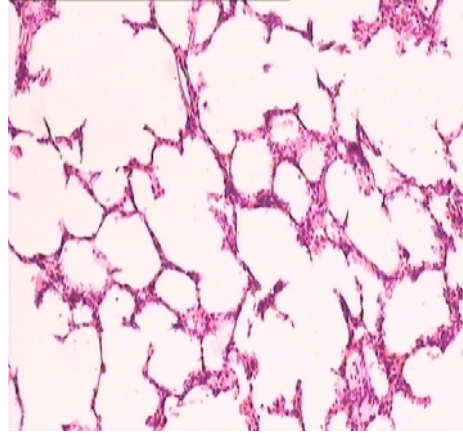
4.4. Akci er Dokularındaki Histolojik De i iklilikler

Bron ial ve parankimal akci er dokuları, hücre (nötrofil ve mononükleer) infiltrasyonu fibrin birikimi ve kanama yönünden histolojik olarak de erlendirildi.

Grupların akci er doku histolojik de i iklilikleri ekil 12-16'da gösterilmiştir.



A

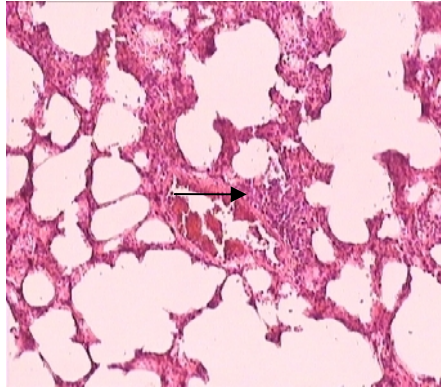


B

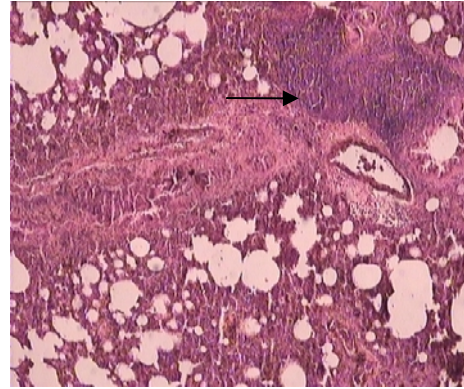
ekil 12. Sham grubu(A) ve NSK(B) rat akci eri (HE x100).

Sham ve NSK gruplarında normal morfolojide akci er dokusu izlenmi tir.

NSP ve ESK gruplarına ait akci er doku görüntüleri ekil 13 ve 14’de verilmi tir.

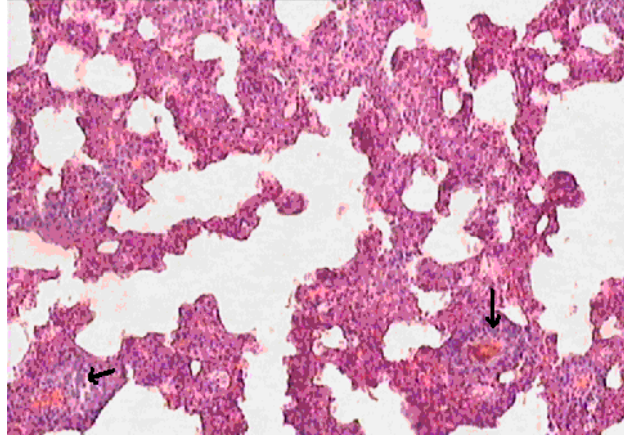


A



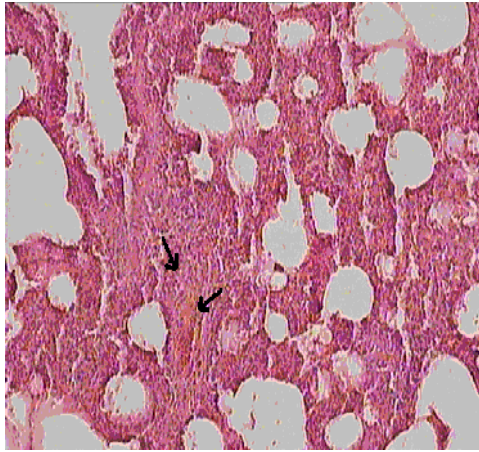
B

ekil 13. NSP rat akci eri (HE x100). A ve B: Parankimal dokuda de i en oranlarda artmı nötrofil ve mononuklear hücre infiltrasyonu izlenmektedir.

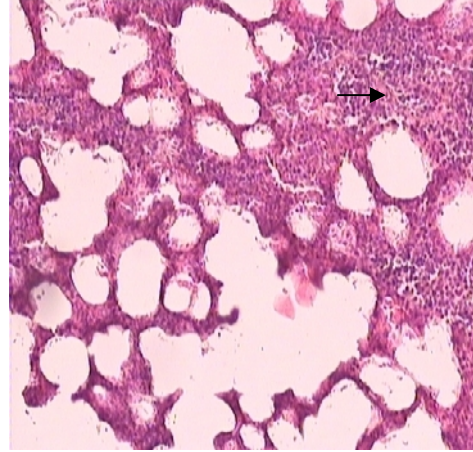


ekil 14. Etanolü diyetle beslenen ESK grubu akci eri (HEx100). Parankimal dokuda mononuklear hücre infiltrasyonu izlenmektedir.

ESP grubunda artımı nötrofil ve mononuklear hücre infiltrasyonu izlendi. Ayrıca ESP grubunda bron la ili kili lenfoid doku (BALT) artımı olarak izlendi (ekil 16).



A

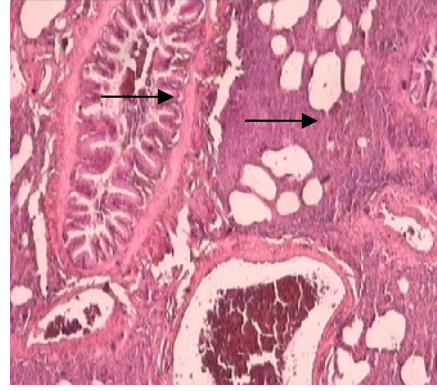


B

ekil 15. Etanolü diyet verilen ve pnömoni olu turlan rat (ESP) akci erleri (HEx100). A ve B 'de parankimal dokuda artımı nötrofil ve mononuklear hücre infiltrasyonu izlenmektedir.



A

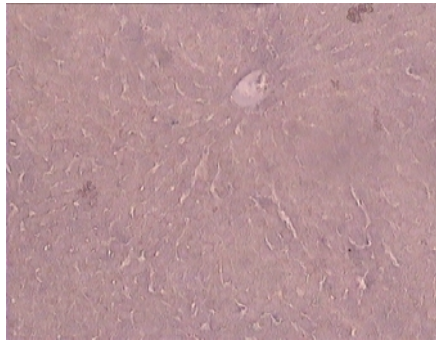


B

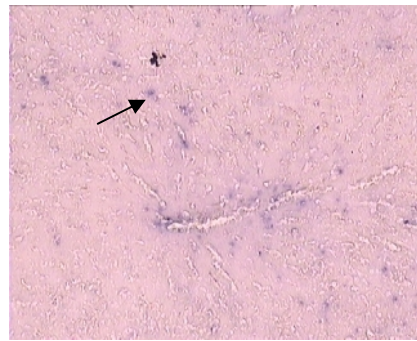
ekil 16. ESP grubu akci erleri (HEx100). A: Bron la ili kili lenfoid doku (BALT) ve bron i i hücre infiltrasyonu. B: Bron i i hücre infiltrasyonu ve kanama izlenmektedir.

4.5. TUNEL Yöntemi ile Dokulardaki Apoptotik De i iklikler

Tüm gruplardaki karaci er ve akci er dokusundaki apoptotik de i imler, TUNEL boyama yöntemi ile saptandı. Gruplardaki TUNEL pozitif hücre varlı ı ekil 17-24'de gösterilmi tir.



A: Sham



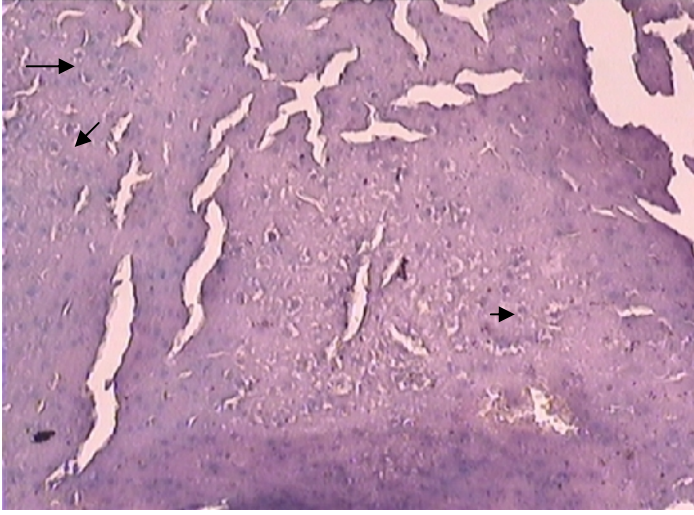
B: NSK

ekil 17. TUNEL boyanmı sham ve NSK grubu karaci erleri (x100)

Sham grubu karaci er dokularında nadir alanlarda TUNEL pozitif boyanmı apoptotik hücre varlı ı izlenmi tir.

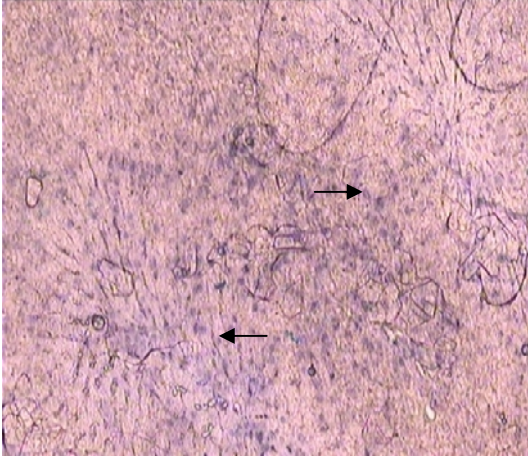
NSK grubunda sham grubundan daha fazla ancak NSP, ESK ve ESP gruplarından daha az oranda TUNEL pozitif boyanmış apoptotik hücre varlığı izlenmiştir.

TUNEL pozitif boyanmış NSP grubuna ait doku görüntüsü ekil 18’de verilmiştir.

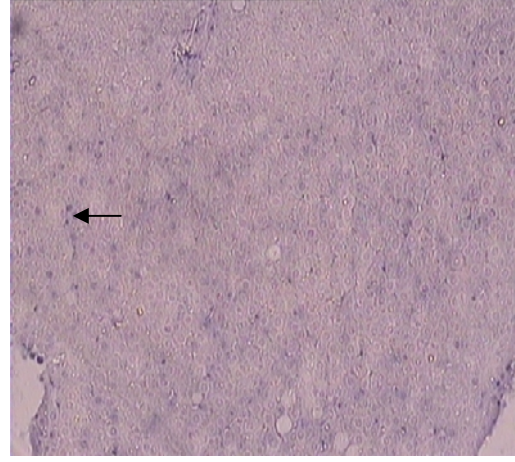


ekil 18. TUNEL boyanmış NSP karaciğeri (x100).

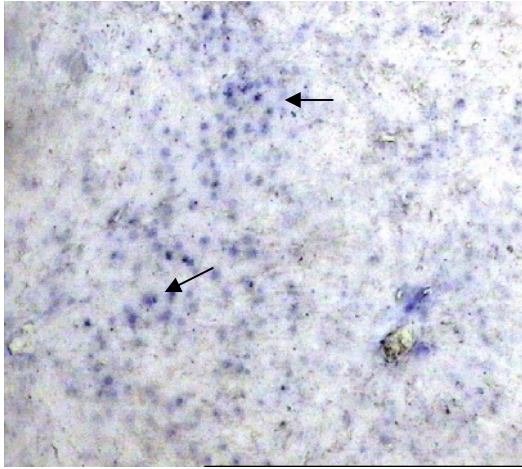
ESK ve ESP gruplarına ait TUNEL pozitif boyanmış karaciğer doku görüntüleri ekil 19 ve 20’de yer almaktadır.



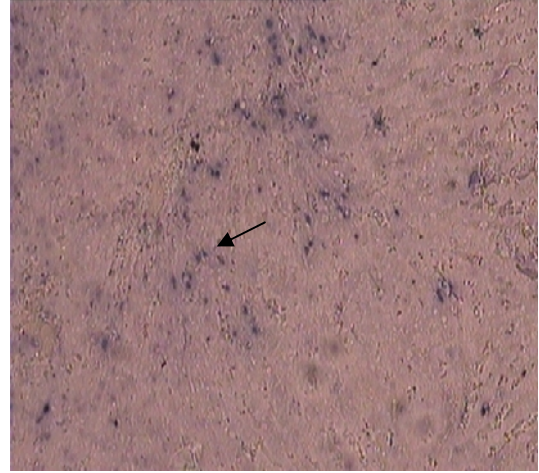
A



B

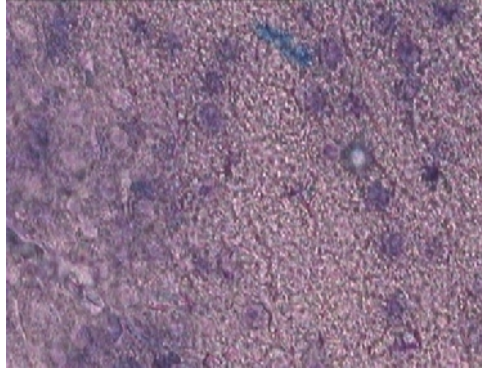


C

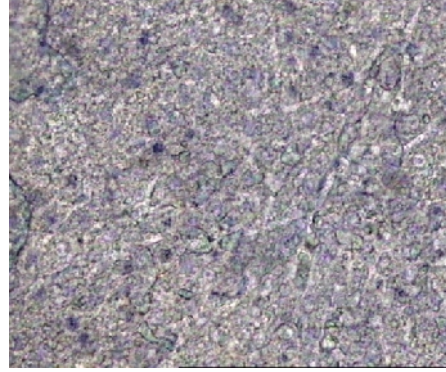


D

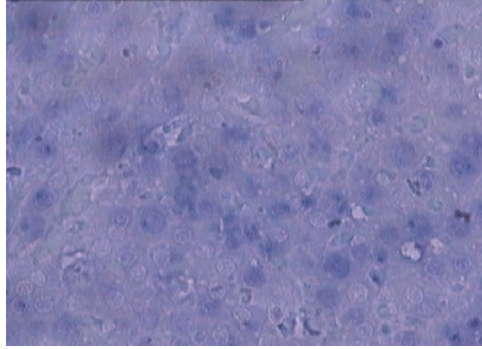
ekil 19. TUNEL boyanımı ESK ve ESP gruplarının karaciğerleri (x100). (A ve B: ESK, C ve D: ESP. Ok ile gösterilen bölgeler, TUNEL pozitif hücreler).



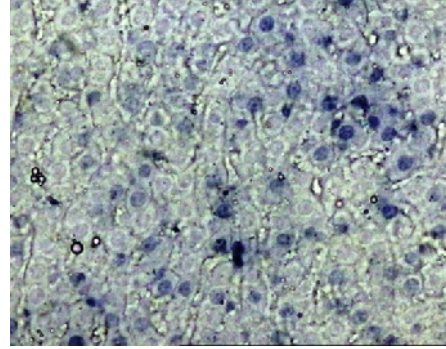
A₁: ESK



A₂: ESK



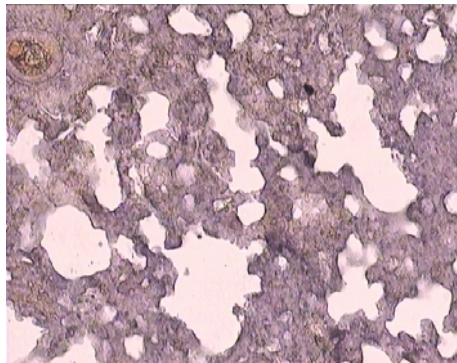
B₁: ESP



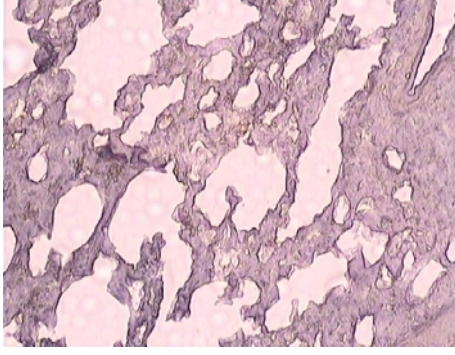
B₂: ESP

ekil 20. TUNEL boyanımı ESK ve ESP gruplarının karaci eri (x200). Alanda TUNEL pozitif boyanımı ve TUNEL negatif hücreler izlenmektedir.

