



T. C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PİNEALEKTOMİZE EDİLMİŞ SEPTİK SIÇANLARDA
KARACİĞER VE BÖBREK TNF- α , IL-6, IL-10 VE IL-1 β GEN
EKSPRESYONU VE PLAZMA DÜZEYLERİNDEKİ
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Aysun ÖZTÜRK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Metehan UZUN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE 2017



T. C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PİNEALEKTOMİZE EDİLMİŞ SEPTİK SIÇANLARDA
KARACİĞER VE BÖBREK TNF- α , IL-6, IL-10 VE IL-1 β GEN
EKSPRESYONU VE PLAZMA DÜZEYLERİNDEKİ
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan
Aysun ÖZTÜRK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Metehan UZUN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE 2017

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2014-196 sayılı karar ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü
Program Adı : Fizyoloji
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()
Anabilim Dalı : Fizyoloji
Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Aysun ÖZTÜRK
Tez Başlığı : Pinealektomize edilmiş septik sıçanlarda karaciğer ve böbrek
TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β gen ekspresyonu ve plazma düzeylerindeki değişimlerin
araştırılması
Sınav Yeri : Tıp Fakültesi
Sınav Tarihi : 25.01.2017

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Metehan UZUN	ÇOMÜ Tıp Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)		
Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU	ÇOMÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY	PAMUKKALE ÜNİV. Tıp Fakültesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name : Physiology

Programme Level : Master of Science (X) Doctor of Philosophy ()

Department : Physiology

Student Name and Surname: Aysun ÖZTÜRK

Title of the Thesis : The investigation of liver and kidney TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-1 β gene expression and blood levels in pinealectomised septic rats

Examination Place : Faculty of Medicine

Examination Date : 25.01.2017

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science of Philosophy Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Prof. Dr. Metehan UZUN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	
Members of Examination Jury (Titles and Names)		
Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	
Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY	Pamukkale Üniversitesi	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated and numbered

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlamasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8’de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih: 25.01.2017

Tez Sahibi Adı Soyadı: Aysun ÖZTÜRK

İmza:



ÖZET

Sepsis artan morbitide ve mortalitesi nedeni ile dikkat çeken bir hastalıktır. Melatonin ise pineal bezden salgılanan bir hormon olup, immün işlevler üzerine etki ettiğine dair bilgiler bulunmaktadır. Bu çalışma ile pinealektomi (PLT) yapılan sıçanlarda sepsise karşı oluşan cevabın değişip değişmediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda toplam 54 sıçandan SHAM, PLT-CLP ve SHAM PLT-CLP olmak üzere üç farklı grup oluşturulmuştur. PLT-CLP grubuna hem pinealektomi operasyonu (PLT) yapılmış hem de çekumun delinmesi ile (CLP) sepsis modeli oluşturulmuştur. Her gruptan 0. saat ile sepsis sonrası 12. ve 24. saatlerde rastgele 6 sıçan seçilerek kan TNF- α , IL-10, IL-6 ve IL-1 β düzeyleri ölçülmüş ve aynı parametrelerin karaciğer ve böbrek gen ekspresyonları düzeyleri belirlenmiştir.

PLT-CLP grubunda 0. saat değerleri ile kıyaslandığında, 12. saate TNF- α , 12. ve 24. saatlerde IL-1 β ve IL-6 seviyelerinde anlamlı artışlar, 24. saat IL-10 düzeyinde ise azalma belirlenmiştir ($p<0.01$). SHAM PLT-CLP grubunda ise TNF- α değerlerinde 24. saatte, IL-1 β düzeyinde 12. ve 24. saatlerde anlamlı artışlar kaydedilmiştir ($p<0.05$). Karaciğer TNF- α gen ekspresyonu değerleri sadece PLT-CLP grubunda, IL-10 değerleri ise SHAM PLT-CLP grubunda değişiklik göstermiştir.

Sonuç olarak pinealektomi operasyonunun sepsis tablosunun daha erken ortaya çıkmasına yol açabileceği ve bu durumun azalan melatonin seviyeleri ile ilişkili olabileceği kanaatine varılmış olup, özellikle sepsis gelişme ihtimali olan hastaların buldukları ortamın ışık yoğunluğu ve ışığa maruz kaldıkları sürelerin gözden geçirilmesi ve bu konuda daha dikkatli olunması gerektiği önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, sepsis, sitokinler, CLP.

ABSTRACT

The investigation of liver and kidney TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-1 β gene expression and blood levels in pinealectomised septic rats

Sepsis is a remarkable disease due to its cause of increased morbidity and mortality. Melatonin is a hormone that is secreted from the pineal gland and it plays a role on immunological functions. This study aimed to investigate whether the response to sepsis in rats with pinealectomy (PLT) is changed.

For this purpose, a total of 54 rats consisting three different groups named SHAM, PLT-CLP and SHAM PLT-CLP were used. Blood TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 levels were measured at 0th, 12th and 24th hours from randomly selected six rats of each group and liver and kidney gene expression levels of these cytokines were determined.

The significant blood levels elevation was observed in TNF- α at 12th hours, IL-1 β and IL-6 at 12th and 24th hours, but decreasing in IL-10 levels at 24th in PLT-CLP group ($p < 0.01$). However, the increasing TNF- α levels at 24th hours and IL-1 β levels at 12th and 24th hours were obtained in SHAM PLT-CLP group ($p < 0.05$). The significant changes of liver TNF- α gene expression level in PLT-CLP group and IL-10 level in SHAM PLT-CLP group were determined.

As a conclusion, it is thought that clinic of sepsis may appear earlier in cases of melatonin deficiency. Therefore, the light intensity in the environment and its duration of exposure on the patients possibly developing sepsis should be considered.

Key words: Melatonin, sepsis, cytokine, CLP.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her alanda ilgi ve desteğini gördüğüm, tezimin hazırlanmasında, deneysel çalışmam süresince hep yardımcı olan, akademik ve insani yönüyle takdir ettiğim danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Metehan UZUN' a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkı sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU' na teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışması süresince beni bir an bile yalnız bırakmayan, yüksek lisansın bana kazandırdığı en güzel hediye, canım arkadaşım, kardeşim Hanife BÜLBÜL' e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Mehmet Akif OVALI, Hayrunnisa YILDIRIM ve Ufuk DEMİR' e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmam süresinde yardımlarını esirgemeyen Vet. Hekim Sait ELMAS'a teşekkür ederim.

Tezimin biyokimyasal analizlerin yapılmasında rehberlik eden değerli hocam Biyokimya A. D. Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hakan TÜRKON' a teşekkür ederim.

Tezimin genetik analizleri aşamasında katkı sağlayan sayın hocam Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Rahime Özlem ÖZTOPUZ' a teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel analizlerinin yapılmasında rehberlik eden sayın hocam Prof. Dr. Akın PALA' ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden manevi desteğini esirgemeyen, bana her zaman destek olan eşim Murat ÖZTÜRK' e teşekkür ederim.

Canım oğlum Ali Mete ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2014-196 sayılı karar ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ ONAY FORMU	II
THESIS APROVAL FORM	III
BEYAN	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
SİMGE VE KISALTMALAR	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
TABLOLAR LİSTESİ	XIV
RESİMLER LİSTESİ	XVI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pineal Bez ve Melatonin	3
2.1.1. Pineal Bez	3
2.1.2. Melatonin	4
2.1.3. Melatonin Sentezi	5
2.1.4. Melatoninin Etki Mekanizması	6
2.1.5. Melatonin Salınımı	7
2.1.6. Melatonin Reseptörleri	8
2.1.7. Melatoninin Yıkımı	9
2.1.8. Melatoninin Fizyolojik Etkileri	9
2.1.9. Melatonin ve İmmün Sistem	10
2.2. Sepsis	11
2.2.1. Deneysel Sepsis Modelleri	12
2.2.1.1. Çekum Bağlama ve Delme Modeli	12
2.2.1.2. Lipopolisakkarid Verilerek Oluşturulan Septik Şok Modelleri	13
2.2.1.3. Damar veya Periton İçine Canlı Bakteri Uygulanması	14
2.2.2. Sepsis ve Karaciğer	14

2.2.3. Sepsis ve Böbrek	15
2.3. Sitokinler	17
2.3.1. Tümör Nekroz Faktör- α	19
2.3.2. İnterlökin-6	21
2.3.3. İnterlökin 1- β	22
2.3.4. İnterlökin-10	23
2.3.5. Melatonin ve Sitokinler	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Deney Hayvanları ve Deney Ortamı	26
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	26
3.3. Anestezi Yapılması	27
3.4. Pinealektomi Operasyonunun Yapılması	28
3.5. Çekal Bağlama ve Delme Operasyonunun Yapılması	28
3.6. Kan Örneklerinin Alınması	29
3.7. Doku Örneklerinin Alınması	30
3.8. Biyokimyasal Analizler	30
3.8.1. Plazma TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi	30
3.8.2. Plazma IL-1 β Düzeylerinin Belirlenmesi	31
3.8.3. Plazma IL-6 Düzeylerinin Belirlenmesi	32
3.8.4. Plazma IL-10 Düzeylerinin Belirlenmesi	33
3.9. Genetik Analizler	34
3.9.1. Total RNA İzolasyonu	34
3.9.2. cDNA Eldesi	35
3.9.3. Primer Dizeleri	36
3.9.4. Real Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması	38
3.10. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1. Plazmada Belirlenen Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimler	40
4.1.1. Kan TNF- α Düzeylerindeki Değişimler	40
4.1.2. Kan IL-1 β Düzeylerindeki Değişimler	42
4.1.3. Kan IL-6 Düzeylerindeki Değişimler	44
4.1.4. Kan IL-10 Düzeylerindeki Değişimler	45

4.2. Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	47
4.2.1. Karaciğer Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	47
4.2.1.1. Karaciğer TNF- α Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	47
4.2.1.2. Karaciğer IL-1 β Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	48
4.2.1.3. Karaciğer IL-6 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	50
4.2.1.4. Karaciğer IL-10 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	52
4.2.2. Böbrek Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	53
4.2.2.1. Böbrek TNF- α Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	53
4.2.2.2. Böbrek IL-1 β Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	55
4.2.2.3. Böbrek IL-6 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	56
4.2.2.4. Böbrek IL-10 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	68
EK-1 Etik Kurul Onay Formu	81
EK-2 Özgeçmiş	82
EK-3 Spiralli Tez Kontrol Formu	83
EK-4 Spiralli Tez Yazım Listesi	84

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AKI:	Akut Böbrek Hasarı
cAMP:	Adenozin Mono Fosfat
CLP:	Çekal Bağlama ve Delme
cGMP:	Guanizin Mono Fosfat
G:	Gauge
GABA:	Gamma amino bütirik asid
GnRH:	Büyüme Hormonu
IFN γ :	İnterferon alfa
IgA:	İmmunglobülin A
IL:	İnterlökin
IL-6:	İnterlökin 6
IL-1 β :	İnterlökin 1 Beta
IL-10:	İnterlökin 10
kDa:	Kilodalton
LBP:	Lipopolisakkarit Bağlayan Protein
LPS:	Lipopolisakkarit
MCP-1:	Monosit Kemoçekici Protein
mg/kg:	Miligram/kilogram
ml/dk/g:	Mililitre/dakika/gram
NAT:	N-asetiltransferaz
NK:	Doğal Öldürücü Hücreler
OH:	Hidroksil
ONOO:	Peroksinitril
PAF:	Platelet Aktive Edici Faktör
pg/ml:	Pikogram/ mililitre
PLT:	Pinealektomi
SCN:	Suprakiyazmik Nükleus
SIRS:	Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu
SKB:	Sistemik Kan Basıncı
TNF- α :	Tümör Nekroz Faktör Alfa