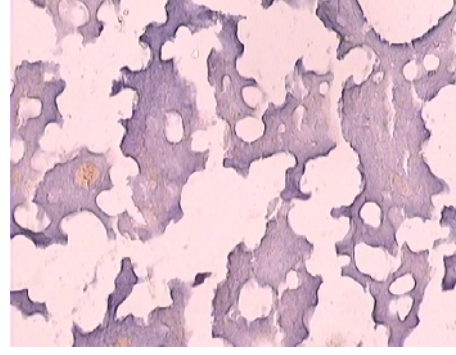
TUNEL boyanımı akci er doku örnekleri ekil 21-23'de gösterilmi tir



ekil 21. TUNEL boyanımı sham akci eri (x100).

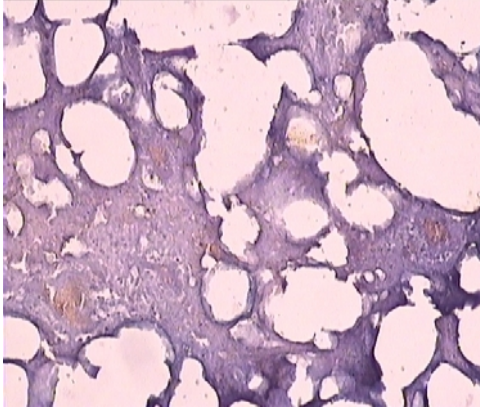


A: NSK

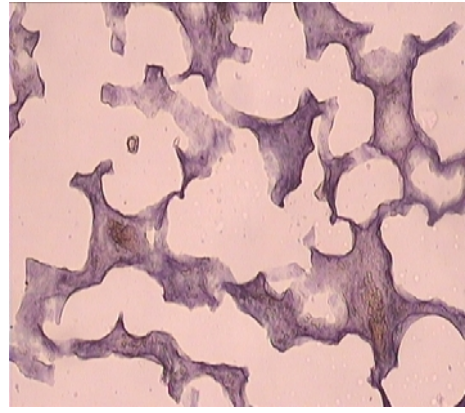


B: NSP

ekil 22. TUNEL boyanımı NSK ve NSP gruplarının akci erleri (x100).

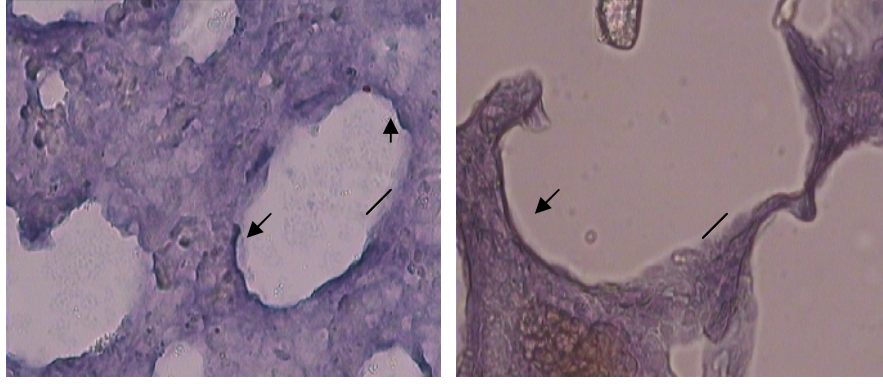


A: ESK



B: ESP

ekil 23. TUNEL boyanımı ESK ve ESP gruplarının akci erleri (x100).



A: NSP

B: ESP

ekil 24. NSP ve ESP grubu TUNEL boyanmış alveol hücresi (x400). → ile gösterilen bölge TUNEL pozitif alveol epitel hücresi, / ile gösterilen bölge negatif boyanmış alveol epitel hücresi.

Apoptotik de i imler, apoptotik hücre sayılarak belirlendi. TUNEL boyamalar incelendi inde tüm gruplarda de i en oranlarda olmakla birlikte karaci er dokularında TUNEL pozitif hücre varlığı izlenmiştir.

Grupların karaci er TUNEL pozitif hücre varlığı Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Karaci er TUNEL pozitif hücre varlığına göre grupların karşılaştırılması.

(n: değerlendirilmiş hücre sayısı)

Grup	TUNEL pozitif hücre sayısı (%)	Odds Oranı (%95 GA: alt sınır- üst sınır)
Sham (n=2250)	139 (6,1)	referans
NSK (n=2250)	242 (10,7)	1,83 (1,47-2,27)
NSP (n=3000)	874 (29,1)	6,24 (5,17-7,54)
ESK (n=4500)	1054 (23,4)	4,65 (3,86-5,59)
ESP (n=3000)	1014 (33,8)	7,75 (6,43-9,35)

Karaci erde apoptotik hücre varlığı incelendiğinde tüm gruplarda sham grubuna göre daha fazla oranda TUNEL pozitif hücre varlığı izlenmiştir. NSK grubunda sham grubuna göre 1,83, ESK grubunda 4,65, NSP grubunda 6,24, ESP grubunda 7,75 kez daha fazla TUNEL pozitif hücre izlenmiştir ve enfeksiyon varlığının karaci erde apoptozu hem NSP hem de ESP grubunda artırdığı saptanmıştır. Alkol ve enfeksiyon varlığında apoptoza giden hücrenin daha fazla arttığı bulunmuştur ($p<0.01$).

Akci er dokuları TUNEL pozitif hücre varlığı yönünden karşılaştırıldığında çalışılan gruplarındaki pozitif hücre varlığı benzer bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7. Akci er alveolar TUNEL pozitif hücre sayısı (n: değerlendirilen alveol sayısı)

Grup	alveol başına ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı (Sağ)	Artı	alveol başına ortalama TUNEL pozitif hücre sayısı (Sol)	Artı
Sham (n=34)	2,2	referans	2,5	referans
NSK (n=41)	2,7	1,22	2,2	0,88
NSP (n=56)	2,7	1,22	2,7	1,08
ESK (n=29)	3,1	1,40	2,0	0,82
ESP (n=41)	2,8	1,2	2,7	1,08

4.6. Kaspaz-3 Aktivitesi Sonuçları

Karaci er kaspaz-3 aktiviteleri ve kaspaz aktivitelerinin sham grubuna göre arttığı Tablo 8’de verilmiştir. Karaci er kaspaz aktiviteleri karşılaştırıldığında ortalama olarak tüm gruplarda özellikle pnömoni oluşturulan gruplarda sham grubuna göre kısmen daha yüksek aktivite saptanmıştır ancak gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 8. Karaci er kaspaz-3 aktivitesi

Grup	Karaci er kaspaz-3 aktivitesi ($\mu\text{M-pNA/saat/mg protein}$)			Sham grubuna göre artı (ortanca)
	Ortalama \pm SS	Ortanca	(Minumum-Maksimum)	
Sham (n=6)	26,3 \pm 18,6	28,1	2,2-46,6	referans
NSK (n=8)	32,0 \pm 17,6	33,7	9,8-61,3	1,19
NSP (n=7)	42,1 \pm 27,9	36,9	6,5-80,6	1,31
ESK (n=7)	38,1 \pm 29,4	36,0	9,2-83,6	1,28
ESP (n=5)	47,0 \pm 37,1	31,9	15,5-110,3	1,13

Sa ve sol akci er kaspaz aktiviteleri Tablo 9’da verilmi tir. Sham grubuna göre di er grupların akci er kaspaz-3 aktivite oranlarına bakıldı ında enfeksiyon olu turulan NSP ve ESP gruplarında hem sa akci erde hem de sol akci erde daha dü ük bir aktivite saptanmı tir. Akci er kaspaz aktiviteleri yönünden gruplar arasında fark saptanmamı tir ($p>0.05$).

Tablo 9. Sa ve sol akci er kaspaz-3 aktiviteleri

Grup	Sa Akci er Kaspaz-3 ($\mu\text{M-pNA/saat/mg protein}$)			Sol Akci er Kaspaz-3 ($\mu\text{M-pNA/saat/mg protein}$)		
	Ortalama \pm SS	Ortanca (Minumum-Maksimum)	Sham grubuna göre oran (ortanca)	Ortalama \pm SS	Ortanca (Minumum-Maksimum)	Sham grubuna göre artı (ortanca)
Sham (n=6)	18,1 \pm 7,5	18,5 (8,8-25,5)	referans	17,9 \pm 11,2	16,3 (3,8-32,8)	referans
NSK (n=8)	17,0 \pm 7,4	16,1 (4,6-27,4)	0,8	24,4 \pm 15,6	15,0 (14,0-56,6)	0,9
NSP (n=7)	22,0 \pm 21,3	12,9 (3,3-60,8)	0,7	14,2 \pm 8,7	11,2 (4,5-28,9)	0,7
ESK (n=7)	20,7 \pm 17,2	12,0 (4,2-47,5)	0,6	21,4 \pm 19,8	20,4 (3,9-60,6)	1,2
ESP (n=5)	13,1 \pm 8,8	9,4 (5,8-28,8)	0,5	11,4 \pm 4,6	12,8 (5,3-17,4)	0,7

4.7. MDA Sonuçları

Grupların karaciğer ve serum MDA düzeyleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Karaciğer ve Serum MDA düzeyleri

Grup	KC MDA (nmol/g doku)			Serum MDA (nmol/ml)		
	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)
Sham (n=6)	30,7±3,6	30,9	24,8-35,0	1,92±0,63	1,91	1,22-2,64
NSK (n=8)	47,5±14,1	42,9	32,5-77,6	2,26±0,97	1,98	1,30-4,01
NSP (n=7)	44,7±8,3	42,2	35,2-55,6	1,75±0,51	1,65	1,27-2,82
ESK (n=7)	71,9±16,8	79,2	53,2-92,7	1,75±0,44	1,58	1,27-2,54
ESP (n=5)	132,4±74,7*	118,6	43,6-209	1,63±0,71	1,18	1,18-2,79

*: p<0.05 Sham, NSK ve NSP, ESK grubuna karşı

Çalışma gruplarında sham grubuna göre karaciğer MDA düzeyi daha yüksekti. NSK ve NSP gruplarında MDA düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. ESK ve ESP gruplarındaki MDA düzeyleri karşılaştırıldığında ESK grubundaki artış NSK ve NSP grubundan daha yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değilken, ESP grubunda MDA düzeylerinin diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptandı (p<0.05).

Alkol verilen ve P. aeruginosa pnömonisi oluşturulan ESP grubundaki MDA artışı ESK grubuna göre daha fazla olduğu görüldü (p<0.05). Serum MDA düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında fark gözlenmedi (p>0.05).

Akciğer MDA düzeyleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Sağ ve sol akciğer MDA düzeyleri

Grup	Sağ Akciğer MDA (nmol/g doku)			Sol Akciğer MDA (nmol/g doku)		
	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)
Sham (n=6)	42,2±3,0	41,8	38,8-45,8	37,6±6,5	36,3	30,5-46,0
NSK (n=8)	41,7±8,5	38,5	33,1-58,2	48,6±14,6	43,2	32,8-79,2
NSP (n=7)	47,7±8,7	44,6	40,5-64,8	52,5±21,8	42,2	31,7-91,3
ESK (n=7)	51,0±9,1	52,6	34,3-60,0	45,7±8,1	45,8	32,7-58,7
ESP (n=5)	44,2±6,5	44,9	36,4-51,9	53,5±3,4	52,3	50,0-58,7

Akciğer dokusundaki MDA düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında fark olmadığı, sol akciğerde ESP ve NSP gruplarında sham grubuna ve diğer gruplara göre MDA düzeyinin ılımlı bir artış gösterdiği ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). ESP ve NSP grupları MDA düzeyleri yönünden karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

4.8. PON ve AE Aktivite Sonuçları

Serum PON ve AE aktiviteleri Tablo 12’de verilmiştir. Serum PON ve AE aktivitesi yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Serum PON ve AE aktivitesi NSK ve ESK gruplarında sham grubuna benzer olarak saptandı.

Akciğer enfeksiyonu oluşturulan hem ESP hem de NSP gruplarında sham ve NSK ve ESK gruplarına göre PON ve AE aktivitesi daha düşük olarak saptanmış fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da bu bulgu önemli olarak değerlendirilmiştir.

Karaciğer PON ve AE aktivitesi gruplarda değerlendirildiğinde gruplar arasında fark olmadığı saptandı ($p>0.05$) (Tablo 13).

Tablo12. Serum PON ve AE aktiviteri

Grup	Serum PON Aktiviteri (U/L)			Serum AE Aktiviteri (kU/L)		
	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)
Sham (n=6)	83,0±76,0	72,0	13-176	49,0±24,3	53,0	19-75
NSK (n=8)	88,3±49,2	76,5	17-178	64,7±38,8	70,5	11-119
NSP (n=7)	58,2±50,8	34,0	9-122	63,7±46,9	38,0	17-118
ESK (n=7)	88,0±56,9	75,0	17-191	48,4±34,7	39,0	17-110
ESP (n=5)	51,2±43,3	43,0	9-104	52,4±45,2	26,0	13-107

Tablo 13. Karaci er PON ve AE aktiviteri

Grup	Karaci er PON Aktiviteri (mU/mg prot)			Karaci er AE Aktiviteri (mU/mg prot)		
	Ortalama±S	Ortanca	(Minimum-Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)
Sham (n=6)	14,0±5,8	13,8	8-24	5809±3097	4431	3190-10527
NSK (n=8)	16,5±5,9	15,8	8-25	6903±3594	6638	2339-13494
NSP (n=7)	11,7±7,4	9,4	5-23	6985±4271	7098	1912-13364
ESK (n=7)	15,5±7,1	13,4	6-27	8763±4441	8038	4363-16054
ESP (n=5)	16,3±7,2	13,9	10-29	5783±4124	4899	2216-12741

Akci er PON ve AE aktiviteri Tablo 14 ve Tablo 15’de gösterilmi tir.

Sa akci er PON ve AE aktivitesi yönünden gruplar arasında fark saptanmadı (p>0.05).

Tablo 14. Sağ akciğer PON ve AE aktiviteleri

Grup	Sağ Akciğer PON Aktiviteleri (mU/mg prot)			Sağ Akciğer AE Aktiviteleri (mU/mg prot)		
	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)
Sham (n=6)	1,364±0,644	1,657	0,487-1,963	310,3±161,5	247,0	195-619
NSK (n=8)	0,922±0,464	0,785	0,460-1,677	476,1±224,7	413,5	183-867
NSP (n=7)	0,765±0,520	0,493	0,325-1,744	108,0±97,7	69,0	16-268
ESK (n=7)	0,908±0,566	0,727	0,424-2,005	344,8±193,8	277,0	134-714
ESP (n=5)	0,836±0,546	0,942	0,197-1,604	234,6±105,2	246,0	121-377

Tablo 15. Sol akciğer PON ve AE aktiviteleri

Grup	Sol Akciğer PON Aktiviteleri (mU/mg prot)			Sol Akciğer AE Aktiviteleri (mU/mg prot)		
	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)	Ortalama±SS	Ortanca	(Minimum-Maksimum)
Sham (n=6)	1,618±1,020	1,435	0,691-3,489	882,3±275,3	836,5	605-1384
NSK (n=8)	2,010±1,096	1,624	0,746-3,603	662,0±313,7	751,0	266-1053
NSP (n=7)	2,075±0,971	1,441	1,115-3,453	479,7±235,1	452,0	115-852
ESK (n=7)	2,104±1,036	1,994	0,753-4,143	718,8±452,7	692,0	291-1643
ESP (n=5)	2,573±2,838	2,071	0,230-7,458	792,2±859,0	554,0	77-2283

Sol akciğer PON aktivitesi yönünden gruplar arasında fark saptanmadı ($p>0.05$). Grupların AE aktiviteleri incelendiğinde tüm gruplarda AE aktivitesinin sham grubuna göre daha düşük olduğu ancak farkın anlamlı olmadığı bulundu. ($p>0.05$)

5. TARTI MA

Alkol alımı birçok geli mi ÷lkede sosyal bir problemdir. Hafif dozda alkol alımından ba ımlılık düzeyine ula an yüksek doz alkol tüketimi tüm dünyada yaygındır. Hafif ve orta düzeyde alkol alımının bazı sistemler üzerine yararlı etkileri oldu u, ancak kronik ve uzun süreli, yüksek doz alkol alımının zararlı etkileri oldu u bilinmektedir. Kronik alkol kullanımı sırasında çe itli beslenme problemleri ortaya çıkmaktadır. Metabolizma üzerine çok yönlü etkileri nedeniyle alkol kullanımının çe itli sistemlere etkisini incelemek ilgi çekici olmu tur (91, 162). Deney hayvanlarında alkol alımı için çe itli modeller geli tirilmi tir Geli tirilmi olan bu modellerin her birinin di erine üstünlükleri ve dezavantajlı yönleri oldu u belirtilmektedir (91,133,134). Bu çalı mada daha önce tanımlanmı olan sıvı diyet modeli uygulandı (91). Alkol verilen ve normal sıvı diyetle beslenen grupların her ikisinde de sham grubuna göre kilo kayıpları vardı. Normal sıvı diyetle beslenen ve etanollü sıvı diyetle beslenen gruplarda sıvı diyetin kalori hesabı yapıldı ve literatürde önerildi i ekilde düzenlendi (91). İlk iki hafta ratların katı diyetten bu yeni diyete uyumu nedeniyle daha az beslendikleri gözlemlendi. Normal sıvı diyetle beslenen gruplardaki kısmi kilo kaybının ilk iki hafta kilo vermelerinden ve daha sonra da katı diyete göre daha az sıvı diyet tüketmelerinden kaynaklandı ı dü ünüldü. Alkol eklenmi sıvı diyetle beslenen ratlarda da benzer ekilde, ilk iki hafta diyete uyum nedeniyle kilo kaybının oldu u; daha sonra devam eden kilo kaybının nedeninin hem sıvı diyet olması hem de alkole ba lı beslenme bozuklu u oldu u dü ünüldü. Yapılan çe itli çalı malarda alkol ve sıvı diyetle beslenen ratlarda kontrol katı diyetle beslenen ratlara göre belirgin olarak daha az kilo artı ı oldu u veya kilo kaybı oldu u bulunmu tur (28,53,123,137). Yapılan bir çalı mada günlük kalorinin %36'sı alkolden sa lanarak sıvı diyetle beslenmi olan ratlarda ilk 30 gün kontrol grubuna göre kilo artı ının %75 daha az oldu u otuzuncu günden sonra diyetten alkolün çıkarılması ile birlikte kilo artı ının ba ladı ı saptanmı tır (137). Piano ve ark., çalı malarında etanol verilen ratlarda onuncu günden sonra kilo kaybı saptadıklarını ve bu durumun su almamadan kaynaklansa da temel olarak total kalori alımının azalması ve etanole metabolik adaptasyondan kaynaklanmı oldu unu belirtmi lerdir (123). Hayvan modellerinde sıvı diyetin kullanılmasının karaci erde beslenme bozuklu una ba lı bazı olumsuz etkileri oldu u karaci erde gözlemlenen bazı

histolojik de i ikliklerden bu durumun sorumlu olabilece i belirtilmektedir (126,133,134). Ancak bu çalı mada normal sıvı diyetle beslenen bazı ratlarda kilo kaybı gözlenirse de bu grupta minimal histolojik de i iklikler dı nda karaci er ya lanması ve dejenerasyon gibi bulgular izlenmemi tir.

Kronik alkol alımı çe itli sistemler üzerinde gösterdi i etkiler nedeniyle yüksek mortalite ve morbidite nedenidir. Alkol temel olarak karaci erde okside edilir. Bu nedenle karaci er, çe itli i levsel ve dönü ümsüz de i ikliklere duyarlıdır. Alkol metabolizması sırasında hem ADH, hem de ALDH enzimleri, NAD⁺'nin NADH'a indirgenmesini gerektirir (23,70,94). Artımı NADH ya lı karaci er, hiperlipemi, hipoglisemi, kollajende artı a ba lı doku skarı (fibrosis) gibi metabolik bozukluklara neden olur (93,95).

Bu çalı mada alkolün karaci er üzerine etkileri histopatolojik ve biyokimyasal parametreler ara tırılarak incelendi. NSK ve NSP gruplarında normale yakın histolojide karaci er morfolojisi izlenirken alkol verilen ESK ve ESP gruplarında, tüm ratlarda de i en oranlarda hepatik dejenerasyon ve karaci er ya lanması izlenmi tir.

Karaci er hücre bütünlü ünün bozulması ve parankim hücrelerinin dejenerasyonu karaci erde yo un olarak bulunan enzimlerin serum düzeylerini etkiler (26,71,78,119, 120,170). Bu çalı mada karaci er hücre hasarının biyokimyasal göstergelerinden olan serum ALT, LDH ve alkolle indüklenen bir enzim oldu u bilinen GGT düzeylerinin çalı ılması planlandı. Alkol ve normal izokalorik sıvı diyet verilen her iki gruptaki ratlarda sham grubuna göre ALT düzeyleri yükselme bulundu. Ancak normal sıvı diyet verilen gruptaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmaz iken, alkol verilen gruplardaki fark anlamlı idi. Bu durum histolojik bulgular ile uyumlu idi. Yapılan çe itli klinik ve deneysel çalı mada alkolik karaci er hastalı nda alkole ba lı serum ALT düzeyleri artımı olarak bildirilirken (78,120,161), bazı çalı malarda de i medi i belirtilmi tir (71). Özcan ve ark. oral yoldan alkol vererek wistar ratlarda yaptıkları çalı malarında serum ALT düzeylerinde alkol kullanımının birinci gününden itibaren anlamlı artı saptadıklarını, 21 günün sonunda kontrol grubuna göre artı ın oldukça

anlamalı oldu unu belirtmi lerdir (120). Uzun ve ark., 4 hafta boyunca intragastrik yoldan alkol verdikleri wistar ratlarda serum ALT ve AST düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmu lardır (161).

Serum LDH düzeyleri incelendi inde alkol verilen gruplardaki LDH düzeyi hem sham hem de normal sıvı diyet verilen gruba göre daha dü ük olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı de ildi. Castilla ve ark. hücre kültür ortamında yaptıkları çalı malarında, 0,02 mmol/L etanol varlı ında LDH aktivitesi daha yüksek, 2 mmol/L ve 5 mmol/L konsantrasyonda yarıdan daha fazla dü ü gözlendi ini ancak ortama 10 mmol/L etanol konması durumunda belirgin olarak LDH aktivitesinin arttı ını saptamı ve dü ük dozlarda etanolün LDH aktivitesini azalttı ını ancak belli dozun üstündeki etanolün LDH'ı arttırdı ını belirtmi lerdir (26). Benzer ekilde, hücre kültür ortamında yapılan di er bir çalı mada 10 mmol/L düzeyindeki etanolün varlı ında, LDH düzeyleri kontrole benzer, hatta 24. saatte kontrolden daha dü ük saptanırken; 50 mmol/L etanolde kısmen yüksek, 100 mmol/L etanol düzeylerinde belirgin olarak arttı ı gösterilmi tir. Bu durumda etanolün karaci er hücrelerinde LDH üzerine doza ba ımlı olarak etki gösterdi i sonucuna varılmı tır (172). Yapılan di er bir deneysel çalı mada, alkol verilen grup ile kontrol grubunun safra LDH düzeyleri benzer bulunmu tur (112). LDH eritrositlerde de bulunan bir enzimdir. LDH'nın serumda ölçümünü etkileyen preanalitik parametrelerden biri de serumun hemolizli olmasıdır (114). Sonuçlarımızı etkileyen preanalitik etkenlerden biri olarak bazı serumların kısmen hemolizli olması dü ünülse de sham, NSK ve NSP grubundaki aktiviteler birbirine bezer iken alkol verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel bir fark olmamakla birlikte kısmen azalma gözlenmi tir. Bu durumun Castilla ve ark. çalı malarında belirttiklerine benzer ekilde alkolün ikili etkisinden kaynaklanmı olabilece i dü ünülebilir.

Alkolik karaci er hastalıklarında hücre hasarının di er bir enzimatik göstergesi GGT düzeylerindeki de i imdir. Kronik alkol kullanımı sırasında serum GGT düzeyleri sıklıkla artar. Bu artı , GGT yapımının artması veya alkole ba lı karaci er hücrelerinde meydana gelen hasara ba lı GGT sızıntısına ba lanmaktadır (140). Bu çalı mada tüm gruplarda serum GGT düzeyi ara tırılmı ancak çalı ılan yöntem ile test iki kez

tekrarlanmasına rağmen çalı ılan test kiti ile hem sham hem de çalı ma gruplarının ço unda saptanabilir sınırlarda bir de er elde edilememi tir. Sadece iki ratta 2 U/L gibi dü ük düzeyde bir de er elde edilmi tir. Bu durum a ırtıcı bulunmu ve çalı mada kullanılan wistar ratlarda normal serum GGT düzeyinin referans de eri ara tırılmı tır. Yapılan literatür taramalarında çe itli çalı malarda wistar ratlarda serum GGT düzeyinin ölçülebilir de erleri verilmi olsa da Boehem ve ark. 2007 yılında yaptıkları, wistar ratlar ve C57/B16 farelerdeki biyokimyasal parametrelerin referans aralı nın ara tırıldı ı çalı malarında, wistar ratlarda ve C57/B16 farelerde serum GGT'nin saptanabilir sınırlarda olmadı nı bulmu lar ve bu nedenle GGT'ye ait bir referans aralık vermemi lerdir (15). Aynı yayında daha önce yapılmı benzer referans aralık çalı malarının bazılarında da GGT'nin saptanamadı ı belirtilmi tir. Deneysel olarak wistar ratlarda akut pankreatit olu turulan ve biyokimyasal parametreleri bizim kullandı mız kit ve cihaz kullanılarak ara tırılan bir di er çalı mada ALT, AST ve ALP için serum de erleri belirtilmi iken hem sham grubunda hem de akut pankreatitli grupta GGT ve bilirubin ölçümün alt sınırının altında de erlerde olması nedeniyle de erlendirilemedi i belirtilmi tir (110). Bu çalı manın sonuçları da bu bulguyu desteklemi tir. Ratlardaki anatomik farklılık karaci er kaynaklı bazı biyokimyasal parametrelerin insandan farklı olmasının nedeni olabilir. Ancak çalı ılan kitin saptama limitine ba lı farklı sonuçlar olabilece i de unutulmamalıdır.

Alkolik karaci er hastalı nın patogenezinde oksidatif stres ve rolü üzerinde çalı ılan bir alandır (132). Oksidatif stres varlı nda etanolün indükledi i karaci er hasarında serbest oksijen radikalleri rol oynamaktadır (95). Ya artmı oksijen radikalleri veya azalmı antioksidan kapasite sonucunda karaci er hücrelerinde oksidatif hasar geli ir. Mikrozomlar ve mitokondri alkol kullanımını sırasında etkilenen karaci er organelleridir (126). Alkole ba lı geli en karaci er hasarında, artan serbest oksijen radikalleri, artmı lipid peroksidasyonu ve azalmı glutatyon (GSH), vitamin E, S-adenosylmethionin (SAM) gibi antioksidan moleküller birlikte rol alır (61,77,95).

Dokularda oksidatif hasarın göstergelerinden biri olarak sıklıkla doku ve serum MDA düzeyleri ölçülmektedir. Kronik alkol kullanımını sonrasında enfeksiyon

olu turulmu olan bu çalı mada karaci er ve akci er dokularında oksidatif hasar göstergesi olarak dokularda ve serumda MDA düzeyleri ara tırıldı. NSK ve NSP grupları sham grubu ile kar ıla tırıldı ında karaci er MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı. ESK ve ESP gruplarındaki MDA düzeyleri kar ıla tırıldı ında hem sham grubuna hem de NSK ve NSP gruplarına göre MDA düzeylerinin artımı oldu u gözlemlendi. Çe itli klinik ve deneysel çalı mada alkol ve karaci er lipid peroksidasyonu arasındaki ili ki ara tırılmı tır (19,58,69,119,159,161). Hem klinik hem de deneysel çalı malarda alkole ba lı serum MDA düzeyinde ve karaci er lipid peroksidasyonunda artı bildirilmi tir (58,61,75,161,169). Kanbak ve ark. kronik etanol verilen ratlarda yaptıkları çalı malarında MDA düzeyinin kontrole göre arttı mını ve betainin lipid peroksidasyonuna kar ı koruyucu etkisi bulundu unu saptamı lardır (76,77). Uzun ve ark. çalı malarında alkol verilen ratlarda hem serum hem de karaci er MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptamı lardır (161). Bu çalı mada enfeksiyon olu turulan gruplardaki karaci er MDA düzeyleri de erlendirildi inde NSP grubunda karaci er MDA düzeyinin sham grubuna göre kısmen arttı ı ancak aradaki farkın anlamlı olmadığı, NSK grubu ile kar ıla tırıldı ında MDA düzeylerinin benzer oldu u görülmü tür. Ancak alkol verilen ve P. aeruginosa pnömonisi olu turulan ESP grubundaki MDA artı mının kontrol grupları yanında ESK grubuna göre de daha fazla oldu u görüldü.

Alkolün neden oldu u hücre hasarının nedenleri henüz tam olarak açık olmasa da alkolik karaci er hastalı ında oksidatif stres önemli rol oynamaktadır. Serbest oksijen kayna ı çe itli hücreler olabilir. Karaci er dokusunda kupffer hücreleri bunlardan en önemli olanlardır. Karaci er kupffer hücrelerinin aktivasyonu süperoksit, nitrik oksit, TNF-alfa ve di er çe itli sitokinlerin aktivasyonu sonucunda karaci er hücresinde hasara neden olmaktadır. Bu etkiler gram negatif bakteri lipopolisakkaridi (LPS) aracılı ı ile kupffer hücrelerinin aktivasyonuna ba lı olarak da geli mektedir. Normal ko ullarda herhangi bir enfeksiyon bölgesinde gram negatif bakterilerden LPS salgılandı ında kısa sürede kan dola ımına geçmekte ve karaci ere ula maktadır. Benzer ekilde bakteriyemi geli ti inde bakteriler de karaci ere ula makta ve karaci erde ortadan kaldırılmaya çalı ılmaktadır. Bu ortadan kaldırılma sürecinde karaci er kupffer hücreleri aktive olmaktadır. Sonuç olarak aktive olan kupffer

hücrelerinden salgılanan çeşitli kimyasal mediyatörler bakteriyi ortadan kaldırmaya çalışırken oluşan serbest oksijen radikalleri aracılığıyla doku hasarı geliştirmektedirler. Alkol kullanımını sırasında karaciğerde CYP2E1 aracılıksız oksidatif stresin de alkolik karaciğer hastalığında hücre hasarından sorumlu olduğu bilinmektedir (101). Lu ve ark. CYP2E1 indükleyicisi (pyrazol) bir madde varlığında LPS'in karaciğer hasarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, tek başına LPS veya tek başına pyrazol kullanılan ratlarda kontrol grubundan daha yüksek serum ALT düzeyleri saptadıklarını ancak farkın anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, hem tek başına LPS kullanılan ratlarda hem de tek başına pyrazol kullanılan ratlarda karaciğer MDA düzeylerinin kontrole göre arttığını ancak farkın anlamlı olmadığını tek başına pyrazol verilen gruptaki artışın tek başına LPS verilen gruptan fazla olduğunu saptanmıştır (101). Lu ve ark. aynı çalışmaları pyrazol+LPS birlikte verilen ratlarda hem serum ALT düzeylerinde hem de karaciğer MDA düzeylerinde kontrole göre oldukça anlamlı artış saptadıklarını bildirmişlerdir (101). Mathurin ve ark. çalışmaları alkol ve LPS (enteral endotoksin verilerek) birlikte verilen ratlarda, karaciğerde kontrole ve tek başına LPS verilen gruba göre spot nekroz oranını daha yüksek ve serum ALT düzeyini de anlamlı olarak daha yüksek saptamışlardır (105).

Bu çalışmada da tek başına enfeksiyon varlığında karaciğer MDA düzeyi sham ve kontrol grubuna göre farklı değildi. Ancak alkol verilen ratlarda enfeksiyon varlığında karaciğer hücre hasarının histolojik olarak arttığını, serum ALT ve karaciğer doku MDA düzeylerinin de diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek olduğunu saptandı. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmaları destekler niteliktedir. ESK grubuna göre de MDA artışının daha fazla olması doku hasarında alkolle birlikte enfeksiyonun varlığının serbest oksijen aracılıksız hasarı arttırdığı şeklinde yorumlandı. Bu durum, uzun süreli alkol kullanımına bağlı immün sistemin etkilenmesi sonucunda konakta herhangi bir bölgede oluşan enfeksiyonun daha şiddetli olabileceği ve enfeksiyon nedeniyle karaciğerde artan mononükleer hücre infiltrasyonuna bağlı serbest radikal oluşumunun artması sonucunda doku hasarının artması olabileceği şeklinde açıklanabilir. Bu çalışmanın bulguları alkol kullanımını sırasında enfeksiyon gelişiminin karaciğerdeki serbest oksijen radikallerine bağlı hasarı arttırdığını göstermektedir.