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Melatonin döngüsü	4
Şekil 2. Melatonin sentez şeması	6
Şekil 3. Karaciğer ve sepsis ilişkisi	15
Şekil 4. Sepsis ve sepsis ilişkili akut böbrek hasarı patofizyolojisinde anahtar patojenik yollar	16
Şekil 5. Tümör nekroz faktörleri	20
Şekil 6. Plazma TNF- α düzeylerinin gruplararası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	42
Şekil 7. Plazma IL-1 β düzeylerinin gruplararası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	43
Şekil 8. Plazma IL-6 düzeylerinin gruplararası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	45
Şekil 9. Plazma IL-10 düzeylerinin gruplararası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	46
Şekil 10. Karaciğer TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	48
Şekil 11. Karaciğer IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	49
Şekil 12. Karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	51
Şekil 13. Karaciğer IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	53
Şekil 14. Böbrek TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	54
Şekil 15. Böbrek IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	55
Şekil 16. Böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi	57

Şekil 17. Böbrek IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi

58



TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Bazı sitokinler, kökenleri ve işlevleri	18
Tablo 2. cDNA Sentezi Protokolü	35
Tablo 3. PCR Koşulları	35
Tablo 4. Ekspresyon Seviyeleri Bakılan Genlere Ait Primer Dizileri	37
Tablo 5. Real Time PCR Malzeme Miktarları	38
Tablo 6. qRT-PCR Sentez Basamak Ayarları	38
Tablo 7. Tüm gruplarda plazma TNF- α düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişikliklerin grup içinde karşılaştırılması	41
Tablo 8. Tüm gruplarda plazma IL-1 β düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişikliklerin grup içinde karşılaştırılması	43
Tablo 9. Tüm gruplarda plazma IL-6 düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişikliklerin grup içinde karşılaştırılması	44
Tablo 10. Tüm gruplarda plazma IL-10 düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişikliklerin grup içinde karşılaştırılması	46
Tablo 11. Tüm gruplara ait karaciğer TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması	47
Tablo 12. Tüm gruplara ait karaciğer IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması	49
Tablo 13. Tüm gruplara ait karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması	50
Tablo 14. Tüm gruplara ait karaciğer IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması	52
Tablo 15. Tüm gruplara ait böbrek TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması	54
Tablo 16. Tüm gruplara ait böbrek IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması	55

Tablo 17. Tüm gruplara ait böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması	56
Tablo 18. Tüm gruplara ait böbrek IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması	57



RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 1. Çekal Bağlama ve Delme Operasyonunun Yapılması	29
Resim 2. Kalpten Kan Alma İşlemi	29



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Melatonin, epifiz bezi olarak da adlandırılan pineal bezden salgılanan (N-acetyl-5-methoxytryptamine) bir hormon olup aydınlık ve karanlık döngüsünü ve sirkadiyen ritmi ayarlayan önemli moleküllerden bir tanesi olarak kabul edilir. Melatonin birçok fizyolojik ritim ve nöroendokrin süreçler için arabirim olarak görev yapmasının yanısıra yağ ve kas hücrelerinden glukoz alımı ve bu hücrelerden leptin salgılanması üzerine de etki gösterir (Ferreia ve ark., 2012).

Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda sirkadiyen ritmin bozulduğu ve melatonin salgısının azaldığı bildirilmektedir (Mundigler ve ark., 2002). Bu hastaların aynı zamanda sepsise karşı duyarlılığının diğer insanlara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (Angus DC ve ark., 2001). Duyarlılık artışının bir nedeninin melatonin yoksunluğuna bağlı geliştiği iddia edilse de mekanizmayı ortaya koyacak araştırmalar yetersizdir. Bu nedenle melatonin yoksunluğu durumlarında sepsis gelişiminin incelenmesi ve ilgili bazı sitokinlerin düzeylerindeki değişimlerin araştırılması önem arz etmektedir.

Melatoninin etkilerini araştırmak için en çok başvurulan yöntemlerden bir tanesi melatonin yoksunluğu oluşturmaktır. Sıçanlarda melatonin yoksunluğu oluşturmak için deneysel olarak uygulanmakta olan iki farklı yöntem bulunmaktadır. Bunlar; sürekli ışığa maruziyet veya pineal bezin çıkarılması (pinealektomi, PLT) operasyonudur. Her iki yöntem de pineal bezin melatonin salgısını yok etme özelliğine sahip olmanın yanı sıra fizyolojik ve hemodinamik parametrelerde benzer değişikliklere sebebiyet vermektedir (Simko ve ark., 2013).

Sepsis, enfeksiyona karşı verilen sistematik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Sepsis yüksek mortalite, morbidite ve tedavi maliyetleri ile ciddi bir sağlık sorunudur (Olguner ve ark., 2013). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde son yıllarda sepsise bağlı ölümler dikkat çekici boyutlardadır. Bu nedenle sepsis tedavisi veya sepsise karşı organizmanın savunma gücünü arttırıcı yöntemlerin geliştirilmesi ve sepsisten korunma ve tedavi açısından yeni yaklaşımların ortaya konulması gerekmektedir. Bu amaçla deney hayvanları üzerinde birçok araştırma yürütülmektedir.

Deney hayvanlarında sepsis modeli olarak en fazla kullanılan yöntemlerden bir tanesi ise çekal bağlama ve delme (CLP) yöntemidir. Bu yöntem ile bağırsakta yaşayan bakterilerin karın boşluğuna bulaştırılması ve oluşan enfeksiyona karşı vücudun verdiği yangısel yanıtların belirlenmesi hedeflenmektedir (Dejager ve ark., 2011). Bu işlem sonrası oluşan sitokin yanıt üzerine bir çok farklı parametrenin etkisi araştırılarak sepsisin iyileştirilmesi veya daha az patolojik sonuçlarla atlatılması yönünde oldukça fazla sayıda araştırma yapılmıştır (Li ve ark., 2014; Wu ve ark., 2015).

Sepsiste Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), proinflamatuvar sitokin olarak bilinmekte ve diğer sitokinler olan İnterlökin-1 (IL-1), IL-6, IL17A ve IL-8 ile birlikte salınmaktadır (Hack ve ark., 1997). İnflamasyon uyarısı aynı zamanda antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 gibi sitokinlerin de salınmasına yol açmaktadır (Poll ve ark., 1997). Karaciğer ve böbrek hem bu sitokinlerin salgılandığı hem de sepsisten etkilenen başlıca iki organ olarak karşımıza çıkmaktadır (Wei ve ark., 2013). Bu nedenle çalışmada karaciğer ve böbrek dokusu örneklerinde sitokin ekspresyonları ile bu sitokinlerin kan seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu araştırma ile PLT yapılan ve CLP modeli ile sepsis oluşturulan sıçanlarda karaciğer ve böbrek sitokin yanıtında herhangi bir değişiklik olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda; pinealektomi sonrası karaciğer ve böbrek TNF- α , IL-10, IL-6 ve IL-1 β gen ekspresyonları düzeyleri ile kan seviyeleri belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pineal Bez ve Melatonin

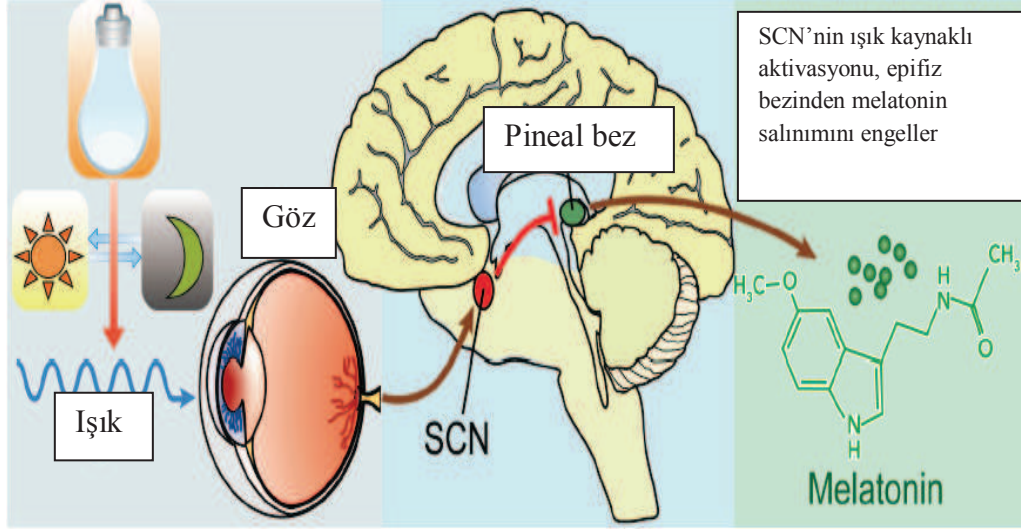
2.1.1. Pineal Bez

Pineal kelimesi Latince’ de çam kozalağı anlamına gelen ‘pinea’ kelimesinden türemiştir. Hint felsefesinde, diğer iki göze göre daha gerçekçi ve derinlemesine görebilen bir üçüncü göz olarak kabul edilirken, Fransız filozof Rene Descartes ise pineal bezi ‘ruhun sandalyesi’ olarak tanımlamıştır. Pineal bez, dış çevrenin aydınlık karanlık olmasına göre organizmanın başta endokrin sistem olmak üzere birçok farklı organ ve dokunun işlevlerini düzenler. Pineal bezin suprakiazmik nükleus (SCN) ile birlikte fizyolojik işlevlerin dış ortam ile eş zamanlı bir şekilde yapılmasını sağlayan biyolojik saat olduğu ileri sürülmektedir (Çam ve Erdoğan 2003; Özşahin 2006).

Pineal bez insan vücudundaki en küçük endokrin bezdir ve 120/150 mg ağırlığındadır. Ağırlığı ve boyutlarında puberteye kadar artış puberta sonrası ise azalış görülmektedir (Çam ve Erdoğan 2003; Özşahin 2006; Kırım ve ark., 2006).

Pineal bez önemli ölçüde damarlaşma göstermekte olup, kan akımı bakımından 4 ml/dk/g’ lık değerle oldukça yüksek bir kanlanma oranına sahiptir (Ataş 1998).

Bezin parankimi pinealositler ve glia hücrelerinden oluşur. Nöroepitelyal hücreler olan pinealositler, hafif bazofilik sitoplazmalı hücreler olup belirsiz nükleuslar içeren çekirdekleri büyük, düzensiz veya birkaç lobludur (Brzezinski 1997; Özşahin 2006).



Şekil 1. Melatonin döngüsü (Zhigiang ve ark., 2016).

2.1.2. Melatonin

Melatonin 1958 yılında dermatolog Aaron Lerner tarafından, sıgır pineal bezi ekstrelerinde bulunan bir amfibik cilt açıcı faktör olarak tanımlanmıştır (Zawilska ve ark., 2009). Daha sonra melatoninin bitkiler, protozoonlar, omurgasızlar, mantarlar, bakteriler ve insanlar olmak üzere hemen hemen tüm omurgalılarda bulunduğu anlaşılmıştır (Harderland ve ark., 2003).

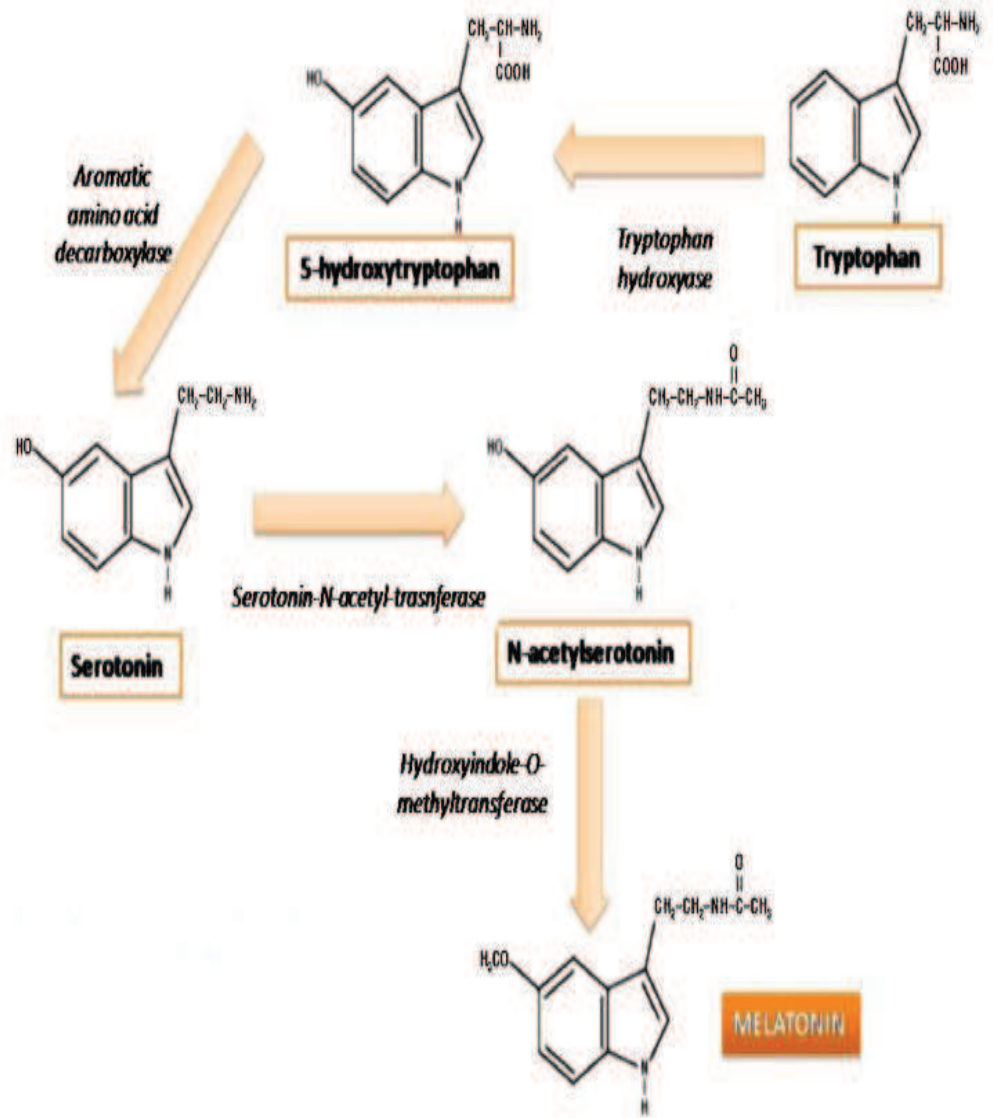
Melatonin uyku ve sirkadiyen ritim düzenlenmesi için gerekli olan, epifiz bezi tarafından salgılanan bir hormondur. Bir günlük ritim ile salgılanır; salgılanması karanlığın başlangıcı ile başlar, kısa bir süre sonra artar ve gece yarısı (02:00 ve 04:00) en yüksek düzeye ulaşır. Gecenin ikinci yarısında ise yavaş yavaş seviyesi azalır (Brzezinski 1997).

Melatoninin aynı zamanda, lenfositler, mast hücreleri, hava yolu epitel hücreleri, beyin, retina, gastrointestinal sistem ve üreme sistemi gibi birçok dokuda da sentezlendiği tespit edilmiştir (Acuna-Castroviejo ve ark., 2014). Diğer taraftan deri hücrelerinin de melatonin ürettiği ve melatonin reseptörlerinin deride eksprese olduğu bilinmektedir (Carpentieri ve ark., 2012; Acuna-Castroviejo ve ark., 2014).

2.1.3. Melatonin Sentezi

Pineal bezin işlevi üzerine başlıca kısıtlayıcı etki yapan faktör, ışıktır. Işığın başka önemli görevi ise pineal bez ritminin merkezi sinir sistemi aracılığıyla çevreye uyumunu sağlamaktır. Pineal beze çevreden gelen sinirsel uyarılar beyin aracılığıyla ulaşarak endokrin yanıtı dönüşür. Işık durumuna bağlı olarak dış ortamdan gelen uyarılar gözün retina katmanı ile alınır, fotoreseptörlere ulaşır ve buradan hipotalamustaki suprakitazmatik çekirdeğe iletilir. Bu uyarılar daha sonra paraventriküler çekirdeğe ulaşır. Uyarı dalgaları medial ön beyin sapında ve retiküler formasyonda birleşerek omuriliğin lateral çekirdeğine gider. Bu çekirdekten sempatik sinir sisteminin pregangliyonik adrenerjik sinirleriyle alınan uyarılar üst beyin gangliyonuna gelir ve buradan pineal beze ulaşır (Macchi ve Bruce, 2004).

Sempatik sinir sistemi ile melatonin salgısı arasında ilişki bulunmaktadır. Sempatik sinir uçlarından salgılanan norepinefrin, melatonin sentezini artırırken, propranolol ise melatonin sentezini azaltır (Özşahin 2006). Norepinefrin bu etkisini, pineal hücre zarındaki β -adrenerjik reseptöre bağlanarak gösterir ve Adenozin Mono Fosfat (cAMP) sistemini uyararak oluşturur. Işığın etkisi ile pinealositlerde, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofan (5HTP)' a hidroksillenmektedir. Bu ürün ise aromatik amino asit dekarboksilaz aracılığı ile seratonine (5-hidroksitriptamin, 5HT) dönüştürülür. Karanlıkta seratonin, seratonin N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilseratonine ve son olarak N-asetilseratonin de hidroksiindol- O- metiltransferaz anzim tarafından melatonine dönüştürülür (Macchi ve Bruce 2004).



Şekil 2. Melatoninin triptofandan sentez aşamaları (Esteban ve ark., 2016).

2.1.4. Melatoninin Etki Mekanizması

Merkezi sinir sisteminde melatonin esas hedef organı hipotalamustur. Melatonin verilmesi ile hipotalamusta dopamin, serotonin, norepinefrin ve gamma amino bütirik asid (GABA) gibi transmitterler artar. Melatonin ayrıca hipotalamustan nöropeptitler, hormonlar ve prostglandinlerin salgılanmasını da uyarır (Brezezinski 1997).

Melatonin düzeyinin artması birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Bununla ilişkili olarak Guanozin Mono Fosfat (cGMP)

düzeıı azalır ve cAMP düzeıı artar. Melatonin; DNA tamiri, membranlar ve diğer hücreiçi komponentlerin bakımı için gerekli olan guanin nükleotitlerin oluşumuna katkıda bulunur (Özşahin 2006). Melatoninin işlevlerini cGMP ve prostaglandinler aracılığı ile de gerçekleştirdiği söylenmektedir (Witt-Enderby ve ark., 2003).

2.1.5. Melatonin Salınımı

Melatonin oluşuktan sonra depolanmadan dolaşıma verilmektedir. Melatonin kana hızla salınımı lipofilik özelliğine bağlıdır. Lipofilik özelliğinin çok yüksek olmasından dolayı tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılır. Plazmada yaklaşık % 70'i albumine bağlı olarak taşınır (Arendt 2005).

Melatonin kanda geri dönüşümlü olarak albumin ve alfa asit glikoproteine bağlanarak hedef dokuya taşınmaktadır. Hayvanlarda N-Asetil Transferaz (NAT) enziminin aktivitesi dolayısıyla melatonin kan düzeyinin karanlık fotoperiyotta pik yaptığı gözlemlenmiştir. Melatonin salgılanması karanlık ile başlar, aydınlık ile sona erer. Salgılanması genellikle 21:00-22:00 saatleri arasında başlar, maksimum konsantrasyonu 02:00-04:00 arasında gözlenir ve 07:00-09:00 arasında giderek azalır. İnsanda 1000-2500 lüks' lük ışık melatonin salgılanmasında azalmaya yol açar (Taşkiran 2011).

Pineal bez tarafından üretilen melatonin, çeşitli sıvı ve dokulara hücrenel düzeyde ulaşır ve sirküle olur. Yüksek düzeyde lipofilik hormon olan melatonin, pineal bezde depolanmadığı için plazma seviye profili pineal bezin aktivitesini yansıtır (Arendt 2005).

Melatoninin kandaki konsantrasyonu insanlarda yaşa bağlı olarak da değişmektedir. Üç aydan daha küçük bebeklerde çok az düzeyde bulunur. En yüksek seviyelerine 1-3 yaş arasında ulaşır. Bu esnada geceleri melatoninin serumda 325 pg/ml (1400 pmol/l) gibi yüksek değerlere ulaştığı belirlenmiştir. Cinsel olgunlaşma sürecinde giderek azalan plazma melatonin düzeyi, 500 pmol/l'nin altına düştüğünde, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılanması artar ve puberte başlar. Yetişkin gençlerdeki değeri 40-260 pmol/l değerleri arasında değişmektedir (Özşahin 2006).

Melatoninin pineal bez dışında nöroendokrin sistemin bir parçası olarak kabul edilen APUD (Amin habercisi alım ve dekarboksilasyon) hücrelerinde de önemli miktarda bulunduğu belirlenmiştir. Gastrointestinal kanalda bulunan enterokromafin (EC) hücrelerinin vücutta melatoninin üreten diğer hücreler olduğu bilinmektedir (Macchi ve Bruce, 2004).

Melatonin ayrıca retina, solunum yolları, karaciğer, böbrek, adrenal bezler, timus, tiroid, plasenta ve endometriumda, mast hücrelerinde ve doğal öldürücü ile eozinofilik lökositlerde de belirlenmiştir. Ancak pineal bezden kana salınan melatonin diğer kaynaklardan 20 ile 1000 kat arasında daha fazla olduğu belirlenmiştir (Özşahin 2006).

2.1.6. Melatonin Reseptörleri

Melatoninin MT1 ve MT2 olmak üzere iki grup reseptörü tanımlanmıştır. İlk tanımlanan reseptör MT1 olup yüksek afiniteli, guanozin trifosfat bağlanma proteinleri ailesindedir. MT1 melatonin reseptörlerinin aktivasyonu hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Bu reseptör retina işlevine, sirkadyen ritme ve üreme işlevine katılmaktadır (Özşahin 2006).

MT1 reseptörlerinin MT1-a (hipofizer pars tüberalistakiler üreme ile ilgili, suprakiazmatik nükleustakiler sirkadyen etki ile ilgili) ve MT1-b (retina ve beyinde) olmak üzere iki farklı tipi bulunmaktadır (Taşkiran 2011).

MT2 ise düşük afiniteli bir reseptör olup, fosfoinositol hidrolizi ile etki gösterir (Çam ve Erdoğan 2003; Özşahin 2006).

MT1 ve MT2 reseptörleri, hücredeki etkinliğini G proteini aracılığı ile gerçekleştirir. MT1 reseptörleri başlıca hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde tespit edilirken, MT2 reseptörleri retina, hipokampus ve diğer beyin bölgelerinde belirlenmiştir (Reppert ve ark., 1996; Çetin 2005). Melatonin reseptörleri ayrıca mide-bağırsak kanalı, gonadlar, böbrek ve kan damarlarında da bulunur. Sıçanlarda melatonin reseptörlerine T ve B lenfositlerde rastlanırken (Pozo ve ark., 1997), insan T lenfositlerinde de melatonin reseptörlerinin varlığı bildirilmiştir (Carrilo ve ark.,

2004). İmmun fonksiyonun güçlenmesinde MT2 reseptörünün önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Drazen ve ark., 2001).

2.1.7. Melatoninin Yıkımı

Dolaşımdaki melatoninin % 90'ından fazlası karaciğer tarafından metabolize edilir. Ayrıca böbrekler tarafından da metabolize olur.