Serum MDA düzeyleri açısından gruplar arasında fark gözlenmedi. Serumda MDA düzeyleri arasında farkın gözlenmemesinin nedenin lokal oksidatif stres sonucunda dokularda saptanan MDA artının, olasılıkla seruma yansıdığına fark yaratacak büyüklükte olmamasından kaynaklandığı düşünüldü.

Alkol kullanımı, immün sistem üzerinde yaptığı modülasyon sonucunda, özellikle akciğer enfeksiyonlarına olmak üzere genel olarak enfeksiyon hastalıklarına yatkınlık yaratır (48,50,149,153,174). Kronik alkol kullanan bireylerde gram negatif bakterilerden iki önemli bakteri, P.aeruginosa ve Acinetobacter türleri daha fazla akciğer enfeksiyonu olmaktadır (63,174).

Bu çalışmada akciğer dokusundaki MDA düzeyleri incelendiğinde sağ akciğerde gruplar arasında fark olmadığı, sol akciğerde enfeksiyon gruplarında sham grubuna göre MDA düzeyinin fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha fazla olduğu saptandı. ESP ve NSP grupları MDA düzeyleri yönünden karşılaştırıldığında arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Aytaçolu ve ark. Wistar ratlarda yaptıkları çalışmalarında akut alkol alımının akciğer hasarını tetiklediğini ve hem akciğer dokusunda hem de serumda kontrol grubuna göre MDA düzeylerinin yükseldiğini bulmuşlardır (7). Akut etanol intoksikasyonuna bağlı akciğerlerde kontrole göre MDA'nın %60 oranında arttığı gösterilmiştir (138). Çeşitli çalışmalarda alkol veya enfeksiyon varlığında akciğer MDA düzeyleri artmış olarak bildirilmiş olsa da akciğere intratrakeal olarak direkt LPS verilerek yapılan bazı çalışmalarda MDA düzeylerinin kontrole benzer olduğu belirtilmiştir (83).

Kronik alkol kullanımı akut akciğer zedelenmesine neden olmakta ve enfeksiyon riskini artırmaktadır (17). Bu çalışmada alkolün enfeksiyonun iddeti üzerine etkisi araştırıldı. Bu çalışmada intratrakeal olarak bakteri verilmesi sonrasında akciğer homojenatlarının kültürü yapılarak mikrobiyolojik olarak enfeksiyonun varlığı araştırıldı. Ayrıca dokular uygun tespit yöntemlerinden sonra HE boya yöntemi ile

histolojik olarak de erlendirildi. ntratrakeal olarak bakteri verilmesinden sonra ratın yapısına, verili anındaki pozisyona ba lı olarak sa ve sol akci erde farklı yanıt olu abilece i dü ünüldü ünden tüm de erlendirmeler sa ve sol akci er loblarında ayrı ayrı yapıldı. Akci er homojenatlarında üreyen bakteri miktarları kar ıla tırıldı nda alkol verilen ESP grubunda üreyen bakteri miktarı NSP grubundan daha fazlaydı ve sol akci erdeki üremeler yönünden incelendi inde aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Ayrıca yapılan histolojik incelemelerde her iki grupta akci erde enfeksiyonun histopatolojik bulguları vardı. ESP grubunda intratrakeal P.aeruginosa verili ini takiben 20. saatte 2 rat ölmü ve bu gruptaki ratların genel durumu NSP grubuna göre daha kötü olarak de erlendirilmi tir. Hem mikrobiyolojik hem de histolojik bulgular ve 24 saat içindeki hayvanların genel durumlarındaki kötüleşme ve ölüm oranlarına bakıldı nda kronik alkol kullanımı sırasında geli en P.aeruginosa pnömonisinin daha iddetli seyretti i sonucuna varılmı tir. Etanol alımı alveolar tip II hücrelerin yapısı üzerine etki etmektedir. Normal artlarda alveolar tip II hücrelerinde GSH, hem plazmaya göre hem de di er hücre dı ı sıvılara göre birkaç yüz kat daha fazla miktarlarda bulunur. Hasarlanmı alveollerde glutatyon düzeyi dü mekte ve akci er enfeksiyonlarına yatkınlık yaratmaktadır (66). Alkolün P.aeruginosa akci er enfeksiyonu üzerine etkisinin ara tırıldı ı bir çalı mada, P.aeruginosa inhalasyonundan önce intraperitoneal olarak etanol verilen, etanol ile birlikte seçici NOS-II inhibitörü L-N⁶-iminoethyl lysine (LNIL), sadece LNIL verilen ve PBS verilen kontrol grubu ratlarda 4. saatte akci erdeki bakteri miktarları kar ıla tırılmı tir. Bakteri inhalasyonu öncesi etanol verilen grupta PBS verilen gruba göre akci erde daha fazla miktarda P.aeruginosa görülmü tür. Sadece LNIL verilen grupta bakteri miktarı azalırken, etanol+LNIL verilen grupta sadece etanol verilen gruba benzer miktarda akci erde bakteri varlı ı saptanmı ve nötrofil ve nitrik oksit ba ımlı *invivo* mekanizmalar ile etanolün akci erde P.aeruginosa'nın temizlenmesini inhibe etti i ve sonuçta daha fazla miktarda bakteri varlı ına neden oldu u belirtilmi tir (56).

Bu çalı manın bulguları kronik alkol kullanımı sırasında geli en enfeksiyonun daha iddetli seyretti ini ve aynı zamanda serbest oksijen radikallerine ba lı hücre hasarının sadece enfeksiyonun oldu u bölgeye sınırlı olmadı ını, karaci erde

enfeksiyon varlığında hücre hasarının daha da arttığını ve alkolün sadece organlar üzerine değil enfeksiyonun şiddeti üzerine de olumsuz etkisi olduğunu göstermektedir.

Kronik alkol kullanan bireyler günlük kalorilerinin yarısını alkolden sağlar. Bu durum gastrik malabsorpsiyona neden olur ve sonuçta kronik alkol alan bireylerde diyet aracılığıyla düşük antioksidan alımı vardır (132). Alkol kullanımı sırasında GSH ve vitamin E gibi antioksidan savunma mekanizmalarında azalma görülür. Antioksidanlar, konanın serbest oksijen radikallerine karşı önemli savunma mekanizmalarıdır. PON HDL ile ilişkili, antioksidan özelliği olduğu bilinen, karaciğerde sentezlenen bir enzimdir. PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç ayrı formu tanımlanmıştır. PON1 organofosfatlar, PON2 ve PON3 organofosfatlar üzerine sınırlı ancak aromatik ve alifatik laktonlar üzerine etkili hidroliz yapar. Bu üç PON enziminin de antioksidan özelliği vardır. Organofosfatlar bu enzim tarafından hidrolize edilirler. Paraokson bu amaçla kullanılan bir organofosfattır. Paraokson dışında organofosfat olmayan fenil asetat, tiyofenilasetat, 2 neftil asetatın ve lakton halkası içeren çeşitli maddelerin de PON1 enzim aktivitesi için substrat olduğu bilinmektedir (35,175). Paraokson ve fenil asetatın tek enzim tarafından mı yoksa farklı enzimler tarafından mı hidrolize edildiği tartışmalıdır. PON1 için paraokson (diethyl-p-nitrophenyl phosphate) ve fenil asetat (phenyl acetate) uygun substratlardır. Ancak karaciğerden sentezlenen albümin ve bazı enzimler de bu substratları kullanabilmektedir. Örneğin organofosfat olmayan fenil asetat ve p-nitrofenil asetat ve organofosfat olan paraokson pH: 8'in üzerinde albümin ile de hidrolize olabilmektedir. Bu nedenle PON1 enzim aktivitesi araştırmalarında pH:8'in üzerindeki pH aralıklarında çalışarak elde edilen aktivitenin sadece PON1 aktivitesi olamayabileceğini göstermektedir (175). Bu çalışmada çalışılma solüsyonlarının pH'sı 8 olarak ayarlanarak çalışılmıştır.

Paraoksonaz, aril esteraz gibi A tip esterazlar ve albümin, organofosfatlar aracılığıyla kovalan inhibisyona dirençli iken, karboksiesteraz, asetilkolin esteraz ve kolin esteraz gibi B tip esterazların duyarlı oldukları bilinmektedir (4,175). Aynı zamanda organofosfatlara duyarlı bu B tip esterazların memeli dokularında, arilesteraz aktivite ölçümlerinde substrat olarak kullanılan fenil asetatı hidrolize ettiği de gösterilmiştir.

Dolayısı ile dokularda yapılan çalı malarda ortamdaki karboksi esterazlar inhibe edilmezse ölçülen PON1 enzim aktiviteleri tam olarak gerçe i yansıtmayabilir (175). Bu nedenle doku çalı malarında PON1 enzim aktivitesi ara tırılmaya ba lanmadan önce B tip esterazların paraokson gibi organofosfat bile ikleri ile inhibe edilmesi önerilmi tir (14,175). Serum için benzeri önerilerin olmaması B tip esterazların karaci erden seruma geçi inin A tip esterazlara göre hem oldukça yava hem de az olmasından kaynaklanmı olabilir (175). Bu çalı mada da doku örneklerindeki enzim aktiviteleri bu öneriler dikkate alınarak, çalı ma öncesi paraoksonun belli konsantrasyonu ile 15 dakikalık bir inkübasyon ile B tip esterazların inaktive olması sa lanarak ara tırıldı.

Bazı serin esterazların, florofosfatazların memeli böbrek ve karaci erinde yüksek aktivitede saptanırken serumda saptanmadı ı belirtilmektedir (175). Doku PON1 aktivitelerinin saptanmasında serin esterazların inhibisyonu için fenil metil sulfonil florid (PMSF; Phenyl methyl sulfonyl fluoride) kullanılması da önerilmektedir (14). Bu çalı mada doku örneklerinde PMSF kullanılmadı ı için elde edilen enzim aktivitesinin bir kısmından bu tip esterazların da sorumlu olabilece i dü ünülmü tür.

PON1 enzim aktiviteleri ile yapılan çalı malarda fenil asetatın paraoksondan çok daha fazla ve hızlı hidrolize oldu u bildirilmi tir (36,175). Bu çalı mada da hem serumda hem de dokularda fenil asetata kar ı elde edilen aril esteraz aktiviteleri paraoksona kar ı elde edilen paraoksonaz aktivitesinden çok daha fazla bulunmu tur.

Bu çalı mada NSK ve ESK gruplarındaki serum PON ve AE aktiviteleri sham grubuna benzer olarak saptanırken, akci er enfeksiyonu olu turulan hem ESP hem de NSP gruplarında sham, NSK ve ESK gruplarına göre PON aktivitesi fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da daha dü ük olarak saptanmı ve bu bulgu önemli bulunmu tur. Rao ve ark. çalı malarında 8 haftalık oral alkol verdikleri Wistar ratlarda PON düzeyini ara tırmı lardır. Günlük diyetin total enerjisini %0, %10 ve %36 oranında alkolden sa layacak ekilde üç ayrı çalı ma grubu olu turulmu . Hafif alkol alan (%10) grupta karaci er ve serum PON aktivitesinde %20-25 oranında artı saptarken, a ır alkol verilen (%36) grupta serum PON aktivitesinde %25 dü ü

saptamı lardır (135). Bu durum karaci er PON mRNA ekspresyonun gösterilmesi ile de do rulanmı ve hafif alkol alımında karaci er PON mRNA'sının upregüle oldu u ancak yüksek dozda alkol alımında karaci er mRNA'sının downregüle oldu u sonucuna varılmı tır (135). Alkolik ve non-alkolik bireylerde yapılan bir ba ka klinik çalı mada serum PON aktivitesi anlamlı ekilde alkolik bireylerde dü ük bulunurken, ALT ve GGT düzeyleri yüksek bulunmu ve karaci er enzimleri ile PON arasında negatif bir korelasyon oldu u bildirilmı tır (127). Kronik karaci er hastalı ı olan bir grupta yapılan kohort çalı masında bazal PON aktivitesinin kronik hepatitli olgularda kontrol grubuna göre %52, sirozlu olgularda % 67 oranında azalma gösterdi i saptanmı tır (45).

Serum PON1 aktivitesinin, hastalı ın evresi arasında direkt bir ili ki olmasa da non-alkolik steatohepatitin erken everesinde bile serum düzeylerinin anlamlı derecede azalması, PON1 aktivitesinin lipid peroksidasyonunun biyokimyasal belirleyicisi olarak kabul edilebilece i vurgulanmı tır (11).

Normal serum paraoksonaz aktivitesi bireyler arasında farklılık gösterebildi i gibi bölgesel farklılıklar da göstermektedir (38,87,99,148). Yapılan çalı malar tüketilen alkol miktarı ve karaci erde olu turdu u hasara ba lı olarak serum PON enzim aktivitesinin de i ti ini göstermektedir. Dü ük düzeyde alkol tüketiminin PON enzim aktivitesi üzerine, dolayısı ile antioksidan kapasite üzerine olumlu etkileri varken, yüksek miktarlar ve uzun süreli alkol kullanımının PON enzim aktivitesi üzerine olumsuz etkileri olmaktadır (127,135).

Deney hayvanlarında olu turulan alkol modellerinde diyet içeriklerinin ve etanolün verili yolunun hasarın iddetini etkiledi i bilinmektedir (47,91,126,134). Rao ve ark.'nın çalı masında kronik alkol modeli için diyet ile verilen alkol miktarı bu çalı ma ile aynı, ancak hem diyetin ya oranı daha fazla, hem de deneyin süresi iki hafta daha uzundur (135). Bu çalı mada karaci erde oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA düzeylerinde alkol verilen gruplarda ve özellikle enfeksiyon varlı ında belirgin artı saptanırken, PON ve AE aktivitelerinde beklendi i kadar belirgin bir dü üklük saptanmadı. Ancak Yalçınkaya ve ark.'da içme suyuna %20 oranında alkol katarak

olu turdukları kronik alkol modelinde 75 günün sonunda MDA düzeylerinde anlamlı bir artış saptadıklarını ancak antioksidan parametrelerde herhangi bir değişim saptamadıklarını belirtmişlerdir (169). PON ve AE aktivitesi de birer antioksidan parametre olarak değerlendirildiğinde, bu bulgu bizim çalışmamızın sonucunu destekliyor olsa da, bizim çalışmamızda PON ve AE aktivitelerinde beklenen düzeydeki artışın yeterince olmaması alkol verilme süresine bağlı olabileceği, sürenin birkaç hafta daha uzun olması durumunda PON ve AE aktivitesindeki artışın anlamlı düzeylerde olabileceği düşünüldü.

Bakteriyel enfeksiyonlar, bakteriye ait birçok virülans özelliğinin yanında konak hücrenin immün mekanizmalarının rol aldığı ve karşılıklı etkiletiği karmaşık bir süreçtir. Bağışıklık baskılanmış konakta *P.aeruginosa* ile enfeksiyonlara yatkınlık gelişir. *P.aeruginosa* suşları çeşitli virülans faktörleri aracılığı ile yerleştikleri dokuda çoğalır. Bu bakteri grubunun quorum sensing (QS) sistemi aracılığı ile salgıladığı otoindükleyici AHL molekülleri biyofilm oluşumunda ve dokuya yerleşmede önemli rol oynar (152). *P.aeruginosa* suşlarının salgıladığı AHL moleküllerinin bağışıklık sistemini düzenlediği ve konağın çeşitli hemodinamik parametreleri üzerine etkileri olduğu ve akciğer enfeksiyonlarının patofizyolojisinde önemli rolleri olduğuna dair çalışmalar vardır (51,90,158). Bakteri virülansındaki bu önemli rolleri nedeniyle AHL molekülleri, anti-infektif tedavi için yeni hedef molekülleri olarak değerlendirilmektedir (46). AHL molekülleri lakton halkası içerir (152). PON enzimlerinin laktonaz aktivitesi olduğu bildirilmiştir (37). *P.aeruginosa*'nın salgıladığı AHL ürünleri özellikle PON2 aracılığı ile inhibe olmaktadır (33,121). PON2'nin hem bakterinin AHL sinyalleri aracılığı ile virülansını azalttığı hem de enfeksiyona konağın yanıtını düzenlediği düşünülmektedir (37). Trakeal epitel hücrelerinde PON1,2,3 enzimleri, özellikle PON2 ve PON3 daha fazla eksprese edilmektedir (151). Trakeal epitel hücrelerinde PON2'nin *P.aeruginosa* QS sinyallerini inhibe ettiği ancak bütünlüğü bozulmamış epitel hücrelerinde etkili olmadığı gösterilmiştir (151).

PON veya PON dışı enzimlerin trakeal epitel hücrelerinde 3-OC12-HSL sinyallerini inaktive etmesi, PON enzimlerinin özellikle PON2'nin *P.aeruginosa* QS

sinyallerine karşı anahtar savunma mekanizması olabilmesi yönünden önemlidir. PON2'nin 3-OC12-HSL hidrolize etme yeteneği PON1 ve PON3'e göre 22-75 kat daha yüksek etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (157). PON2'nin ER ve nükleer zarında lokalize olduğu, fare makrofaj ve insan hücre dizilerinde plazma membranında yerleştiği için bu nedenle PON2'nin 3-OC12-HSL'nu hücre içinde inaktive ettiği gösterilmiştir (67, 121). *P.aeruginosa* AHL sinyallerinin bloke edilmesi bakterinin biyofilm yapımına gidişini azaltmakta ve sonuçta bakterinin virulansı üzerine etki etmektedir, ancak bakterinin üremesini durdurmak üzerinde etkisi yoktur. *P.aeruginosa*, 3-oxododecanoyl-L homoserine lakton molekülüne karşı geliştirilmiş olan bir antikorum, akciğerdeki bakteri miktarı üzerinde de etkili yapılmaksızın konanın inflamatuvar yanıtını bloke ederek *P.aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (111).

Ozer ve ark. PON1 içeren wild tip fare serumu ile *P.aeruginosa* biyofilm oluşumunun %75 azaldığını ancak sıvı serum albümünü ile %10 azalma olduğunu göstermişlerdir (121). Aynı çalışmada PON1 knock out fare serumu ile biyofilm oluşumunun %15 inhibe olduğu bildirilmiştir. İlginç olarak aynı çalışmada PON1 defekti olan farelerin wild tip PAO1 ile enfeksiyona daha duyarlı olacağını beklenirken peritonit oluşumunu enfeksiyon modelinde, enfeksiyondan 50 saat sonra PON1 knock out fareler %100 yaşarken, wild tip fareler %50 oranında yaşamıyorlar, bu durum PON1'in olmamasına bağlı PON2 ve PON3'ün artmış ekspresyonu sonucu PAO1'in interfere olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu durumu doğrulamak için araştırmacılar PON1 knock out farelerin hava yolu epitelindeki PON2 ve PON3 mRNA düzeylerine bakmışlar ve wild tip fareler ile karşılaştırmışlar. PON1 knock out farelerde diğergruha göre belirgin olarak artmış PON2 ve PON3 mRNA düzeyleri saptanmıştır. Artmış PON2 ve PON3 düzeylerinin *P.aeruginosa* sepsisine karşı koruyucu olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak PON2 ve PON3'ün 3-OC12-HSL üzerine PON1'den daha etkili olduğu ileri sürülmüştür (121).

Enfeksiyon sırasında makrofaj olgunlaşması sırasında strese bağlı PON2 upregüle olur. Bu durumun doğal bağışıklık sisteminde koruyucu rolü olabilir. PON enzimlerinin fizyolojik rolünün, yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan ve lokal anti inflamatuvar

yanıtın düzenlenmesi ile sonuçlanan lipid mediyatörleri üzerine oldu u da belirtilmektedir (36,139).

Alkolün ba ı ıklık sistemi üzerine direkt ve indirekt etkileri vardır. Alkol ba ı ık yanıtta rol alan çe itli organların üzerine etkir ve sonuçta TNF-alfa, interferon gama, NK ve fagositer hücreler üzerine olan etkilerine ba lı ba ı ıklık sistemini zayıflatmaktadır (12,143,153,163). Ba ı ıklı ın zayıfladı ı durumlarda enfeksiyona yatkınlık geli ir (153).

Bu alı mada kronik alkol kullanımı sırasında P.aeruginosa enfeksiyonu varlı ında kona ın PON enzimleri aracılı yanıtı ara tırılmı ve bu amaçla serum yanında dokularda da PON ve AE aktivitelerine bakılmı tır. Sadece alkolün ve alkolle birlikte P.aeruginosa enfeksiyonun varlı ının PON enzim aktiviteleri üzerine etkisi ara tırıldı. Alkol ve enfeksiyon varlı ında daha belirgin olmak üzere genel olarak enfeksiyon varlı ında serum PON ve AE aktivitelerinin kontrole göre daha dü ük oldu u görüldü. Karaci er enzim aktiviteleri yönünden gruplar arasında fark saptanmadı. Bu alı mada sol akci erde ESP grubunda üreyen bakteri miktarı NSP grubundan daha fazlaydı ve aradaki fark da anlamlı bulundu. Ancak akci er PON ve AE aktiviteleri yönünden hem sa hem de sol akci er de gruplar arasında fark saptanmadı. P.aeruginosa akci er enfeksiyonu ve PON enzim aktivitelerinin ileri çalı malarda moleküler olarak PON mRNA çalı maları ile ara tırılması yararlı olacaktır.

Bu alı mada hem karaci er hem de akci erde alveol hücrelerinde insitu hücre ölümünün varlı ını göstermek için TUNEL boyama yöntemi ile DNA kırıklarının varlı ı ve kolorimetrik EL SA yöntemi ile dokuda kaspaz-3 aktivitesi ara tırıldı. ESK grubunda apoptotik hücre oranı hem sham grubuna hem de normal diyetle beslenen kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Bu sonuçlar kronik alkol kullanımına ba lı karaci erde apoptozun arttı ını gösteren çe itli klinik ve deneysel çalı malarla uyumludur (42, 108,176).

Kronik alkol kullanımı sırasında akciğer enfeksiyonu gelişmesi durumunda karaciğerde apoptotik sürecin etkilenip etkilenmediği de araştırıldı. Alkol verilen grupta enfeksiyon varlığında kontrol gruplarına göre anlamlı oranda apoptotik hücrelerin arttığı görüldü. Benzer şekilde enfeksiyon oluşturulan NSP grubunda da sham grubuna ve normal sıvı diyet ile beslenen gruba göre karaciğer apoptotik hücre oranının alkol kullanan grup kadar olmasa da anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü. Vücudun herhangi bir bölgesindeki enfeksiyon, mikroorganizma ile konak arasındaki bir dizi etkileşim sonucunda gelişir. Oluşan enfeksiyon yerel olarak sınırlı olabileceği gibi çevre dokulara yayılabilir veya uzak organ ve dokulara kan yolu ile yayılarak sistemik enfeksiyon şeklinde seyredebilir (8). LPS'in indüklediği karaciğer apoptozunda, artmış mononükleer hücre infiltrasyonu ve aktive makrofajlardan salınan TNF-alfa aracılığıyla apoptoz gelişmektedir (52,97). Benzer şekilde akciğer enfeksiyonu varlığında karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonu kaçınılmaz olarak artacak ve makrofaj aktivasyonu olacaktır. Bu çalışmada enfeksiyon oluşturulan her iki grupta da kontrole ve sham grubuna göre TUNEL pozitif hücre sayısındaki artışın buna bağlı olduğu düşünüldü.

Apoptotik yolların ortak molekülü kaspaz-3'dür. Bu çalışmada apoptozun belirteçlerinden biri olan doku kaspaz-3 aktivitesi araştırıldı. Karaciğer kaspaz-3 aktiviteleri karşılaştırıldı. İnceleme grupları arasında fark bulunmamıştır. Grupların ortanca değerleri incelendiğinde özellikle alkol verilen ve enfeksiyon oluşturulan ESP grubunda sham grubuna çok yakın aktivite saptanmıştır. Bu durum apoptotik hücre oranlarına göre ters bir durum olarak değerlendirilmiştir. Oysaki ESP grubunda kontrol gruplarına göre apoptotik hücre oranı yüksek saptanmış bu yüksekliğe paralel olarak kaspaz-3 aktivitesinin de yüksek olması beklenmiştir. İncitici olarak ortanca olarak kaspaz-3 aktivitesi ESP grubunda sham grubuna benzer bulunmuştur. Normalde alkole bağlı karaciğer hücrelerinde gelişen apoptoz sürecinde fas-fasL sistemi aracılığıyla kaspaz-3 aktivasyonunda artış olduğu ve bu yolun alkole bağlı karaciğer hücre apoptozunda mitokondrial sitokrom c varlığından daha belirleyici olduğu bildirilmiştir (177). Bu çalışmada enfeksiyon varlığında apoptotik hücre oranında görülen durumun kaspaz-3 aktivitesinde gözlenmemesi ilginç bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada LPS ile indüklenmiş toleran farelerde karaciğer apoptozunun kontrol ratlara göre suprese olduğu ve kaspaz-3 aktivitesinin ve ekspresyonunun down regüle olduğu saptanmıştır (102). Alkol kullanımının pankreastaki ölüm sinyalleri üzerine etkisinin araştırıldı *in vivo* bir çalışmada da pankreasta alkole bağlı kaspaz-8 gen ekspresyonunun azaldığı ve buna bağlı kaspaz-3 aktivitesinin düdüü bildirilmiştir (163). Koteish ve ark. yaptıkları çalışmaları LPS verilen ratlarda karaciğerde apoptoz ve prokaspaz-3 ve kaspaz-3 aktivitelerini araştırmaları, normal diyet ile beslenen ratlarda LPS verilmesinden sonra karaciğer apoptozunun artmasının histolojik kanıtları ile birlikte kaspaz-3 aktivitesinde de kısa süreli bir artış izlediklerini ancak benzer durumun alkol verilen ratlarda gözlenmediğini bildirmişlerdir (86). Oysa alkol verilen ratlarda LPS uygulanması sonrasında karaciğerde histolojik olarak görülen hasarın, normal diyetle beslenen ve LPS verilen gruba göre çok daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu durumda etanolün hepatik kaspaz-3 aktivitesini inhibe edebileceği düşünülmüştür. Aynı çalışmada yapılan ileri analizlerde sitozolik sitokrom c içeriğinde ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonunda etanolle ilişkili olarak bir artış gözlenmemiştir. Sonuçta etanolün LPS'nin indüklediği karaciğer hücrelerinde apoptozu artırdığını ancak bu yanıtta aracılık eden *in vivo* mekanizmaların *in vitro* mekanizmalardan farklı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (86). Bu çalışmada benzer bir bulgunun varlığı, belirtilen çalışmayı destekliyor gibi görünse de, bu bulgunun gruplardaki hayvan sayısı artırılarak, enfeksiyon varlığında alkolün kaspaz-3 üzerine etkisinin ve apoptozda rol alan diğer yollarında sorgulanacağı ileri çalışmalarıyla desteklenmesi gerektiği düşünüldü.

Akciğer dokuları TUNEL pozitifliği yönünden karşılaştırıldığında gruplar arasında fark saptanmamıştır. Tüm gruplarda benzer alveoler alanlar incelemeye alınmış ve alveol epitel hücrelerindeki TUNEL pozitif hücre varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada alveolar hücre epitelinde tüm gruplarda sham grubuna benzer oranda pozitiflik saptanmıştır. Bu çalışmada enfeksiyon oluşturulan gruplarda sham ve kontrol gruplarına göre akciğer kaspaz-3 aktiviteleri açısından fark saptanmamıştır.

P.aeruginosa'nın ve virülans özelliklerinin farklı hücrelerin apoptozu üzerine etkilerini araştıran çeşitli çalışmalar vardır (5,25,29,72,113,142,160). *P.aeruginosa*'nın havayolunda apoptozu indüklemesi hem konak epitel hücrelerine hem de bakteriye bağlıdır. Rajan ve ark. hücre kültür ortamında yaptıkları çalışmaları hava yolu epitellerinde *P.aeruginosa* varlığında proinflamatuar sitokinlerin salgılanmasını ancak apoptozun indüklenmediğini bildirmişlerdir (131). Hotchkiss ve ark. çalışmaları *P.aeruginosa* ile oluşturulan akciğer enfeksiyon modelinde bronşial apoptoz saptadıklarını, ancak kapiller endotelial ve alveolar epitelde nadir apoptoz saptadıklarını belirtmişlerdir (68). Aynı çalışmada kaspaz-3 immünohistokimyasal boyamada negatif bulunmuştur. Hotchkiss ve ark. çalışmaları TUNEL yönteminde hücreye spesifik endojen yüksek endonükleaz aktivitesi varlığında TUNEL yalancı pozitifliklerinin bulunduğunu ve saptanan bu pozitifliklerin buna bağlı olduğunu, sonuç olarak hava yolu epitellerinin *P.aeruginosa*'ya bağlı apoptoza dirençli olduğunu belirtmişlerdir (68). Diğer bazı çalışmalarda da fare böbrek tübül hücrelerinde ve karaciğer hücrelerinde TUNEL yalancı pozitifliklerinin DNA nükleaz aktivitesine bağlı olabileceği bildirilmiştir (129). Yapılan diğer bir çalışmada hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerle oluşturulan pnömöni modelinde enfeksiyon bölgesinde inflamasyon alanında artmış sayıda apoptotik hücre görüldüğü ancak bu hücrelerin PMNL ve lenfosit olduğu ve bronşial epitel hücrelerinde apoptoz görülmediği ve hava yolu epitel hücrelerinin apoptoza dirençli olduğu belirtilmiştir (146).

Ancak diğer bazı çalışmalarda *invivo* *P.aeruginosa* pnömöni modellerinde akciğerde apoptozun varlığı gösterilmiştir. Le Bere ve ark. *P.aeruginosa* PAO1 ile oluşturulan pnömöni modelinde intratrakeal bakteri verilenden 4 saat sonra alınan örneklerde TUNEL pozitif hücre yüzdesini kontrole göre anlamlı olarak artmış bulduklarını bildirmişlerdir (89). Aynı şekilde pnömönik akciğerde kaspaz-3 aktivitesini de anlamlı şekilde artmış saptamışlardır. *P.aeruginosa* pnömönisinin erken evresinde hem alveolar hem de epitel hücrelerde apoptotik aktivitede anlamlı şekilde artış saptandı ve kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk verildiğinde anlamlı şekilde apoptotik hücre oranının düştüğü gösterilmiştir (89).

P.aeruginosa ile enfeksiyon sonrasında CD95/CD95 ligand ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir ve Tip III sekresyon sistemi aracılıklı apoptoz geliştiği bildirilmiştir (64,73). Ayrıca ortamdaki demirin yüksek veya düşük olmasının apoptoz oranını etkilediği ve yüksek demir varlığında PAO1'in apoptozu indüklediği bildirilmiştir (142). Grassme ve ark. deneylerde kullanılan *P.aeruginosa* süspansiyonunun bakterinin üremenin hangi fazından hazırlandığının ve hangi yolla verildiğinin apoptoza gidişi etkilediğini, ayrıca kaspaz-3 aktivitesinin immünohistokimyasal olarak gösterilmemesi olmasının apoptoz yokluğu anlamına gelmeyeceğini belirtmişlerdir (55).

Bu çalışmada alkolün karaciğer hücrelerinde insitu hücre ölümünü arttırdığı enfeksiyon varlığında bu durumun daha da belirgin olduğu bulunmuştur. Ancak akciğerde benzer bulgular görülmemiştir. Enfeksiyon oluşturulan gruplarda kaspaz-3 aktivitesi hem karaciğer dokularında hem de akciğer dokularında kontrollere benzer bulunmuştur. Alkol, enfeksiyon ve apoptoz üzerine yapılan çalışmaların bazıları klinik, bazıları *invivo*, bazıları hücre kültür ortamlarında yapılmıştır. Çalışmalar arası farklılıklar yöntem kaynaklı olabilir. *in vitro* planlanan bir model, konağın immün yanıtı bütüncül olarak düşünüldüğünde tamamen *invivo* bir modeli yansıtamayabilir. Benzer şekilde *invivo* tasarlanan bir modelin de her grupta standardizasyonu her zaman için mümkün olmayabilir (deney hayvanlarının süreç içinde ölümüne bağlı gruplardaki sayının etkilenmemesi, alkole ve enfeksiyona yanıtı bireysel farklılıkların olması gibi). Yukarıda belirtildiği gibi bu araştırmanın bulgularını destekleyen yayınlar olmakla birlikte bu konuda kesin sonuçlara ulaşabilmek için ileri çalışmalara gereksinim duyulduğu görülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen verilere göre, alkolün immün sistem üzerine yaptığı etkilerle bağlı enfeksiyona yatkınlığı arttırdığı, alkol ve enfeksiyon birlikteliğinin karaciğerde hücre zedelenmesini arttırdığı görülmüştür. Serbest oksijen radikallerine bağlı hasar sonucunda karaciğer MDA düzeylerinde artış saptandığı, insitu hücre ölümünün arttığı, bütün bu süreçte bu deney modelinde PON ve AE aktivitelerinin çok fazla etkilenmediği bulunmuştur.