Melatonin önce hidroksile edilir, sülfat ve az düzeyde de glukuronit konjugatlar gibi idrarla atılır. İdrarla atılan düzeyi yaklaşık % 1 oranındadır (Bruno ve ark., 2005).

Melatoninin başlıca metaboliti 6-hidroksimelatonin sülfat (6-HMS) olup dolaşımdaki melatoninin yarılanma süresi 20-60 dakika aralığında değişmektedir (Çam ve Erdoğan 2003).

2.1.8. Melatoninin Fizyolojik Etkileri

Melatonin fotoperiyod ile ilgili bilgiyi vücudun fizyolojisine aktararak sirkadyen ritmin ve organizmanın fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar. İnsanda pek çok biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal değişkenlerde olduğu gibi plazmadaki melatonin düzeyleri de 24 saatlik periyod içinde düzenli iniş çıkışlar gösterir. Bu sirkadyen ritim hipotalamusda SCN'deki merkezi önder odak tarafından kontrol edilir ve ritmin başlıca ayarlayıcısı dış ortamdaki aydınlık/karanlık siklusudur. Gece ışığa maruz kalındığında pineal fonksiyonlar akut olarak baskılanır (Liebmann ve ark., 1997).

Melatonin canlı vücudunda birçok fizyolojik etkiye sahiptir. Bu etkiler arasında kan basıncını düzenleyici etkileri (Simko 2012; Kawashima ve ark., 1987), endokrin ritmin düzenlenmesi, antigonadal aktivite, serbest oksijen radikallerinden korunma, değişik immun fonksiyonlarının nöroendokrin düzenlenmesi (Erlich ve Apuzzo, 1985) ve kardiyovasküler etkiler gibi bir çok etkisi sayılabilir (Veneroso ve ark., 2009; Tengattini ve ark., 2008).

2.1.9. Melatonin ve İmmün Sistem

İmmün yanıt, MHC-I molekülleri ile T hücrelerinin aktive edildiği, özellikle de hücre içi patojenlere karşı başlatılan hücreyel immün yanıt ile MHC-II'ler tarafından Th2 hücrelerine antijenlerin sunulması ve B lenfositlerinin aktive olarak antikor üretmesi ile etkinlik gösteren humoral immün yanıt olarak ikiye ayrılmaktadır (Diker 1998).

Melatoninin immün sistem hücrelerini melatonin reseptörleri aracılığı ile etkilediği düşünülmektedir. Lökositler ve lenfositler üzerinde saptanan melatonin reseptörleri bunun kanıtı olarak gösterilmektedir. Lenfositler üzerindeki melatonin reseptörleri çoğunlukla CD4⁺, CD8⁺ T lenfositleri ile B hücrelerinde bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalarda melatoninin bu reseptörler aracılığı ile stimüle olmuş lenfositlerin proliferatif yanıtını modüle ettiği ortaya konulmuştur (Maestroni, 2001).

Melatonin periferel kandaki mononükleer hücrelerde IFN γ (interferon gamma), IL-2, IL-6, IL-1 ve IL-12 üretimini stimüle etmektedir (Garcia- Maurino ve ark., 1997; Garcia-Maurino ve ark., 2000).

Mukozal immünitede etkinlik gösteren IgA ile melatonin ilişkisinin incelendiği bir çalışmada ise idrarda melatonin artışı ile tükürükte IgA artışı arasında korelasyonun olduğu saptanmıştır (Park ve Tokura, 1999). Mukozal immün yanıt için özellikle önemli olan IgA seviyesindeki bu artış enfeksiyona bağlı hastalıklardan korunmada önemli bir veridir.

Farelere melatonin uygulaması sonrası doğal katil hücreler (NK, Natural Killer) ve monosit sayılarında artış bildirilmiştir (Currier ve ark., 2000). Melatoninin immün sistem üzerindeki bir diğer önemli etkisi ise antikora bağlı hücreyel sitotoksiteyi arttırmasıdır (Vermuelen ve ark., 1993).

Melatonin, viral enfeksiyonlarda oluşan yüksek oksidatif stres ve inflamatuvar hasarlar için potansiyel tedavi edicidir. Viral enfeksiyonlar sonucu oluşan serbest radikaller ve türevleri, OH (hidroksil) ve ONOO (peroksinitril) hücrenin esansiyel yapılarına (lipit, protein ve DNA) hasar verir. Hücredeki serbest radikallerin etkileri antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılabilir. Viral enfeksiyonlara karşı melatonin

koruyucu etkisinin mekanizması serbest radikal süpürücü olması, antioksidan enzim indükleyici etkisi, immün sistem fonksiyonlarındaki pozitif düzenleyici olması, inflamasyonu inhibe edici rolü ve programlanmış hücre ölümü işlevlerindeki regülatör fonksiyonları ile açıklanabilir (Gümüsova ve Memiş, 2014).

2.2. Sepsis

Sepsis ve sepsise bağlı çoklu organ yetmezliği sağlık sistemi için çok büyük bir yük oluşturmaktadır ve bilim adamları için önemli bir sorundur. Kapsamlı temel araştırma ve klinik çalışmalara rağmen, sepsisin patofizyolojisi hala tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır (Chaudhry ve ark., 2013).

Ciddi sepsis ve septik şok, her yıl dünyanın dört bir yanında milyonlarca hastayı etkilemekte ve önemli bir mortalite oranı ile seyretmektedir (Dellinger ve ark., 2013). Sepsisin heterojen ve dinamik bir bozukluk olduğu ve hangi inflamatuvar ağdaki dengesizlikten kaynaklandığı gittikçe daha da netleşmektedir (Rittirsch ve ark., 2008).

Sepsis, hasteneye yatırılan hastalarda görülen en sık ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Sepsisten ölen hastaların sayısı, miyokard enfarktüsü ile ölenlerin sayısına yakınlık göstermektedir (Angus ve ark., 2001).

Sepsis, tüm vücut ya da sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) olarak ortaya çıkmakta, bilinen veya şüphelenilen enfeksiyonun varlığında gerçekleşmektedir. Bunu düşük kan basıncına bağlı ağır organ disfonksiyonu takip etmektedir. Azalmış idrar üretimi ve bilinç bulanıklığına bağlı laktik asidoz nedeniyle bir veya birden fazla organa yetersiz kan akımı oluşmaktadır. Şiddetli sepsis, sepsis ile birlikte, organ yetmezliği de dahil olmak üzere hipotansiyon (SKB <90 mmHg ya da başlangıca göre ≤ 40 mmHg azalma), hipoksemi, oligüri, metabolik asidoz, trombesitopeni ve abtundasyon olarak tanımlanmaktadır (Studnek ve ark., 2012).

Sepsis, ayrıca şoka ve çoklu organ disfonksiyonu sendromuna da neden olabilir. Septik şok tanısı konulması için hastanın en az iki SIRS kriterine sahip olması göz önünde bulundurulur. Septik şokta; taşipne, beyaz kan hücre sayısı anomalisi, yüksek

kalp hızı, ateş ya da hipotermi de dahil olmak üzere bir çok patolojik bulgu ortaya çıkar, hasta yeterli sıvı almasına rağmen hipotansif kalır. Septik şok ve çoklu organ yetmezliği sepsisli hastalarda en sık ölüm nedenidir (Hanisch ve ark., 2011).

Dünya çapında yıllık mortalite oranlarında sepsis, akciğer ve göğüs kanserinden daha büyük bir paya sahiptir. Ayrıca sepsis görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır (Becker ve ark., 2010). ABD’de her yıl yaklaşık 750 000 sepsis vakası ortaya çıkmaktadır (Chaudhry ve ark., 2013). Bütün bunlara rağmen günümüzde sepsis için etkili bir tedavi yöntemi tam olarak ortaya konulamamıştır (Becker ve ark., 2010).

Sepsisin konak bağışıklık sistemi, virüs ve ya enfekte bakteri arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucu geliştiği belirtilmektedir. Sepsiste süperantijenlerin varlığı, fagositoz ve antibiyotik direnci gibi faktörlerin bulunması sepsisin daha da ilerlemesine yol açar (Russell, 2006). Bu tür enfeksiyonlar sıklıkla sitokin artışı tetikler ve sepsis hastalarında tespit edilir. Sitokin araştırmalarının sepsis tedavisi ve önlenmesinde büyük yararları olacağı öngörülmektedir (Chaudhry ve ark., 2013).

Geçtiğimiz on yıl içinde, sepsis gizli halk sağlığı felaketi olarak kabul edilmiştir (Angus ve ark., 2010).

2.2.1. Deneysel Sepsis Modelleri

2.2.1.1. Çekum Bağlama ve Delme Modeli [Cecal Ligation and Puncture (CLP)]

Yöntemin esası anestezi uygulanan sıçanlarda barsak geçişini engellemeden çekumun standart bir iplikle bağlanması ve daha sonra bağlanan bölgenin ölçüleri belirli bir enjektör iğnesi ile bir veya iki kez delinmesi esasına dayanır. İşlem tamamlandıktan sonra batın kapatılıp cilt altına hayvanın ağırlığına göre serum fizyolojik verilir. Bu yöntem, sıçanların yanı sıra fare ve koyunlarda da kullanılmıştır (Baker ve ark., 1983; Yang ve ark., 2002).

CLP ile oluşturulan sepsis modeli, uygulaması kolay ve ucuzdur, kullanılan diğer modellerden farklı olarak çok çeşitli mikroorganizmaları tarafından oluşturulan bir septik şok tablosu görülür. En önemli avantajlarından bir tanesi ise klinikte görülen sepsis tablosuna benzer bir model olmasıdır (İskit 2005).

CLP girişimsel bir model olup oldukça yağın olarak kullanılmakta ve polimikrobiyal bir peritonit tablosuna bağlı sepsise yol açmaktadır. Modelde çekuma hem ligasyon hem de perforasyon yapılmaktadır. CLP tipik klinik sepsis ile karşılaştırıldığında, benzer patofizyolojik ilerleme ve artan sitokin düzeyleri ile karakterize olduğu görülmektedir. Bu özellikleri ile CLP yöntemi deneysel sepsis modelleri için altın standart olarak kabul edilir (Dejager ve ark., 2011).

CLP modelinde enfeksiyon, karın boşluğuna delinmiş çekumdan gelen enteral içerikte bulunan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir. Bu nedenle, delik ile indüklenen çapraz çekum drenaj tutarlılığı modelin sağlıklı şekilde ortaya çıkmasında önemlidir. Çekum delinmesi işleminde boyutları sabit enjektör iğnelerinin ortaya konulması ve modelin bu şekilde standardize edilmesi modeli kabul edilir hale getirmiştir (Orman ve ark., 2011).

2.2.1.2. Lipopolisakkarid Verilerek Oluşturulan Septik Şok Modelleri

Lipopolisakkarid (LPS), saflaştırılmış glikolipid yapıda olup LPS uygulaması septik şok modellerinde oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. LPS çoğunlukla toz halinde temin edilir. LPS; *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bir çok gram negatif bakteriden elde edilir. Deneysel septik şok modellerinde ise E.coli'den elde edilen LPS modeli daha çok kullanılmaktadır (İskit 2005).

LPS enjeksiyonu ile indüklenen endotoksemi modelinde uygulanan gram negatif bakteri endotoksinleri, sistemik enflamasyon sırasında Dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Berthelsen ve ark., 2011).

LPS planlanan deneysel çalışma protokollerine göre, toz halinde bulunan LPS suda çözünerek deney hayvanlarına intraperitoneal ya da intravenöz tek doz halinde ya da infüzyon olarak uygulanır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde 1mg/kg ile 80-100 mg/kg aralığında büyük bir doz aralığında uygulandığı görülmektedir (İskit ve ark., 1999; Baykal ve ark., 2000).