Alkol, P.aeruginosa enfeksiyonu, serbest oksijen radikallerine ba lı hasar ve insitu hücre ölümü ili kisini sorgulayan yeni çalı ma modellerinin ve moleküler çalı maların bu konuda yeni yakla ımlar getirece i ve tedavi protokollerinin geli tirilmesine katkı sunaca ı sonucuna varılmı tır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada alkol ve enfeksiyon varlığında, konak yanıtı sorgulandı. Biyokimyasal ve histolojik bulgularımızda kronik alkol kullanımının karaciğerde hücre hasarını arttırdığı görülmüştür. Karaciğerde artmış lipid peroksidasyon ürünlerinin varlığı alkolün serbest oksijen radikalleri aracılığıyla bir hasara yol açtığını göstermiş ve ayrıca enfeksiyon varlığında bu hasarın şiddetinin arttığı bulunmuştur, alkol kullanımı sırasında gelişen enfeksiyon seyrinin daha kötü olduğunu saptanmıştır.

Bu çalışmada serum paraoksonaz aktivitesinin sadece alkol kullanımına bağlı olarak belirgin olarak değişmediği bulunmuştur, ancak alkol kullanımının süresine bağlı olarak paraoksonaz aktivitesinin daha fazla etkilenebileceği düşünülmüştür. Alkolün tek başına konak yanıtı üzerindeki etkilerinin karmaşık olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde enfeksiyon, özellikle oluturduğu AHL sinyalleri aracılığıyla *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezi oldukça karmaşık süreçleri içermektedir. Son birkaç yılda PON enzimleri ve *P.aeruginosa* AHL sinyalleri üzerine yapılan sınırlı sayıda çalışmalar konanın bu bakteriye karşı savunma mekanizmalarını aydınlatmak açısından son derece önemlidir. Bu çalışmada alkol verilen ve enfeksiyon oluşturulan grupta aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da serum PON ve AE aktivitelerinde düşme saptanması genel olarak alkol ve enfeksiyonun serbest oksijen radikalleri aracılığıyla hasarı artırırken, antioksidan kapasitede azalmaya neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Alkol ve enfeksiyon varlığında PON enzim aktivitesindeki değişikliklerin farklı bölgelerde veya farklı bakteriler ile oluşturulmuş enfeksiyon modellerinde araştırılması bu alanı aydınlatması açısından yararlı olacaktır.

Bu çalışmada alkolün karaciğer hücrelerinde insitu hücre ölümünü arttırdığı enfeksiyon varlığında bu durumun daha da belirgin olduğunu bulunmuştur. Ancak akciğerde benzer bulgular görülmemiştir. Enfeksiyon varlığında karaciğerde insitu hücre ölümünde artış saptanırken kaspaz-3 aktivitesinde buna paralel olarak bir artış gözlenmemiş olması ilginç bulunmuştur. Bu bulgunun ileri çalışmalarla desteklenmesi, sorgulanmasının gerekli olduğunu düşünülmektedir.

Sonuç olarak alkol ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının birlikteli inde kona ın immün yanıtını, alkol ve enfeksiyon ili kisini sorgulayan ileri moleküler, *invivo* hayvan modelleri ve *invitro* hücre kültürü modelleri ile yapılacak yeni çalı maların yararlı olaca ı dü ünülmü tür.

7. KAYNAKLAR D Z N

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., 1997, Eds. Cellular and Molecular Immunology. USA: Saunders Company, 3-13 p.
2. Aldridge, W.N., 1953, Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination, *Biochem J*, 53, 1, 110-117 p.
3. Aldridge, W.N., 1953, Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera, *Biochem J*, 53, 1, 117-124 p.
4. Aldridge, W.N., Davison A.V., 1953, The mechanism of inhibition of colinesterases by organophosphorus compounds, *Biochem J*, 55, 1, 763-766 p.
5. Allen, L., Dockrell, D.H., Pattery, T., Lee, D.G., Cornelis, P., Hellewell, P.G., Whyte, M.K.B., 2005, Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo, *J Immunol*, 174, 3643–3649 p.
6. Ate ahin, A., Karahan, Ü., Pürüncü, Ü., 2004, Effects of Phenobarbital on Serum and Liver Paraoxonase and Arylesterase Activities in Rats, *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 363-367 p.
7. Aytacoglu, B.N., Calikoglu, M., Tamer, L., Co kun, B., Sucu, N., Köse, N., Aktas, S., Dikmengil, M., 2006, Alcohol-induced lung damage and increased oxidative stress, *Respiration*, 73, 1, 100-104 p.
8. Babacan, F., nfeksiyon hastalıklarının patogenezi ve immünopatolojisi In: Topçu Wilke A., Söyletir G., Do anay M., 1996, Eds. nfeksiyon hastalıkları. Ankara: Nobel Kitabevi, 37 s.
9. Bakker-Woudenberg IAJM., 2003, Experimental models of pulmonary infection. *J Microbiol Methods*, 54, 295-313 p
10. Baron, E.J., Peterson, L.R., Finegold, S.M., 1994, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9th ed. The Mosby Co, London, 386 p.
11. Ba kol, M., Ba kol, G., Deniz, K., Özbakır, Ö., Yücesoy, M., 2005, A new marker for lipid peroxidation: Serum paraoxonase activity in non-alcoholic steatohepatitis, *Turk J Gastroenterol*, 16, 119-123 p.
12. Bautista, A.P., 2002, Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis, *Alcohol*, 27, 17-21 p.
13. Bayrak, T., Bayrak, A., Demirpençe, E., Kılınc, K., 2005, Yeni bir kardiyovasküler belirteç aday: paraoknaz, *Hacettepe Tıp Derg*, 36, 147-151 s.
14. Beltowski J., Jamroz-Wi niewska, A., Borkowska, E., Wójcicka, G., 2005, Differential effect of antioxidant treatment on plasma and tissue paraoxonase activity in hyperleptinemic rats, *Pharmacol Res*, 51, 6, 523-532 p.
15. Boehm, O., Zur, B., Koch, A., Tran, N., Freyenhagen, R., Hartmann, M., Zacharowski, K., 2007, Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice, *Biol Chem*, 388, 5, 547-554 p.
16. Brown, L.A., Harris, F.L., Guidot, D.M., 2001, Chronic ethanol ingestion potentiates TNF- α -mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281, L377–L386 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

17. Brown, L.A., Harris, F.L., Ping, X.D., Gauthier, T.W., 2004, Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: a role for glutathione availability? *Alcohol*, 33, 3, 191-197 p.
18. Brown, L.A., Cook, R.T., Jerrells, T.R., Kolls, J.K., Nagy, L.E., Szabo, G., Wands, J.R., Kovacs, E.J., 2006, Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity, *Alcohol Clin Exp Res*, 30, 9, 1624-1631 p.
19. Bushma, M.I., Ambrushkevich, Y.G., Zimatkin, S.M., Bushma, K.M., Omel'yanchik, S.N., Slyshenkov, V.S., Mel'nichenko, N.G., Kuz'mich, A.B., El'chaninova, M.A., 2002, LPO and ethanol biotransformation systems in the liver as markers of predisposition to ethanol hepatotoxicity. *Bull Exp Biol Med*, 134, 6, 600-604 p.
20. Bykov, I., Junnikkala, S., Pekna, M., Lindros, K.O., Meri, S. 2006, Complement C3 contributes to ethanol-induced liver steatosis in mice, *Ann Med*, 38, 4, 280-286 p.
21. Bykov, I., Junnikkala, S., Pekna, M., Lindros, K.O., Meri, S., 2007, Effect of chronic ethanol consumption on the expression of complement components and acute-phase proteins in liver, *Clin Immunol*, 124, 2, 213-20 p.
22. Byrne, E.A., Calculations in clinical chemistry, In, Kaplan, L.A., Pesce, A.J., *Clinical Chemistry*, 1996, 4th ed The Mosby –Year Book, Inc 34-44 p.
23. Caballería, J., 2003, Current concepts in alcohol metabolism, *Ann Hepatol*, 2, 2, 60-68 p.
24. Camcio lu Y., mmün sisteme giri In Abbas, A. K ., Lichtman, A.H., Temel immünoloji , 2007 (Çev ed: Camcio lu Y, Deniz, G.,), stanbul Tip Kitapevi, stanbul, 1-20 s.
25. Cannon, C.L., Kowalski, M.P., Stopak, K.S., Pier, G.B., 2003, Pseudomonas aeruginosa–Induced Apoptosis Is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Am J Resp Cell Mol Biol*, 29, 188–197 p.
26. Castilla, R., González, R., Fouad, D., Fraga, E., Muntané, J., 2004, Dual effect of ethanol on cell death in primary culture of human and rat hepatocytes, *Alcohol and Alcoholism*, 39, 4, 290-296 p.
27. Chastre, J., Fagon, J.Y., 2002, Ventilator-associated pneumonia, *Am J Respir Crit Care Med*, 165, 7, 867-903 p.
28. Colantoni, A., Idilman, R., Maria, N., Paglia, N., Belmonte, J., Wezeman, F., Emanuele, N., Van Thiel, D.H., Kovacs, E.J., Emanuele, M.A., 2003, Hepatic apoptosis and proliferation in male and female rats fed alcohol : Role of cytokines, *Alcohol Clin Exp Res*, 27, 7, 1184-1189 p.
29. Coopersmith, C.M., Stromberg, P.E., Dunne, W.M., Davis, C.G., Amiot, D.M. 2nd, Buchman, T.G., Karl, I.E., Hotchkiss, R.S., 2002, Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis, *JAMA*, 287, 13, 1716-1721 p.
30. Costa, L.G., Cole, T.B., Furlong, C.E., 2005, Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine. *Acta Biomed*, 76, 2, 50-57 p.
31. Crew, F.T., Bechara, R., Brown, A.L., Guiodot, D.M., Mandrekar, P., Oak, S., Qin, L., Szabo, G., Wheeler, M., Zou, J., 2006, Cytokines and alcohol, *Alcohol Clin Exp Res*, 30, 4, 720-730 p.
32. Delden, C.V. and Iglewski, B.H., 1998, Cell-to-cell signalling and Pseudomonas aeruginosa infections, *Emerging Infect Diseases*, 4, 551-559 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

33. Dong, Y.H. and Zhang, L.H., 2005, Quorum sensing and quorum-quenching enzymes, *J Microbiol*, 43, 5, 101-109 p.
34. Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S., La Du, B.N., 2000, Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation, *J Biol Chem*, 275, 43, 33435-33442 p.
35. Draganov, D.I., La Du, B.N., 2004, Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369, 1, 78-88 p.
36. Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B.N., 2005, Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities, *J Lipid Res*, 46, 6, 1239-1247 p.
37. Draganov, D.I., Teiber, J.F., 2008, PONs' Natural Substrates – The Key for their Physiological Roles. In: *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism* (Mackness, B., Mackness, M., Aviram, M., Paragh, G., Eds.), Springer, The Netherland, 297-307 p.
38. Eckerson, H.W., Romson, J., Wyte, C., La Du, B.N., 1983, The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts, *Am J Hum Genet*, 35, 2, 214-227 p.
39. Ekmekçi, Ö.B., Donma, O., Ekmekçi, H., 2004, Paraoksonaz, *Cerrahpa a Tıp Derg*, 35, 78-82 s.
40. Erdem, B., Pseudomonas. In: Ustaçelebi, ., Mutlu, G., mir, T., Cengiz, A.T., Tümbay, E, Mete Ö, 1999, Eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güne Kitabevi, 551 s.
41. Erdo an, B.B. ve Uzaslan, E.K., 2003, Apoptoz mekanizmaları, *Akci er Ar ivi*, 4, 165-174 s.
42. Esfandiari, F., Villanueva, J.A., Wong, D.H., French, S.W., Halsted, C.H., 2005, Chronic ethanol feeding and folate deficiency activate hepatic endoplasmic reticulum stress pathway in micropigs, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289, 1, G54-63 p.
43. Fagon, J.Y., Chastre, J., Domart, Y., Trouillet, J.L., Gibert, C., 1996, Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush, *Clin Infect Dis*, 23, 3, 538-542 p.
44. Ferré, N., Camps, J., Cabré, M., Paul, A., Joven, J., 2001, Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis, *Metabolism*, 50, 9, 997-1000 p.
45. Ferré, N., Camps, J., Prats, E., Vilella, E., Paul, A., Figuera, L., Joven, J., 2002, Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage, *Clin Chem*, 48, 2, 261-268 p.
46. Finch, R.G., Pritchard, D.I., Bycroft, B.W., Williams, P., Stewart, G.S., 1998, Quorum sensing: a novel target for anti-infective therapy, *J Antimicrob Chemother*, 42, 5, 569-571 p.
47. Fisher, H., Halladay, A., Ramasubramaniam, N., Petrucci, J.C., Dagounis, D., Sekowski, A., Martin, J.V., Wagner, G.C., 2002, Liver fat and plasma ethanol are sharply lower in rats fed ethanol in conjunction with high carbohydrate compared with high fat diets, *J Nutr*, 132, 9, 2732-2736 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

48. Friedman, H., Newton, C., Klein, T.W., 2003, Microbial Infections, Immunomodulation, and drugs of abuse, *Clin Microbiol Rev*, 16, 209–219 p.
49. Furlong, C.E., 2008, Paraoxonases: An Historical Perspective 3, In. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism* (Mackness, B., Mackness, M., Aviram, M., Paragh, G., Eds.), Springer, The Netherland, 3-31 p.
50. Gamble, L., Mason, C.M., Nelson, S., 2006, The effects of alcohol on immunity and bacterial infection in the lung, *Med Mal Infect*, 36, 2, 72-77 p.
51. Gardiner, S.M., Chhabra, S.R., Harty, C., Williams, P., Pritchard, D.I., Bycroft, B.W., Bennett, T., 2001, Haemodynamic effects of the bacterial quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, in conscious, normal and endotoxaemic rats, *Br J Pharmacol*, 133, 7, 1047-1054 p.
52. Ghavami, S., Hashemi, M., Kadkhoda, K., Alavian, S.M., Bay, G.H., Los, M., 2005, Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications, *Med Sci Monit*, 11, 11, RA337-345 p.
53. Ghosh, P., Lakshman, M.R., 1997, Chronic ethanol induced impairment of hepatic glycosylation machinery in rat is independent of dietary carbohydrate, *Alcohol Clin Exp Res*, 21,1, 76-81
54. Grassmé, H., Jandrossek, V., Gulbins, E., 2001, Molecular mechanism of bacteria apoptosis, *Apoptosis*, 6, 441-445 p.
55. Grassmé, H., Jandrossek, V., Gulbins, E., 2001, Role of Apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia, *Science*, 294, 1783 p.
56. Greenberg, S.S., Zhao, X., Hua, L., Wang, J.F., Nelson, S., Ouyang, J., 1999, Ethanol inhibits lung clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by a neutrophil and nitric oxide-dependent mechanism, *in vivo*, *Alcohol Clin Exp Res*, 23,4,735-744 p.
57. Guidot, D.M. and Roman, J., 2002, Chronic ethanol ingestion increases susceptibility to acute lung injury: role of oxidative stress and tissue remodeling, *Chest*, 122, 6, 309S-314S p.
58. Gupta, S., Pandey, R., Katyal, R., Aggarwal, H.K., Aggarwal, R.P., Aggarwal, S.K., 2005, Lipid peroxide levels and antioxidant status in alcoholic liver disease, *Indian J Clin Biochem*, 20, 1, 67-71.
59. Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassmé, H., Lang, F., 2000, Physiology of apoptosis, *Am J Physiol Renal Physiol*, 279, 4, F605-15 p.
60. Gülcü, F. ve Gürsu, M.F., 2003, Paraoksonaz ve aril esteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu, *Türk Biyokimya Derg*, 28, 2, 45-49 s.
61. Gyamfi, M.A. and Wan, Y.J., 2006, The effect of ethanol, ethanol metabolizing enzyme inhibitors, and Vitamin E on regulating glutathione, glutathione S-transferase, and S-adenosylmethionine in mouse primary hepatocyte, *Hepato Res*, 35, 1, 53-61 p.
62. Hacker, G., Kirschnek, S., Fischer, S.F., 2006, Apoptosis in infectious disease: How bacteria interfere with the apoptotic apparatus, *Med Microbiol Immunol*, 195, 11-19 p.
63. Happel, K.I. and Nelson, S., 2005, Alcohol, immunosuppression, and the lung, *Proc Am Thorac Soc*, 2, 5, 428-432 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