2.2.1.3. Damar veya Periton İçine Canlı Bakteri Uygulanması

Deney hayvanlarında sepsis modeli oluşturmak için damarii *E.coli* verilen çalışmalar da bulunmaktadır. Bakteriler tek doz veya infüzyon şeklinde verilebilir. Bu yöntemde aynı zamanda intra peritonel canlı bakteri uygulanması da yapılmakta olup sıçanlarda 24 saat içerisinde % 100 ölümlü tablosu ortaya çıkmaktadır. Fakat bu yöntemin uygulanması sırasında araştırmacıların kontaminasyon riski de bulunmaktadır (Kohn ve Kung 1995).

Benzer şekilde Edremitlioğlu ve ark. (2005) sıçanlara intraperitonel yolla *E.coli* enjeksiyonu yapmışlar ve hiperbarik oksijen tedavisinin böbrekler üzerine olan etkilerini incelemişlerdir.

2.2.2. Sepsis ve Karaciğer

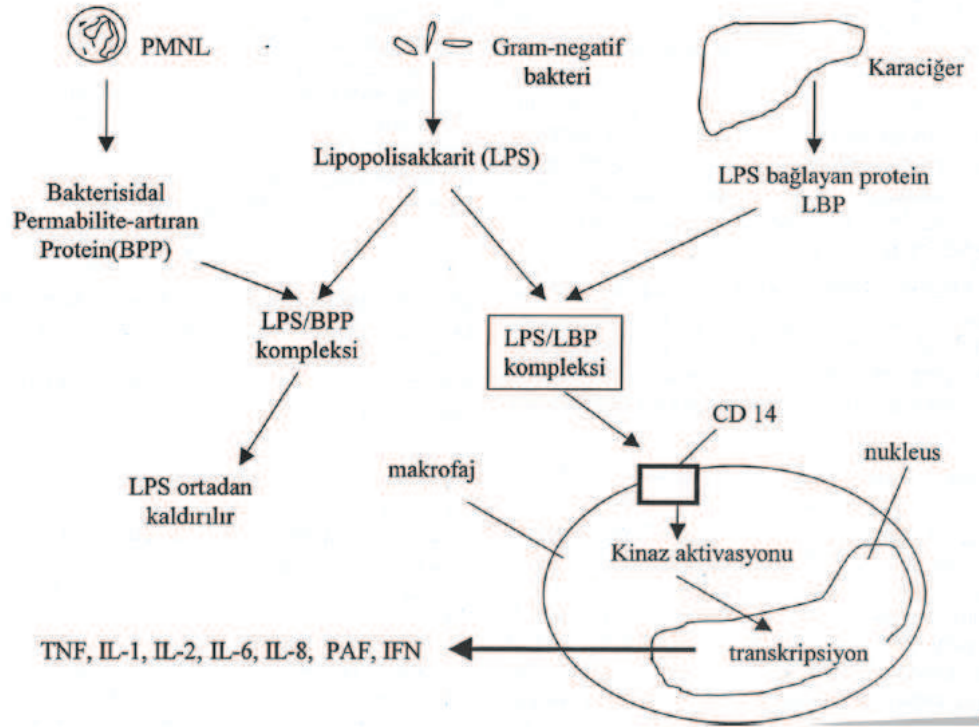
Sepsiste ortaya çıkan klinik bulgular sepsise neden olan mikroorganizmanın toksin ve hücre duvarı gibi komponentlerine bağışıklık sisteminin verdiği inflamatuvar yanıtı bağlı olarak oluşmaktadır.

Etken gram negatif bakteri olduğunda, hücre duvarı komponentlerinden bir tanesi olan LPS endotoksine karşı inflamatuvar yanıtı uyaran molekül olarak karşımıza çıkmaktadır. Endotoksin molekülü hücre membranında kaldığı sürece biyolojik olarak inaktiftir, ancak hızlı hücre bölünmesi ve hücre yıkımı sırasında salıverilir (Ortatatlı ve ark., 1999).

LPS lipopolisakkarit bağlayan protein (LBP) ile birleştikten sonra monosit ve makrofajlara CD14 reseptörü aracılığı ile bağlanır. Bu bağlanma sonucunda sitoplazmik sinyal sistemi işlemeye başlar ve dakikalar içinde TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, platelet aktive edici faktör (PAF) ve IFN- γ gibi sitokinlerin transkripsiyonu gerçekleşir. Bu sitokinler ve nitrik oksit, intrasellüler adezyon molekülleri, prostaglandinler ve lökotrienler septik şok patogenezinin ortaya çıkmasını sağlayan moleküller olarak dikkat çekmektedir (Nayely ve ark., 2016).

Sepsise neden olan gram pozitif bakteriler ise farklı bir yoldan inflamatuvar süreci uyarırlar. Bu bakterilerin peptidoglikan ve teikoik asit gibi hücre yapıları kompleman zincirini alternatif yoldan aktive etmektedirler. Kompleman zinciri aktive olduğunda

lenfosit proliferasyonu ve aktivasyonu ile birlikte makrofaj aktivasyonu ve sitokin salınımı gerçekleşmektedir. Aynı zamanda peptidoglikan ve lipoteikoik asit, doğrudan monosit ve makrofajlardan IL-1 salınımına neden olurlar. Lipoteikoik asit ek olarak TNF- α ve IL-6 salınımını tetikler. Gram-pozitif bakterilerin ekzo ve enterotoksinleri IL-1, IL-6 ve TNF- α salınımını artırır. Stafilokokların salgıladığı toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1), IL-1 salınımını LPS'den çok daha güçlü bir şekilde uyardığı bilinmektedir (Badley ve Steckelberg, 2001).



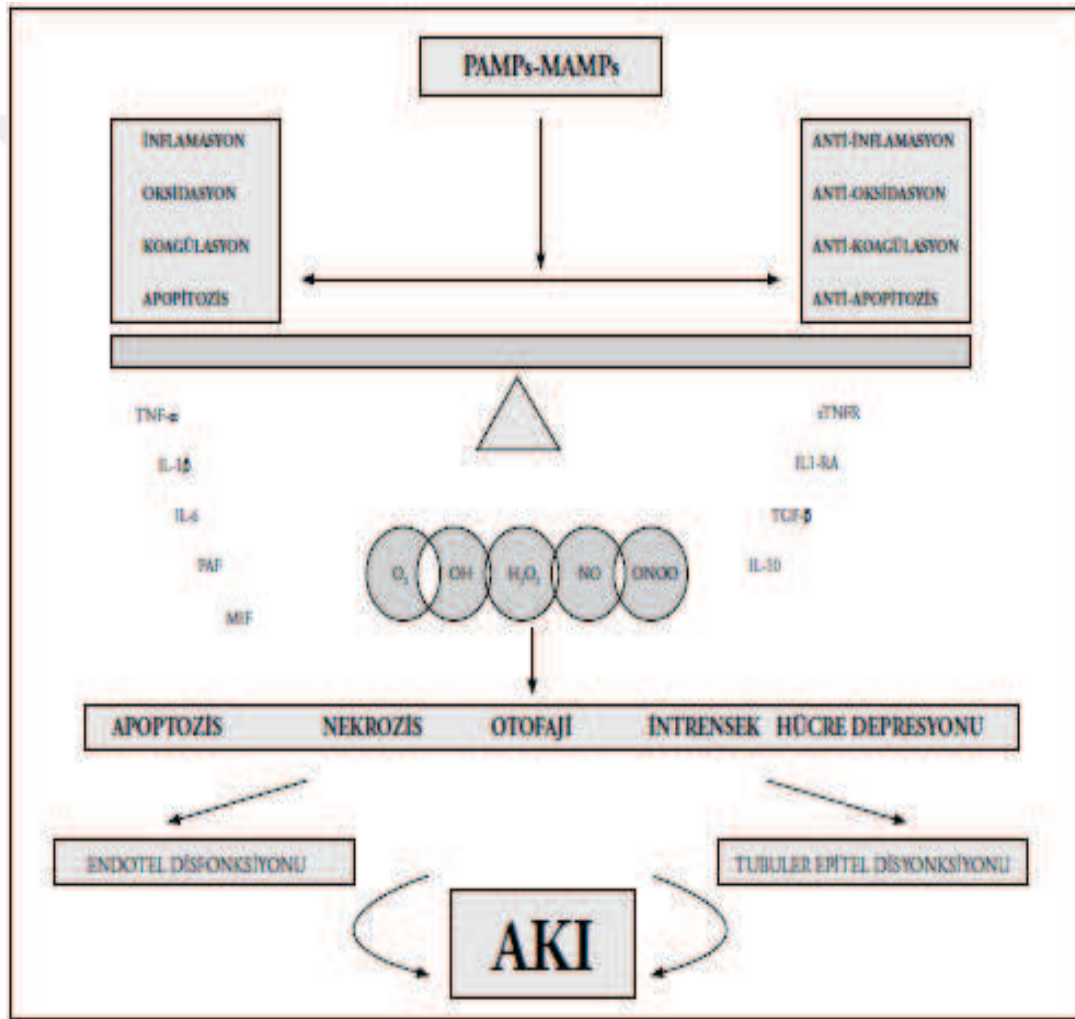
Şekil 3. Sepsis ve karaciğer ilişkisi (Badley ve Steckelberg, 2001).

2.2.3. Sepsis ve Böbrek

Akut böbrek hasarı (AKI) çoklu ve çeşitli hastalık durumlarının bağlamında ortaya çıkan klinik sendromdur. AKI tanısı böbrek hasarı olmasının yanı sıra, böbreğin fonksiyonel bozukluğu ve serum kreatinin ve idrar çıkışı gibi fonksiyonel parametrelerinin bozukluğuna dayanmaktadır. Sepsis kaynaklı AKI patofizyolojisi,

böbrek parankiminde şiddetli inflamasyon, intraglomerüler tromboz ve tübüler hasar ile karakterizedir (Stasi ve ark., 2016).

Yoğun bakım ünitelerinde sepsis ve sepsis şok AKI'nin en önemli nedenlerinden bir tanesidir. Sepsis ilişkili AKI, klinik tablo da kötüye gidişin biyolojik göstergesi gibidir. AKI çeşitli immün ve metabolik yolları etkilemekte, inflamatuvar denge bozulması sonucunda diğer organların işlev bozukluklarına yol açarak morbiditeyi ve mortaliteyi arttırmaktadır (Bilgili ve ark., 2014).



Şekil 4. Sepsis ve sepsis ilişkili akut böbrek hasarı patofizyolojisinde anahtar patojenik yollar (Bilgili ve ark., 2014).

2.3. Sitokinler

Sitokinler immün ve inflamatuvar olaylara katılan, immün hücreler arasında iletişimi düzenleyen, parakrin ve otokrin fonksiyonları olan 20-30 kDa ağırlığında bir grup peptid veya glikoproteinlerdir (Kılıçturgay, 2000).

Farklı hücre çeşitleri tarafından salgılanan ve üretilen sitokinler, inflamasyon, hücre büyümesi, hücre iyileşmesi ve hasarlara karşı sistemik yanıtı da kapsayan immün ve inflamatuvar olayları düzenlemektedir. Sitokinler hormona benzemektedir fakat hormon değildirler (Nororiha ve ark., 1995).

Sistemik inflamatuvar cevabın başlamasında ve devam etmesinde en önemli rolü sitokinler üstlenir. Sitokinler hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar özellikleri olan peptitlerdir.

İnflamatuvar süreç önce makrofajlar tarafından TNF- α salınmasıyla başlar. TNF- α salınımını başlatan faktör Gram negatif bakterilerin dış membranlarından ayrılan lipopolisakkaritlerdir. Daha sonra diğer proinflamatuvar ajanlardan IL-1, IL-6 ve IL-8 düzeyleri yükselir (Anderson ve ark., 1997).

TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 sistemik inflamatuvar cevabı başlatan proinflamatuvar sitokin ailesindedir. Daha sonra ortaya çıkan IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ise antiinflamatuvar sitokinler olup sistemik inflamatuvar cevabın devam etmesinden sorumludurlar. İmmün sistem, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar kuvvetleri dengelemek için sitokinlere karşı endojen antagonistler de üretir (Jafari ve ark., 1992; Anderson ve ark., 1997; Perez ve ark., 1997).

Sitokinler doku hasarının güçlü uyarıcıları olup sepsisin erken fazında güçlü bir sitokin üretimi gözlenir (Aikawa N 1996). Proinflamatuvar sitokinlerin endotel hücreler üzerinde etkileri vardır. Nitekim TNF- α veya IL-1 endotel hücreleri luminal yüzeyini etkileyerek, yaygın damar içi pıhtılaşma başlatılmasını ve mikrovasküler trombüs oluşumunu desteklemektedir (Fourier, 2012). Sitokinler tarafından endotel hücrelerinin düzeninin bozulması hücre geçirgenliğindeki artışa, daha sonraki makromoleküler ekstrasvazyon ve ödeme neden olur (Rivers ve ark., 2001).

Endotelial hücreleri tarafından salgılanan nitrik oksit sistemik damar direncinin düşmesinden sorumlu ana vazoaktif mediator olup septik şokta ortaya çıkan hipotansiyonun nedeni olarak bilinir. Bu tabloya mitokondriyal etkinlik, doku hipoksisi ve laktik asidoz da katkıda bulunabilir (Carre ve ark., 2007).

TNF- α ve IL-6 yüksek konsantrasyonları organ yetmezliği ve artmış mortalite oranını yükseltir (Samson ve ark., 1997; Petilla ve ark., 2002), ancak hastanın klinik tablosunun kötü olması antiinflamatuvar sitokin olan IL-10'un yüksek kan seviyeleri ile ilişkilidir (Monneret ve ark., 2004).

Tablo 1. Bazı sitokinler, kökenleri ve işlevleri (Aytekin ve Solakoğlu 2006).

	Kökenleri	Bazı işlevleri
IL-1	Makrofajlar, keratinositler.	Yangı öncesi endojen pirojen
IL-2	T lenfositler	T, B ve doğal öldürücü lenfositlerin çoğalması
IL-3	T lenfositler	Erken hematopoietik hücrelerin çoğalması
IL-4	T lenfositler, mast hücreleri	B lenfositlere IgG1 ve IgE izotiplerini sentezlemeleri emri verir
IL-5	T lenfositler, mast hücreleri, olasılıkla B lenfositler	Eozonofil çoğalması ve farklılaşması, IgA üretimi
IL-6	Makrofajlar, T lenfositler, fibroblastlar	Yangı öncesi sitokin, B lenfosit farklılaşması, timosit büyümesi
IL-7	Kemik iliği stroması	B lenfosit farklılaşması ve büyümesi
IL-8	Keratinositler, fibroblastlar, monositler	Nötrofil kemotaksisi ve aktivasyonu
IL-9	T lenfositler	T lenfositler, timositler, mast hücrelerinin çoğalması
IL-10	T lenfositler, mast hücreleri, olasılıkla B lenfositler	Değişik hücrelerde sitokin sentezinin baskılanması, mast hücresi çoğalması
TNF- α	T lenfositler, makrofajlar, mast hücreleri	Tümör hücrelerinin yok edilmesi

2.3.1. Tümör Nekroz Faktör- α

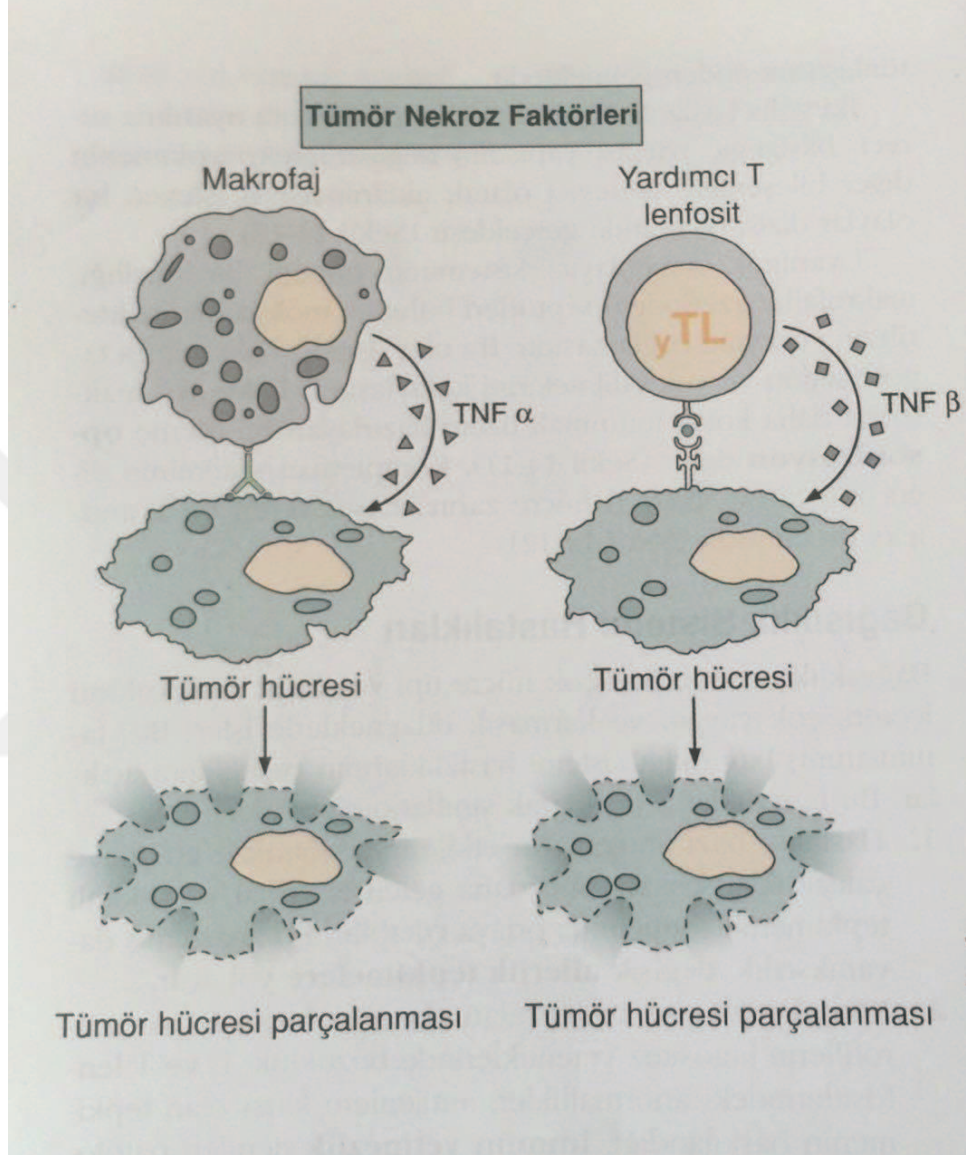
TNF ilk önce LPS ile tedavisi yapılan hayvanların serumunda bir tümör nekroz mediatörü olarak tanımlanmıştır. Tümör inhibisyonu oluşturan ve endotoksinlerin uygulanmasının ardından nekroza yol açan etkilerini açıklamak için bu isim verilmiştir. TNF ailesinin TNF- α ve TNF- β olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır (Graves ve Cochran., 2003). TNF'nin yapı olarak birbirine benzeyen iki tane hücre yüzey reseptörü bulunmakta olup bunlar; TNF reseptör-1 (TNFR1) ve TNF reseptör-2 (TNFR2)'dir (Pfizenmaier ve ark., 1996).

Tümör nekroz faktör alfa, Tümör nekroz faktor beta (TNF- β) ile uyarılmış makrofajlar tarafında sentezlenen 157 amino asitli 17 kD ağırlığında bir polipeptittir (Money ve ark., 1990). Çok sayıda inflamatuvar ve otoimmün hastalığın patogeneziyle ilişkisi olduğu varsayılan bağışıklık düzenleyici yanıtları da içeren bir çok biyolojik işlevi etkileyen pleitropik bir sitokindir (Erdem ve ark., 2003).

TNF hepatositlerde serum protein sentezinde artışa neden olmaktadır. Enflamatuvar olaylarda IL-1 ve IL-6 ile birlikte karaciğerden akut faz proteinlerinin sentezini uyarılmaktadır. Damar endotelinde koagülasyon faktörlerini etkileyerek koagülasyon bozukluklarına sebep olarak tromboz oluşumuna yol açar (Boloman ve ark., 1993; Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994).

IL-1 β ve TNF- α inflamatuvar yanıtta rol oynayan iki ana sitokindir. Bu sitokinler, endotel dokuya bağlı moleküllerin salınımını uyarır, IL-6 ve kemokinler (IL-8 ve monosit kemoçekici protein-1 (MCP-1)), büyüme faktörleri, eikosanoidler ve Nitrik oksit (NO) gibi diğer moleküllerin sentezine katılır (Nayely ve ark., 2016).

Kronik enflamasyonun sonucu olarak sitokinler gibi, bazı inflamatuvar mediatörlerin aşırı üretimi pek çok kronik hastalığın ortaya çıkmasına neden olabilir. Deneysel araştırmalarda, kronik inflamasyon ile ilişkili hastalıklarda IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerle bağ kurulmuştur (Nayely ve ark., 2016).



Şekil 5. Tümör nekroz faktörleri (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).

2.3.2. İnterlökin-6

IL-6, molekül ağırlığı 28 kD olan bir peptit olup 212 amino asitten meydana gelir ve insanda 7. Kromozom 7p21 (95-97) üzerinde bulunur (Keller ve ark., 1996).

İnsan IL-6 reseptörü (IL-6R) ilk defa insan doğal öldürücü hücrelerinden klonlanmıştır. IL-6R, 80 kD ağırlığında, 467 amino asitten oluşan bir proteindir. Birinci kromozomun q21 bölgesinde bulunur (Keller ve ark., 1996).

IL-6 farklı sinyallere bağlı olarak, lenfoid olan ya da olmayan hücrelerden üretilir. T hücreleri, B hücreleri, monositler, fibroblastlar, keratinositler, endotel hücreler, mezanşimal ve farklı tümör hücreleri IL-6 üreten başlıca yapılar olarak bilinmektedir (Keller ve ark., 1996).

IL-6 inflamatur ve immün yanıtta akut dönem reaksiyonunda önemli bir mediatördür. Fibrinojen, α -1 kimotripsin, hemopeksin, α -2 makroglobulin gibi akut faz yanıtta katkı sağlayan pek çok plazma proteininin hepatositler tarafından sentezine neden olmaktadır (Nororiha ve ark., 1995; Kishitomo 1989).

IL-6'nın, T hücrelerinin çoğalma ve farklılaşması, sitotoksik T lenfositlerin farklılaşması ve NK hücre faaliyetlerinin artırılması gibi bir çok biyolojik etkisi vardır. IL-6, makrofaj farklılaşmasının uyarılmasında görev alır ve vücut ısısının yükselmesini sağlar. Diğer taraftan karaciğer hücrelerinde akut faz cevabın oluşmasına ve hematopoeze katkıda bulunur (Galley 1996; Güner ve ark., 1997; Kılıçturgay 2000).

Östrojen ve androjenler IL-6' yı inhibe eder. Bu nedenle menopozal dönemde IL-6 düzeyi artış gösterir (Keller ve ark., 1996). IL-6'nın hepatosit büyümesi üzerine etkisi otokrin mekanizma ile olabileceği ileri sürülmekte olup karaciğeri toksik hasardan korumada da önemli bir rolü olduğu belirlenmiştir (Debonera ve ark., 2001).