64. Hauser, A.R. and Engel, J.N. 1999, *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells, *Infect Immun*, 67, 10, 5530-5537 p.
65. Hengartner, M.O., 2000, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 770-776 p.
66. Holguin, F., Moss, I., Brown, L.A., Guidot, D.M., 1998, Chronic ethanol ingestion impairs alveolar type II cell glutathione homeostasis and function and predisposes to endotoxin-mediated acute edematous lung injury in rats, *J Clin Invest*, 101, 4, 761-768 p.
67. Horke, S., Witte, I., Wilgenbus, P., Krüger, M., Strand, D., Förstermann, U., 2007, Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation, *Circulation*, 115, 15, 2055-2064 p.
68. Hotchkiss, R.S., Dunne, W.N., Swanson, P.E., Davis, C.G., Tinsley, K.W., Chang, K.C., 2001, Role of Apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia, *Science*, 294, 1783 p.
69. Ikatsu, H., Okino, T., Nakajima, T., 1991, Ethanol and food deprivation induced enhancement of hepatotoxicity in rats given carbon tetrachloride at low concentration, *Br J Ind Med*, 48, 9, 636-642 p.
70. İter, T. ve, Tekin, F., 2005, Alkol Metabolizması, *Güncel Gastroenteroloji*, 9, 58-62 s.
71. Ishii, H., Watanabe, Y., Okuno, F., Takagi, T., Munakata, Y., Miura, S., Shigeta, Y., Tsuchiya, M., 1988, Alcohol-induced enhancement of intestinal gamma-glutamyl transpeptidase activity in rats and humans: a possible role in increased serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 12, 1, 111-115 p.
72. Jansson, A.L., Yasmin, L., Warne, P., Downward, J., Palmer, R.H., Hallberg, B., 2006, Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is not able to induce apoptosis when cells express activated proteins, such as Ras or protein kinase B/Akt, *Cellular Microbiology*, 5, 815–822 p.
73. Jendrossek, V., Grassme, H., Mueller, I., Lang, F., Gulbins, E., 2001, *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Apoptosis Involves Mitochondria and Stress-Activated Protein Kinases, *Infect Immun*, 69, 2675–2683 p.
74. Kacira, T., Kemerdere, R., Atukeren, P., Hanimoglu, H., Sanus, G.Z., Kucur, M., Tanriverdi, T., Gumustas, K., Kaynar, M.Y., 2007, Detection of caspase-3, neuron specific enolase, and high-sensitivity C-reactive protein levels in both cerebrospinal fluid and serum of patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *Neurosurgery*, 60, 4, 674-679 p.
75. Kanbagli, O., Balkan, J., Aykaç-Toker, G., Uysal, M., 2002, Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats, *Biol Pharm Bull*, 25, 11, 1482-1484 p.
76. Kanbak, G., Akyüz, F., nal, M., 2001, Preventive effect of betaine on ethanol-induced membrane lipid composition and membrane ATPases, *Arch Toxicol*, 75, 59-61 p.
77. Kanbak, G., Inal, M., Bayçu, C., 2001, Ethanol-induced hepatotoxicity and protective effect of betaine, *Cell Biochem Funct*, 19, 4, 281-285 p.
78. Karayılanoglu, T., Demirci, D., Karayılanoglu, V., 1991, Kronik alkoliklerde bazı biyokimyasal parametrelerin degerlendirilmesi. *Biyokimya Derg*, 3, 51-56 s.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

79. Kessova, I.G., Ho, Y.S., Thung, S., Cederbaum, A.I., 2003, Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase, *Hepatology*, 38, 5, 1136-1145 p.
80. Kılıç, S.S., Aydın, S., Kılıç, N., Erman, F., Aydın, S., Celik, I., 2005, Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis, *World J Gastroenterol*, 11, 7351-7354 p.
81. Kılıçturgay, K., *immünoloji* 2000. 2. baskı Adilna Sanovel, 283-350 s
82. Kim, Y.D., Eom, S.Y., Ogawa, M., Oyama, T., Isse, T., Kang, J.W., Zhang, Y.W., Kawamoto, T., Kim, H., 2007, Ethanol-induced oxidative DNA damage and CYP2E1 expression in liver tissue of Aldh2 knockout mice, *J Occup Health*, 49, 5, 363-369 p.
83. Kinniry,P., Amrani, Y., Vachani, A., Solomides, C.C., Arguiri, E., Workman, A., Carter, J., Christofidou-Solomidou, M., 2006, Dietary flaxseed supplementation ameliorates inflammation and tissue damage in experimental models of acute lung injury in mice, *J Nutr*, 136, 1545-1551 p.
84. Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Voyich, J.M., Schwan, T.G., Musser, J.M., DeLeo, F.R., 2003, Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 19,10948-10953 p.
85. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., eds. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th Edition. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1997, 253 p.
86. Koteish, A., Yang, S., Lin, H., Huang, X., Diehl, A.M., 2002, Chronic ethanol exposure potentiates lipopolysaccharide liver injury despite inhibiting junN-terminal kinase and caspase 3 activation, *J Biol Chem*, 277,15, 13037-13044 p.
87. La Du, B.N., Adkins, S., Kuo, C.L., Lipsig, D., 1993, Studies on human serum paraoxonase/arylesterase, *Chem Biol Interact*, 87, 1-3, 25-34 p.
88. Lancelotti, M., Brocchi, M., da Silveira, W.D., 2006, Bacteria-induced apoptosis: An approach to bacterial pathogenesis, *Braz J Morphol Sci*, 23, 1, 75-86 p.
89. Le Bere, R., Faure, K., Fauvel, H., Viget, N.B., Ader, F., Prangère, T., Thomas, A.M., Leroy, X., Pittet, J.F., Marchetti, P., Guery, B.P., 2004, Apoptosis inhibition in *P. aeruginosa*-induced lung injury influences lung fluid balance, *Intensive Care Med*, 30,1204–1211 p.
90. Lesprit, P., Faurisson F., Join-Lambert, O., Roudot-Thoraval, F., Foglino, M., Vissuzaine, C., Carbon, C., 2003, Role of the quorum-sensing system in experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in rats, *Am J Respir Crit Care Med*, 167, 1478-1482 p.
91. Lieber, C.S., DeCarli, L.M., Sorrell, M.F., 1989, Experimental methods of ethanol administration, *Hepatology*, 10, 4, 501-510 p.
92. Lieber, C.S., 1993, Biochemical factors in alcoholic liver disease, *Semin Liver Dis*, 13, 2, 136-153 p.
93. Lieber, C.S., 2000, Alcohol and liver, *The Mount Sinai J Med*, 67, 84-94 p.
94. Lieber, C.S., 2001, Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001, *Pathol Biol (Paris)*, , 49, 9, 738-752 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

95. Lieber, C.S., 2003, Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease, *Alcohol Res Health*, 27, 3, 220-231 p.
96. Lieberman, M., Marks, A., Simith. C., Pathways of Sugar and Alcohol Metabolism: Fructose, Galactose, Pentose Phosphate Pathway, and Ethanol Metabolism, 2007, In: Marks' Essential Medical Biochemistry, 2nd Edition, Lieberman, M., Marks, A., Simith. C., Eds. Lippincott Williams & Wilkins, 341-359
97. Liu, D., Li, C., Chen, Y., Burnett, C., Liu, X.Y., Downs, S., Collins, R.D., Hawiger, J., 2004, Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide, *J Biol Chem*, 279, 46, 48434-48442 p.
98. Lorentz, K., Flatter, B., Augustin, E., 1979, Arylesterase in serum: elaboration and clinical application of a fixed-incubation method, *Clin Chem*, 25, 10, 1714-1720 p.
99. Lorentz, K., Wirtz, W., Weiss, T., 2001, Continuous monitoring of arylesterase in human serum, *Clin Chim Acta*, 308, 1-2, 69-78 p.
100. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 265-275 p.
101. Lu, Y., Wang, X., Cederbaum, A.I., 2005, Lipopolysaccharide-induced liver injury in rats treated with the CYP2E1 inducer pyrazole Am *J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 27, G308-G319 p.
102. Luan, J., Zhou, B., Ding, H., Qi, Z., 2007, Tolerance of mice to lipopolysaccharide is correlated with inhibition of caspase-3-mediated apoptosis in mouse liver cells, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39, 2, 96-100 p.
103. Marik, P.E., 2000, The clinical features of severe community-acquired pneumonia presenting as septic shock. Norasept II Study Investigators, *J Crit Care*, 15, 3, 85-90 p.
104. Marsillach, J., Ferré, N., Vila, M.C., Lligoña, A., Mackness, B., Mackness, M., Deulofeu, R., Solá, R., Parés, A., Pedro-Botet, J., Joven, J., Caballeria, J., Camps, J., 2007, Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: relationship with liver disease. *Clin Biochem*, 40, 9-10, 645-650 p.
105. Mathurin, P., Deng, Q.G., Keshavarzian, A., Choudhary, S., Holmes, E.W., Tsukamoto, H., 2000, Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 32, 1008-1017 p.
106. McKim, S.E., Gäbele, E., Isayama, F., Lambert, J.C., Tucker, L.M., Wheeler, M.D., Connor, H.D., Mason, R.P., Doll, M.A., Hein, D.W., Arteel, G.E., 2003, Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice, *Gastroenterology*, 125, 6, 1834-1844 p.
107. McVicker, B.L., Casey, C.A., 1999, Effects of ethanol on receptor-mediated endocytosis in the liver, *Alcohol*, 19, 3, 255-260 p.
108. McVicker, B.L., Tuma, D.J., Casey, C.A., 2007, Effect of ethanol on pro-apoptotic mechanisms in polarized hepatic cells, *World J Gastroenterol*, 13, 37, 4960-4966 p.
109. Meki, A.R., Esmail, Eel-D., Hussein, A.A., Hassanein, H.M., 2004, Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin, *Toxicol*, 43, 1, 93-100 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

110. Mittal,A., Phillips, A.R.J., Middleditch, M., Rugiero, K., Loveday, B., Delahunt, B., Cooper, G.J.S., Windsor, J.A., 2009, The proteome of mesenteric lymph during acute pancreatitis and implications for treatment, *J Pancreas(online)* 10,2,130-142 p.
111. Miyairi, S., Tateda, K, Fuse, E.T., Ueda, C., Saito, H., Takabatake, T., Ishii, Y., Horikawa, M., Ishiguro, M., Standiford, T.J., Yamaguchi, K., 2006, Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection, *J Med Microbiol*, 55, 10, 1381-1387 p.
112. Montet, A.M., Oliva, L., Beaugé, F., Montet, J.C., 2002, Bile salts modulate chronic ethanol-induced hepatotoxicity, *Alcohol Alcohol*, 37, 1, 25-29 p.
113. Morimoto, K., Amano, H., Sonoda, F., Baba, M., Senba, M., Yoshimine, H., Yamamoto, H., Ii, T., Oishi, K., Nagatake, T., 2001, Alveolar macrophages that phagocytose apoptotic neutrophils produce hepatocyte growth factor during bacterial pneumonia in mice, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24, 5, 608-615 p.
114. Moss, D.W. and Henderson, R., 2005, Enzymes, In: *Tietz textbook of clinical chemistry* (Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., Eds.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1994, 812-819 p.
115. Mueller, R.F., Hornung, S., Furlong, C.E., Anderson, J., Giblett, E.R., Motulsky, A.G., 1983, Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies, *Am J Hum Genet*, 35, 3, 393-408 p.
116. Navasumrit, P., Ward, T.H., Dodd, N.J.F., Connor, P.J.O., 2000, Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented invivo by antioxidants:effects of acute and chronic ethanol exposure, *Carcinogenesis*, 21, 93-99 p.
117. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979, Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem*, 95, 351-358 p.
118. Okutan, O., Solaroglu, I., Beskonakli, E., Taskin, Y., 2007, Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats, *J Clin Neurosci*, 14, 4, 364-368 p.
119. Oyinbo, C.A., Dare, W.N., Okogun, G.R.A., Anyanvu, L.C., Ibeabuchi, N.M., Noronha, C.C., Okanlawon, O.A., 2006, The Hepatoprotective Effect of Vitamin C and E on Hepatotoxicity. Induced by Ethanol in Sprague Dawley Rats, *Pakistan J Nutr*, 5, 6, 507-511 p.
120. Özcan, A. ve Mengi A., 1998, Ratlarda oral olarak verilen alkolün serum, karaci er ve böbrek GGT, ALT ve AST aktiviteleri ile serum total kolesterol ve lipid düzeylerine etkileri, *Tr J Vet Animal Sci*, 22, 181-185 p.
121. Özer, E.A., Pezzulo, A., Shih, D.M., Chun, C., Furlong, C., Lusic, A.J., Greenberg, E.P., Zabner, J., 2005, Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing, *FEMS Microbiol Lett*, 253, 1, 29-37 p.
122. Pawan, G.L., 1972, Metabolism of alcohol (ethanol) in man, *Proc Nutr Soc*, 31, 2, 83-89 p.
123. Piano, M.R., Arthwol, J., Kim, S.D.,Gass, G., 2001, The effect of liquid diet on nutritional status and fluid balance in rat , *Alcohol and Alcoholism*, 36, 4, 298-303 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

124. Polavarapu, R., Spitz, D.R., Sim, J.E., Follansbee, M.H., Oberley, L.W., Rahemtulla, A., Nanji, A.A., 1998, Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil, *Hepatology*, 27, 5, 1317-1323 p.
125. Pond, A.L., Chambers, H.W., Coyne, C.P., Chambers, J.E., 1998, Purification of two rat hepatic proteins with A-esterase activity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon, *J Pharmacol Exp Ther*, 286, 3, 1404-1411 p.
126. Ponnappa, B.C., Rubin, E., 2000, Modeling alcohol's effects on organs in animal models, *Alcohol Res Health*, 24, 2, 93-104 p.
127. Prakash, M., Shetty, J.K., Tripathy, S., Verma, M., Vasudev, S., Bhandary, P.V., 2007, Serum paraoxonase in alcohol abusers associated with alcoholic liver disease, *Clin Chim Acta*, 378, 1-2, 232-234 p.
128. Pritchard, D.I., 2006, Immune modulation by *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules, *Int J Med Microbiol*, 296, 2-3, 111-116 p.
129. Pulkkanen, K.J., Laukkanen, M.O., Naarala, J., Yla-Herttuala, S., 2000, False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay, *Apoptosis*, 5, 4, 329-333 p.
130. Rai, R.M., Lee, F.Y., Rosen, A., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Koteish, A., Liew, F.Y., Zaragoza, C., Lowenstein, C., Diehl, A.M., 1998, Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 23, 13829-13834 p.
131. Rajan, S., Cacalano, G., Bryan, R., Ratner, A.J., Sontich, C.U., van Heeckeren, A., Davis, P., Prince, A., 2000, *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23, 3, 304-312 p.
132. Ramaiah, S., Rivera, C., Arteel, G., 2004, Early-phase alcoholic liver disease: an update on animal models, pathology, and pathogenesis, *Int J Toxicol*, 23, 4, 217-231 p.
133. Rao, G.A., Sankaran, H., Larkin, E.C., 1988, Rat models for chronic alcohol consumption, *J Nutr*, 118, 6, 799-801 p.
134. Rao, G.A., Larkin, E.C., 1997, Nutritional factors required for alcoholic liver disease in rats, *J Nutr*, 127, 5, 896S-898S p.
135. Rao, M.N., Marmillot, P., Gong, M., Palmer, D.A., Seeff, L.B., Strader, D.B., Lakshman, M.R., 2003, Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans, *Metabolism*, 52, 10, 1287-1294 p.
136. Rezaiguia, S., Garat, C., Delclaux, C., Meignan, M., Fleury, J., Legrand, P., Matthay, M.A., Jayr, C., 1997, Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism, *J Clin Invest*, 99, 2, 325-335 p.
137. Reidelberger, R.D., Turna, D.J., Woltman, T.A., Donohue, T.M., 1996, Feeding patterns of rats chronically ingesting an ethanol-containing liquid diet, *Alcohol Clin Exp Res*, 20, 7, 1275-1282 P.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

138. Rodrigo R, Trujillo S, Bosco C, Orellana M, Thielemann L, Araya J., 2002, Changes in (Na + K)-adenosine triphosphatase activity and ultrastructure of lung and kidney associated with oxidative stress induced by acute ethanol intoxication, *Chest*, 121, 2, 589-596 p.
139. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M., 2003, Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Mar 1;23(3):468-74 p.
140. Rosman, A.S. and Lieber, C.S., 1994, Diagnostic utility of laboratory tests in alcoholic liver disease, *Clin Chem*, 40, 8, 1641-1651 p.
141. Rudin, C.M. and Thompson, C.B., 1997, Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death, *Annu Rev Med*, 48, 267-281 p.
142. Saavedra, M., Vasil, M., Randell, S., West, J., Romdan, D., 2002, *Pseudomonas aeruginosa*-Human airway epithelial cell interaction: Effects of iron on inflammation and apoptosis, *Chest*, 121, 40S-41 p.
143. Saeed, R.W., Varma, S., Peng, T., Tracey, J.K., Sherry, B., Metz, C.N., 2004, Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro, *J Immunology*, 173, 6376-6383 p.
144. Saitz, R., Ghali, W.A., Moskowitz, M.A., 1997, The impact of alcohol-related diagnoses on pneumonia outcomes, *Arch Intern Med*, 157, 13, 1446-1452 p.
145. Salaspuro, M., 1996, Bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications, *Ann Med*, 28, 3, 195-200 p.
146. Schreiber, T., Swanson, P.E., Chang, K.C., Davis, C.C., Dunne, W.M., Karl, I.E., Reinhart, K., Hotchkiss, R.S., 2006, Both gram-negative and gram-positive experimental pneumonia induce profound lymphocyte but not respiratory epithelial cell apoptosis, *Shock*, 26, 3, 271-276 p.
147. Seitz, H.K., Lieber, C.S., Stickel, F., Salaspuro, M., Schlemmer, H.P., Horie, Y., 2005, Alcoholic liver disease: from pathophysiology to therapy, *Alcohol Clin Exp Res*, 29, 7, 1276-1281 p.
148. Sepahvand, F., Shafiei, M., Ghaffari, S.M., Rahimi-Moghaddam, P., Mahmoudian, M., 2007, Paraoxonase phenotype distribution in a healthy Iranian population, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 101, 2, 104-107 p.
149. Sisson, J.H., 2007, Alcohol and airways function in health and disease, *Alcohol*, 41,5, 293-307 p
150. Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M., 2000, Apoptosis signaling, *Annu Rev Biochem*, 69, 217-245 p.
151. Stoltz, D.A., Ozer, E.A., Ng, C.J., Yu, J.M., Reddy, S.T., Lusic, A.J., Bourquard, N., Parsek, M.R., Zabner, J., Shih, D.M., 2007, Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292, 4, L852-860 p.
152. Stoltz D.A., Ozer E.A. Zabner, J., 2008, Paraoxonases, Quorum Sensing, and *Pseudomonas aeruginosa* In. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism* (Mackness, B., Mackness, M., Aviram, M., Paragh, G., Eds.), Springer, The Netherland, 307-321 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

153. Szabo, G., 1999, Consequences of alcohol consumption on host defence , *Alcohol and Alcoholism*, 34, 6, 830-841 p
154. ener, B., 2002, Kistik fibroziste mikrobiyal patogenez, *Hacettepe Tıp Derg*, 33, 49-57 s.
155. ener, G., Kabasakal, L., Yüksel, M., Gedik, N., Alican, Y., 2005, Hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats is prevented by Ginkgo biloba treatment. *World J Gastroenterol.* ,11, 35, 5444-5449 p.
156. Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J.C., Standiford, T.J., Ishiguro, M., Yamaguchi, K., 2003, The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils, *Infect Immun*, 71, 10, 5785-5793 p.
157. Teiber, J.F., Horke, S., Haines, D.C., Chowdhary, P.K., Xiao, J., Kramer, G.L., Haley, R.W., Draganov, D.I., 2008, Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, *Infect Immun*, 76, 6, 2512-2519 p.
158. Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G., Bycroft, B.W., Pritchard, D.I., 1998, The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserine lactone has immunomodulatory activity, *Infect Immun*, 66,1,36-42 p
159. Tsukamoto, H., Horne, W., Kamimura, S., Niemelä, O., Parkkila, S., Ylä-Herttua, S., Brittenham, G.M., 1995, Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron, *J Clin Invest*, 96, 1, 620-630 p.
160. Usher, L.R., Lawson, R.A., Geary, I., Taylor, C.J., Bingle, C.D., Taylor, G.W., Whyte, M.K.B., 2002, Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: A potential mechanism of persistent infection, *J Immunol*, 168, 1861–1868 p.
161. Uzun, H., Simsek, G., Aydin, S., Unal, E., Karter, Y., Yelmen, NK., Vehid, S., Curgunlu, A., Kaya, S., 2005, Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stres, *World J Gastroenterol*, 11, 4, 600-604 p.
162. Vasdev, S., Gill, V., Singal, P.K., 2006, Beneficial effect of low ethanol intake on the cardiovascular system: possible biochemical mechanisms, *Vasc Health Risk Manag*, 2, 3, 263-276 p.
163. Wang, Y.L., Hu, R., Lugea, A., Gukovsky, I., Smoot, D., Gukovskaya, A.S., Pandol, S.J., 2006, Ethanol feeding alters death signaling in the pancreas, *Pancreas*, 32, 351-359 p.
164. Watzl, B. and Watson, R.R., 1993, Role of nutrients in alcohol-induced immunomodulation, *Alcohol Alcohol*, 28, 1, 89-95.
165. Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 1999, The induction of apoptosis by bacterial pathogens, *Annu Rev Microbiol*, 53, 155-187.
166. Wheeler, M.D., Nakagami, M., Bradford, B.U., Uesugi, T., Mason, R.P., Connor, H.D., Dikalova, A., Kadiiska, M., Thurman, R.G., 2001, Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat, *J Biol Chem*, 276, 39, 36664-36672 p.

KAYNAKLAR D Z N (Devam ediyor)

167. Wheeler, M.D., Kono, H., Yin, M., Rusyn, I., Froh, M., Connor, H.D., Mason, R.P., Samulski, R.J., Thurman, R.G., 2001, Delivery of the Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats, *Gastroenterology*, 120, 5, 1241-1250 p.
168. Yacobi, K., Wojtowicz, A., Tsafirri, A., Gross, A., 2004, Gonadotropins enhance caspase-3 and 7 activity and apoptosis in theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture, *Endocrinology*, 145,4, 1943-1951 p
169. Yalçinkaya, S., Ünlügerçi, Y., Uysal, M., 2007, Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats, *Exp Toxicol Pathol*, 58, 6, 455-459 p.
170. Yamada, S., Wilson, J.S., Lieber, C.S., 1985, The effects of ethanol and diet on hepatic and serum gamma-glutamyltranspeptidase activities in rats, *J Nutr*, 115, 10, 1285-1290 p.
171. Yang, S.Q., Lin, H.Z., Yin, M., Albrecht, J.H., Diehl, A.M., 1998, Effects of chronic ethanol consumption on cytokine regulation of liver regeneration, *Am J Physiol*, 275, G696-G704 p.
172. Yang, S.S., Huang, C.C., Chen, J.R., Chiu, C.L., Shieh, M.J., Lin, S.J., Yang, S.C., 2005, Effects of ethanol on antioxidant capacity in isolated rat hepatocytes. *World J Gastroenterol*, 14, 11, 46, 7272-7276 p.
173. Yuan, G.J., Zhou, X.R., Gong, Z.J., Zhang, P., Sun, X.M., Zheng, S.H., 2006, Expression and activity of inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase correlate with ethanol-induced liver injury, *World J Gastroenterol*, 12, 15, 2375-2381 p.
174. Zhang, P., Bagby, G.J., Happel, K.I., Raasch, C.E., Steve Nelson, S., 2008, Alcohol Abuse, Immunosuppression, and Pulmonary Infection, *Current Drug Abuse Reviews*, 1, 56-67
175. Zech, R. ve Chemnitz J.M., 2002, PON1 in different species, In. *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects* (Costa., L.G., ve Furlong., C. E., Eds.), Springer, The Netherland, 137-163 p.
176. Zhao, M., Laissue, J.A., Zimmermann, A., 1997, TUNEL-positive hepatocytes in alcoholic liver disease. A retrospective biopsy study using DNA nick end-labelling, *Virchows Arch*, 431, 5, 337-344 p.
177. Zhou, Z., Sun, X., Kang, Y.J., 2001, Ethanol-Induced Apoptosis in mouse liver Fas- and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway, *Am J Pathol*, 159, 329-338 p.

EK 1: Etik kurulu onayı

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

SAYI :2007/026
KONU :Çalışma Başvurusu

06.04.2007


Sayın;
Yrd.Doç.Dr. Melek DEMİR
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İLGİ : 20.03.2007 tarihli dilekçeniz.

İlgide başvurduğunuz "Kronik Alkol Tüketen Ratlarda Pseudomonas Aeruginosa İle İndümlenmiş Pnömoni Modelinde Biyokimyasal Hücresel Hasar Göstergeleri ve İn-situ Hücre Ölümü" konulu, PAUDHEK-2007.16 kodlu çalışmanız 04.04.2007 tarih ve 04 sayılı kurul toplantınızda görüşülmüş olup,

Çalışmanın deney hayvanları etiği açısından uygun olduğu, toplam 50 adet sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi

Gereğini bilgilerinize rica ederim.


Yrd. Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY
Başkan

ÖZGEÇM

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: MELEK DEMİR

Doğum Tarihi ve yeri: 01.10.1963- Divriği

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Evli

İletişim Adresleri:

: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Kınıklı/DENİZLİ

Ev: Siteler Mh. Barboros cad. Yenibahçelievler sitesi C1 Blok No: 3 Kınıklı /DENİZLİ

e-mail: mdemir@pau.edu.tr

Eğitim Durumu

1970-1975 Mersin Barboros ilkokulu

1975-1978 Mersin Bahçelievler Ortaokulu

1978-1981 Mersin Dumlupınar Lisesi

1981-1987 Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

1997-2001 Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Uzmanlık
Eğitimi.

Yabancı Dili: İngilizce

Mesleki Deneyim

1987-1989 Nevşehir Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Merkezinde Şube Müdürlüğü ve
tabibi olarak zorunlu hizmet

1989-1990 Sivas Şehir Hastanesi Sağlık Ocağı tabipliği

1990-1993 Mersin Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Eğitim ve Uygulama Merkezi
tabipliği

1993-1997 Eskişehir Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Eğitim ve Uygulama Merkezi
tabipliği ve Rahim içi araç eğitim programı editöresi

1997-2001 Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma
Görevlisi

2001-2009 Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Öğretim
Üyesi

Üye olunan Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği

Ankara Mikrobiyoloji Derneği

Viral Hepatit Savaşım Derneği

Türk Tabipleri Birliği

Yayımlar (Seçilmiş)

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Cevahir, N., **M. Demir**, . Kaleli, M. Gürbüz, S. Tikveşli, “ Evaluation of biofilm production, gelatinase activity and mannose-resistant haemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains J Microbiol Immunol Infect 41(6):518-8 (2008)
2. **Demir, M.**, N. Cevahir, . Kaleli, U. Yıldırım, R. Şahin ve E. Tepeli Çevik, “Alt Solunum Yolu Örnekleri ve Solunum Yolu Dışı Örneklerden Soyutlanmış *Pseudomonas aeruginosa* Suşularında Siderofor, Total Matriks Proteaz ve Elastaz Aktivitesinin Araştırılması” *Mikrobiyoloji Bülteni* 42(2), 197-208 (2008)
3. **Demir, M.**, . Kaleli, S. Demir, S. Sert, N. Cevahir, U. Yıldırım ve B. Şahin, “Liver Lipid Peroxidation in Experimental *Escherichia coli* Peritonitis: The Role of Myeloperoxidase and Nitric Oxide Inhibition”, *Med Sci Monit*, 13(10), BR225-229 (2007).
4. Kaleli, ., N. Cevahir, **M. Demir**, U. Yıldırım ve R. Şahin, “Anticandidal Activity Of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Isolated From Clinical Specimens”. *Mycoses*, 50(1), 74-78 (2007).

5. Kaleli, ., **M. Demir**, N. Cevahir, M. Yılmaz ve S. Demir, “Serum Neopterin Levels in Patients with Replicative and Nonreplicative HBV Carriers”, *BMC Infect Dis*, 6, 157 (2006).
6. Özşahin, A., **M. Demir**, M. Zencir, S. Demir ve . Kaleli, “Safety Awareness Among Laboratory Workers”, *Advances in Therapy*, 23, 414-420 (2006).
7. Özcan, V.A., **M. Demir**, G. Önem, . Göksin, A. Baltalarlı, V.K. Topkara ve . Kaleli, “Topical Versus Systemic Vancomycin for Deep Sternal Wound Infection Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in A Rodent Experimental Model.”, *Texas Heart Institute Journal*, 33, 107-110 (2006).
8. Kaleli, I., B. Kaleli, **M. Demir**, B. Yıldırım, N. Cevahir, ve S. Demir, “Serum Levels of Neopterin and Interleukin-2 Receptor in Women with Severe Preeclampsia” *J Clin Lab Anal*, 19, 36-39 (2005).
9. **Demir, M.** ve . Kaleli, “Production by Escherichia coli Isolates of Siderophore and Other Virulence Factors and Their Pathogenic Role in a Cutaneous Infection Model”, *Clin Microbiol Infect*, 10, 1011-1014 (2004).
10. Yılmaz, M., C.O. Kara, . Kaleli, **M. Demir**, F. Tümkaya, A.S. Buke ve B. Topuz, “Are Tonsils a Reservoir for Helicobacter Pylori Infection in Children?” *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 68(3), 307-10 (2004).

Ulusal dergilerde yayımlanan makaleler (Seçilmi)

1. **Demir, M.**, N. Cevahir ve . Kaleli, “Siprofloksasinin Subminimal İnhibitör Konsantrasyonlarının Escherichia coli Su larının Hemaglutinasyon Özellikleri Üzerine Etkisinin Ara tırılması”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Derg* 37(4):192-195 (2007)
2. **Demir, M.**, N. Cevahir, . Kaleli, S. Tikve li ve E. Mete, “Pre-inkübasyon Süresi Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii Türlerinin Otomatize Bactec 9120 Kan Kültür Sisteminde Saptanmasını Etkiliyor mu?” *Mikrobiyol Bült* 40, 207-213 (2006).
3. **Demir, M.**, N. Cevahir, . Kaleli, M. Gürbüz ve S. Tikve li, “Acinetobacter baumannii Su larında Siderofor Ve Proteaz Aktivitesinin Ara tırılması”, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 36, 83-87 (2006).
4. **Demir, M.**, . Kaleli, N. Cevahir ve E. Mete, “ ki Yıllık Kan Kültür Sonuçlarının De erlendirilmesi”, *nfeksiyon Dergisi*, 17(3):297-300 (2003).
5. **Demir, M.**, N. Cevahir, . Kaleli ve M. Zencir, “ drar Örneklerinin Piyüri, Bakteriüri ve Kültür Yönünden De erlendirmesi”, *nfeksiyon Dergisi*, 15, 505-508 (2001).

Katılmıllan kurslar ve E itim (Seçilmi)

1. 1st Turkish- US Flow Cytometry Workshop 25-28- October 2007, Istanbul University
istanbul
2. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu. 3-7 Eylül 2007, nonü Üniversitesi
Turgut Özal Tıp Merkezi, Malatya
3. TR5 Laboratuvarların laboratuvarlar Arası Kar ıla tırmaların ve Yeterlilik Testlerinin
Kullanımı. EU MEDA Programme Proficiency Testing and inter laboratory Comparisons.
16 ubat -2007, Denizli
4. ISO 17025 Deney ve Kalibrasyon laboratuvarlarının yeterlili i için genel artlar. 12-14
Mart , 2007, Expertise Centre EU MEDA Programme. Denizli
5. Deney Hayvanı Kullanımı. Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu 2007,
Denizli
6. Moleküler Biyoloji ve Yönlendirilmi Mutageniz Uygulamaları E itimi Kursu 20-24
Haziran 2005, TÜB TAK-MAM, Gebze
7. E itim Becerileri Geli tirme Kursu. Cerrahpa a Tıp Fakültesi 14-16 Temmuz 2004.
istanbul
8. IV. Temel mmünoloji Kursu. 5-8 Mayıs 2002 Pamukkale Denizli
9. Klinik E itiminde Yeti tiricilik Kursu. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi. 24-25 Ocak
2002. Denizli
10. Probleme Dayalı Ö renim Kursu. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi. 12-19 Nisan
2002. Denizli
11. Rekombinant Antikor Üretiminde Phage Display Teknolojisi Uygulamalı ve Teorik
E itim Kursu. Tübitak Gen Mühendisli i ve Biyoteknoloji Ara tırma Enstitüsü. 8-12
Ekim 2001, Gebze.
12. Tıbbi Etik ve Hasta Hekim li kileri Kursu 16 Mayıs 2001, Denizli
13. Experimental Research Workshop 18-20 May 2000, Kayseri
14. nfeksiyon Hastalıklarında Moleküler Yöntemlerin Kullanımı Kursu
(Kuramsal+uygulamalı) 21-25 Eylül 1998, istanbul