2.3.3. İnterlökin 1-β

IL-1 timosit cevabı arttıran ve poliklonal aktivatör olarak aktive mononükleer fagositlerden salınan bir polipeptiddir. Çok az miktarda yapısal olarak bulunur ve çoğunlukla bir uyarıcı etken sonucu salgılanır. TNF- α , mikroorganizmalar ve lipopolisakkaritler gibi pek çok uyarı IL-1 oluşumunu arttırmaktadır. IL-1'in salınımına kortikosteroidler ve TGF- β (Transforming growth factor- beta) engel olurken, lökotrienler ise salınımını arttırmaktadır (Güner ve ark., 1997; Kılıçturgay 2000).

IL-1 genelde hücreler üzerinde uyarıcı etki sağlamaktadır. Aynı genler tarafından kodlanan IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki ayrı çeşidi bulunur. Bu iki çeşidin biyolojik aktiviteleri ve reseptör afiniteleri eşit değerdedir. Hücrede beraber salgılandıklarında da hücreler arası salgılanma oranları farklıdır (Güner ve ark., 1997; Kılıçturgay 2000).

IL-1 tek başına da doku hasarı oluşturur fakat LPS uygulaması sonrası salgılandığında, TNF- α ile oluşan doku hasarını çoğaltmaktadır. IL-1'in immünoglobulin üretimi, karaciğer hücrelerinde akut faz yanıtı, fagosit aktivasyonu, inflamasyon, vücut ısısı ve hemotopoez üzerine ciddi etkileri vardır (Rutanen 1993; Galley ve ark., 1996).

IL-1 β , aynı zamanda TNF- α , IL-6 gibi diğer enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu indükleyen çok önemli bir sitokindir (Kudo ve ark., 2002).

IL-1 β diğer inflammatuar mediatörlerle birlikte, mikroglial hücreleri indükleyerek, nöronal ölüme ve dolayısıyla Alzheimer hastalığının ilerlemesine yol açar (Lee ve ark., 2010). Buna ek olarak abdominal obezite ve periodontit hastalarında serum IL-1 β seviyeleri yüksek saptanmıştır (Satpathy ve ark., 2015).

IL-1 β ve TNF- α , aktive makrofajlar, mast hücreleri gibi, endotelial hücreler ve başka tip hücreler tarafından üretilir. Bu sitokinlerin başlıca rolü inflamasyonda endotel aktivasyonudur. IL-1 β ve TNF- α , endotel hücrelerdeki adezyon molekülünün ekspresyonunu uyarır (Nayely ve ark., 2016).

2.3.4. İnterlökün 10

IL-10, 18 kDa ağırlığında immün yanıtta etkili çok önemli antiinflamatuvar sitokindir. IL-10 bir tip II sitokindir ve IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, ve IL-29 u kapsayan sitokinler grubunun bir üyesidir (Güner ve ark., 1997; Commins ve ark., 2008).

IL-10 geni insanlarda 1q21-32. kromozomda bulunur. Sıçanlarda IL-10 geni, kromozom 1E4 kapsayan 5.1 kb olan benzer bir şekilde organize edilmiştir. IL-10'un dört büyük T hücre kaynağı şunlardır, yardımcı T tip 2 hücreler, T hücrelerinin düzenleyici alt grupları; Tr1, Th1 ve Th17 hücreleridir. CD8+ T hücreler IL-10 yapımında görevlidir. Başka önemli IL-10 yapımında görevli hücreler, monositler ve dendirit hücreler gibi bazı makrofajlardır. İnsan B hücreleri, eozinofiller ve bazı mast hücreleri IL-10 için önemli diğer kaynaklardır. IL-10'un immün olmayan kaynakları, keratinositler, epitel ve tümör hücreleridir (Güner ve ark., 1997; Mosser ve ark., 2008).

IL-10' un iki önemli etkisi vardır. Bunlardan bir tanesi makrofajlar tarafından sitokinlerin (örn: TNF- α , IL-1, IL-12, kemokin) üretimini engellemek, diğeri ise makrofajların T hücresi aktivasyonundaki etkilerini yok etmektir. Bu etkiler sayesinde T hücresi yardımıyla gelişen bağışıklığı inhibe eder (Güner ve ark., 1997; Mosser ve ark., 2008).

IL-10 sinyallerini reseptörleri aracılığı ile iletir ve IL-10 R1 ve IL-10 R2 olmak üzere iki adet reseptörü bulunmaktadır (Donnelly ve ark., 1999). IL-10 reseptör kompleksine JAK-JANUS STAT yolu ile bağlanır (Mosser ve ark., 2008).

IL-10 işlevlerini temel olarak dendiritik hücrelerde ve makrofajlar üzerinde göstermektedir. IL-10 antijen prezentasyonu için güçlü bir inhibitör olup, monosit prekürsörlerinden dendiritik hücrelerin farklılaşmasını önler ve aynı zamanda dendiritik hücrelerin olgunlaşmasını inhibe eder. IL-10' un diğeri önemli etkisi ise, makrofajlar ve dendiritik hücrelerden proinflamatuvar sitokinler ve mediyatörlerin üretimini inhibe etmektir. Major inflamatuvar sitokinlerden olan IL-1, IL-6, IL-12 ve TNF- α salınımını baskılar. IL-10 ayrıca makrofajlar ile IL-1 reseptör antagonistinin salınımını arttırır, inflamasyonu inhibe eder (Mosser ve ark., 2008).

2.3.5. Melatonin ve Sitokinler

Melatoninin çeşitli bağışıklık düzenleyici mekanizmaları tespit edilmiştir. Th1 ve Th2 hücreleri membranı ve melatonin nükleer reseptörleri yoluyla, melatonin lenfositik ve monositik hücre hatları tarafından IFN- γ , IL-2, IL-6 ve IL-12 sentezini indükler ve melatonin reseptörlerini güçlendirir (Garcia-Maurino ve ark., 1997; Garcia-Maurino ve ark., 2000; Marseglia ve ark., 2014).

Melatonin, NK hücreleri, T ve B lenfositleri, granüositler, monositler ve mast hücrelerinin aktivitelerini etkileyebilir (Moore ve Siopes, 2002; Marseglia ve ark., 2014).

Bazı çalışmalar melatoninin bir immünostimülatör işlevi olduğu belirtilmişken, bazı çalışmalarda ise antiinflamatuvar etkileri olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, melatonin immün tampon işlevi gören bir molekül olduğu ileri sürülmüştür, bazal veya immunsupresif koşullar altında bir uyarıcı olarak görev yapar ancak akut enflamasyon durumlarında ise bir antiinflamatuvar ajan gibi davranır (Carrillo-Vico ve ark., 2013).

Melatonin, antioksidan enzimleri arttırması yoluyla etkili bir şekilde birçok serbest radikalleri etkisiz hale getirir ve hücre membranlarını stabilize eder (Garcia ve ark., 2014). Diğer taraftan melatoninin DNA onarımı da dahil olmak üzere ultraviyole radyasyon ile indüklenmiş deri hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Slominski ve ark., 2014).

Melatonin gastroözofageal reflü hastalığı ve peptik ülser hastalığı olan hastalarda ülser iyileşmesine yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Brzozowska ve ark., 2014).

Uyku ve sirkadiyen ritim ile bağışıklık fonksiyonu ve sitokin üretimi arasında karmaşık ilişkileri vardır. Bu sistemler muhtemelen geçici olarak çevresel değişikliklere yanıt ve adaptasyonu optimize etmek için entegre edilmiştir (Lange ve ark., 2010).

Total lökosit sayıları, bellek T hücre sayısı ve naif T hücre sayısı ve proliferatif fonksiyon gece en yüksek seviyededir, NK hücre sayısı ve aktivitesi ise gündüz en yüksek düzeyde seyretmektedir (Born ve ark., 1997; Geiger ve ark., 2015). T hücreleri geceleri 02:00' da en üst seviyede bulunur ve 07:00' da neredeyse hiç aktivitesi yoktur (Bollinger ve ark., 2009).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Deney Ortamı

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı (**05.11.2014 toplantı tarihli ve 2014-11-15 sayılı kararı**) ile yürütülmüş olup araştırmannın hayvan deneyleri bölümü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜDAM) Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada ÇOMÜDAM' den temin edilen 4-5 aylık, 200-300 gram ağırlığında Wistar Albino ırkı toplam 54 adet erkek erişkin sıçan kullanıldı. Deneysel süreç boyunca tüm sıçanlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ve ortam sıcaklığı 22 °C olacak şekilde ayarlanan ortamlarda barındırıldı. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Yem ve su ad libitum olarak verildi.

3.2. Deney Grupların Oluşturulması

Gruplar oluşturulmadan önce tüm sıçanlar tartıldı. Gruplar ağırlıkları dikkate alınarak her grupta 18 sıçan olacak şekilde oluşturuldu. Tüm gruplarda deneysel süreç 31 gün olarak belirlendi. Gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

1. GRUP (SHAM; n=18): Bu gruba çalışmanın 1. günü pinealektomi (PLT) işlemi yapılmış olan gruplardaki tüm cerrahi işlemler uygulandı ancak sadece pineal bez çıkarılmadı. Bu sıçanlar 30 gün boyunca yukarıda bahsedilen ortamda kafeslerde beslendi. Çalışmanın 30. gününe geldiğinde gruptan 0., 12. ve 24. saatlerde her seferinde rastgele 6 sıçan seçilerek aşağıdaki işlemler uygulandı.

0. saat: Bu amaçla rastgele seçilen 6 sıçandan sabah saat 08:00-10:00 saatleri arasında kan örnekleri alındı, hayvanların ölmesi sağlanarak karaciğer ve böbrekten doku örnekleri de alındı.

Geriye kalan 12 sıçana SHAM CLP işlemi uygulandı.

12. saat: SHAM CLP uygulamasından 12 saat sonra (aynı gün akşam 20:00-22:00 saatleri arasında) sıçanlardan yine rastgele 6 hayvan seçilerek 0. saatte yapılan işlemler tekrarlandı.

24. saat: Geriye kalan 6 sıçana SHAM CLP uygulamasından 24 saat sonra (ertesi gün sabah 08:00-10:00 saatleri arasında) 0. saatte yapılan işlemler tekrarlandı.

2. GRUP (PLT-CLP; n=18): Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın 1. Günü PLT operasyonu yapıldı.

0. saat: PLT operasyonundan 30 gün sonra bu gruptan rastgele seçilen 6 sıçandan sabah saat 08:00-10:00 saatleri arasında kan örnekleri alındı hayvanların ölmesi sağlanarak karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri de alındı.

Geriye kalan 12 sıçana CLP işlemi uygulandı.

12. saat: CLP işleminden 12 saat sonra (aynı gün 20:00-22:00 saatleri arasında) sıçanlardan yine rastgele 6 hayvan seçilerek 0. saatte yapılan işlemler tekrarlandı.

24. saat: Geriye kalan 6 sıçana ise CLP işleminden 24 saat sonra (ertesi gün sabah 08:00-10:00 saatleri arasında) 0. saatte yapılan işlemler aynen uygulandı.

3. GRUP (SHAM PLT-CLP; n=18): Bu gruba PLT işlemi yapılmış olan gruplardaki tüm cerrahi işlemler uygulandı ancak sadece pineal bez çıkarılmadı. CLP operasyonu yapılarak sepsis modeli oluşturuldu.

0. Saat: Bu amaçla çalışmanın 30. gününde rastgele seçilen 6 sıçandan sabah saat 08:00-10:00 saatleri arasında kan örnekleri alındı hayvanların ölmesi sağlanarak karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri de alındı.

Geriye kalan 12 sıçana CLP işlemi uygulandı;

12.saat: CLP işleminden 12 saat sonra (aynı gün 20:00-22:00 saatleri arasında) sıçanlardan yine rastgele 6 hayvan seçilerek 0. saatte yapılan işlemler tekrarlandı.

24. saat: Geriye kalan 6 sıçana ise CLP işleminden 24 saat sonra (ertesi gün sabah 08:00-10:00 saatleri arasında) 0. saatte yapılan işlemler aynen uygulandı.

Gruplarda uygulanan işlemlerin ayrıntıları aşağıda belirtilmiştir.

3.3. Anestezi Yapılması

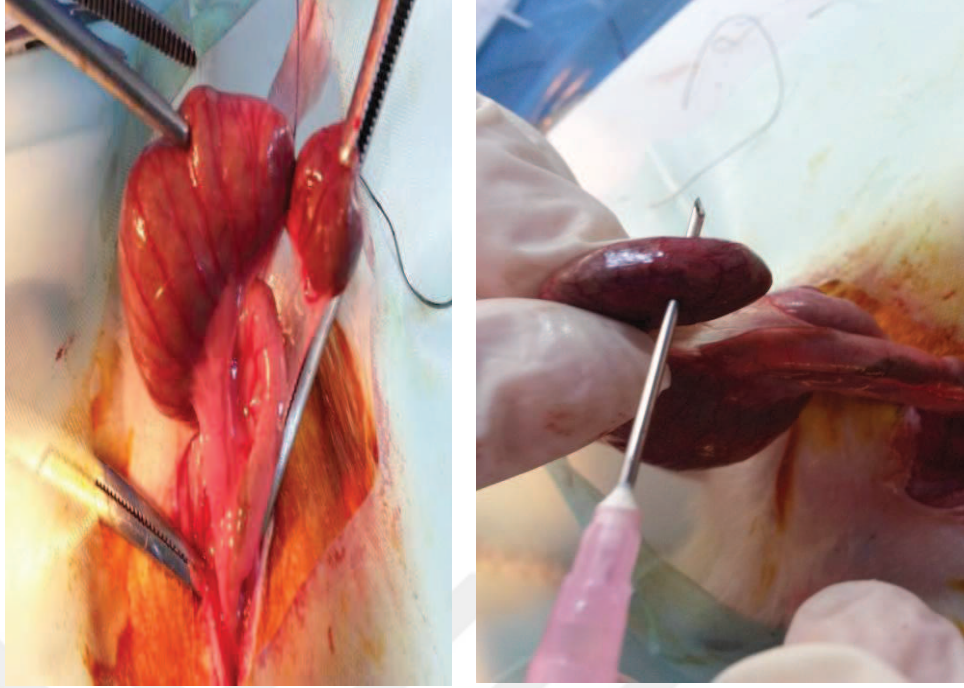
Pinealektomi operasyonu ve çekal bağlama ve delme operasyonu, genel anestezi altında gerçekleştirildi. Bu amaçla ksilazin (5 mg/kg; rompun) ve ketamin (60 mg/kg; ketalar) intramüsküler olarak uygulandı ve sıçanlar genel anesteziye alındı (Aydın ve ark., 2008). Sıçanların anesteziye girişi refleks kontrolü yapılarak anlaşıldı.

3.4. Pinealektomi Operasyonunun Yapılması

Pinealektomi operasyonu PLT grubuna yapıldı. Anestezi sonrasında ilk olarak ratların kafa derisi traşlandı. Daha sonra, kafatasının üst kısmından 3cm'lik bir deri insizyonu ile cilt açıldı. Sonrasında sıçanın kafatasındaki lambda-bragma bölgeleri görünür hale getirildi. Kafatasında dişçi turu yardımıyla lambda bölgesinden 3-5 mm çapında açılan daireden kafatası kemiği bir forseple tutularak kaldırıldı ve yaklaşık 60° lik bir açıdan ince uçlu bir forseple pineal bezin bulunduğu bölgeye girilerek pineal bez sap kısmından tutularak alındı (Canpolat ve ark., 2001). Muhtemel kanamalara karşı soğuk suya daldırılmış küçük ebattaki pamuklarla tampon uygulaması yapıldı ve oluşabilecek olan kanamalar engellendikten sonra deri dikilerek kapatıldı. SHAM PLT gruplarına ise pinealektomi operasyonu forseple pineal bezin alınmasına kadar aynı protokolde ve aynı hassasiyette yapıldı fakat bu kısımda forseple pineal bezin sap kısmından tutularak alınması işlemi yapılmadı. Her operasyondan sonra deri insizyonu dikilerek kapatıldı ve pinealektomi operasyonu yapılarak pineal bezleri alınan ratların 30 gün süreyle iyileşmeleri beklendikten sonra deneysel aşamaya geçildi.

3.5. Çekal Bağlama ve Delme Operasyonunun Yapılması

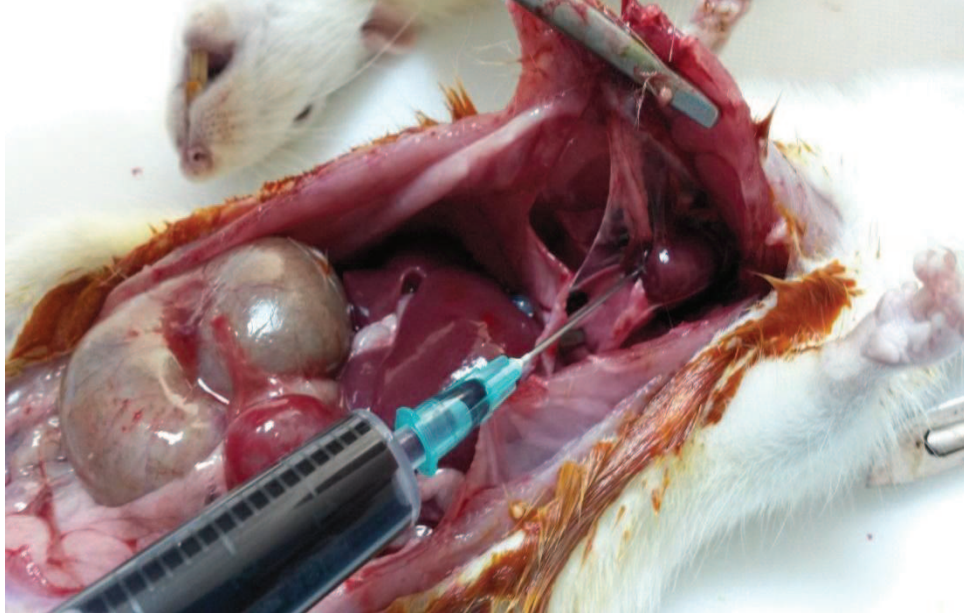
Sıçanlar operasyondan önce 12 saat aç bırakıldı. Anestezi işlemi sonrası ilk olarak karın bölgesi tıraş edildi ve tıraş sonrası % 10'luk povidiniodine ile karın duvarı bakteriyel kontaminasyon olmaması için dezenfekte edildi. Daha sonra karın orta hatta 2 cm kesi yapıldı, çekum izole edildi, ileoçekal valfin hemen distalinde çekum 3-0 ipek iplik ile bağlandı. Çekum, 18 gauge iğne ile 2 farklı yerden delindi, delindikten sonra dışkı dışarı çıkana kadar hafifçe sıkıldı (Resim 1). Daha sonra karın duvarı dikildi, sıçanlar postoperatif bireysel kafeslere alındı. Anesteziden çıktığı belirlenen sıçanlar normal kafeslerine alındı (Olguner ve ark., 2013; Xu ve ark., 2013).



Resim 1. Çekal bağlama ve delme operasyonunun yapılması.

3.6. Kan Örneklerinin Alınması

Kan örnekleri, 21 G 5cc'lik enjektör ile sol ventrikülden 0., 12. ve 24. saatlerde alındı.



Resim 2. Kalpten kan alma işlemi.

3.7. Doku Örneklerinin Alınması

Anestezi altında kalpten kan alınarak hayvanların ölmeleri sağlandı. Karaciğer ve sağ böbrekten doku örnekleri hızlı bir şekilde alındı ve izotonik sodyum klorür ile yıkandıktan sonra RNAaz-free tüplere koyuldu. Bu tüpler tüm sıçanlardan doku örneklerinin alınması işleminin bitimine kadar sıvı azot tankında bekletildi. Tüm sıçanlardan doku örneği alınması bittikten sonra dokular gen ekspresyonlarına bakılana kadar -80°C de saklandı. Analiz kısmında görülebilecek herhangi bir olumsuzluğa karşı her bir dokudan bir de yedeği alınıp -80°C de muhafaza edildi.

3.8. Biyokimyasal Analizler

Çalışmada tüplere alınan kanlar oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kan örneklerinden plazma ayrılarak çalışma gününe kadar -80°C de saklandı. Tekrar dondurma çözme yapılmadı.

Sonuçlar ELX 808 IU model ELISA okuyucusunda okunarak hesaplandı. IL-6, TNF-alfa, IL-1 β ve IL-10 ELISA kitleri için gün içi ve günler arası % CV (varyasyon katsayısı) değerleri $< \%10$ ile < 12 olarak belirlendi.

3.8.1. Plazma TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmada KRC3011 kod numaralı Invitrogen (Ca, USA) ELISA kiti kullanıldı, aşağıdaki basamaklar uygulanarak plazma TNF- α düzeyleri belirlendi.

1. Çalışmadan önce tüm kit reaktifleri, mikrolaka ve örnekler oda ısısına ($18 - 25^{\circ}\text{C}$) getirilinceye kadar bekletildi,
2. Örnekler yüklenmeden önce mikrolaka kuyucuklar 2 kez her kuyucuk için $400\ \mu\text{L}$ yıkama tamponu ($50\ \text{mL}$, 20X yıkama solüsyonu $950\ \text{mL}$ distile su ile sulandırıldı) olacak şekilde yıkandı,
3. Standartlar, örnekler ve blank konulacak kuyucukların yerleri mikrolaka üzerinde belirlendi ve çalışma tablosu üzerine eşleştirilerek, eşleştirilmiş kuyucuklara göre yüklendi,
4. Assay buffer ile seri yıkama yapılarak yedi farklı standart hazırlandı,
5. Standartlar için belirlenen kuyucuklara her bir standarttan $100\ \mu\text{L}$ eklendi,

6. Herbir örnek kuyucuğuna 50 µl, blank olarak belirlenen kuyucuğa ise 100 µl assay buffer eklendi,
7. Belirlenmiş örnek kuyucuklarına 50 µl örnek eklendi,
8. Her bir kuyucuğa 50 µl Biotin-Conjugate solüsyonu eklendi,
9. Mikroplaka film ile kaplandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi,
10. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak 4 kez yıkandı,
11. Her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi,
12. Mikroplaka film ile kaplandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi,
13. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak 4 kez yıkandı,
14. Her bir kuyucuğa 100 µl TMB Substrate Solution eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildi,
15. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 100 µl Stop Solüsyon eklenerek enzim aktivitesi durduruldu,
16. Mikroplaka okuyucuda 450 nm' de okutuldu. Örnekteki TNF-α konsantrasyonunun tespiti için, hazırlanmış “kalibrasyon eğrisi” kullanıldı. Sonuçlar mililitrede pikogram (pg/mL) olarak ifade edildi.
17. TNF-α için intra-assay ve inter-assay % CV değerleri sırasıyla % 5 ile % 10 olarak belirlendi.

3.8.2. Plazma IL-1β Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmada SEA563Ra kod numaralı (USCN, Wuhan, China) ELISA kiti kullanıldı, aşağıdaki basamaklar uygulanarak plazma IL-1β düzeyleri belirlendi.

1. Çalışmadan önce tüm kit reaktifleri, mikroplaka ve örnekler oda ısısına (18 – 25 °C) getirilinceye kadar bekletildi,
2. Örnekler yüklenmeden önce mikroplaka kuyucuklar 2 kez her kuyucuk için 400 µL yıkama tamponu (50 mL, 20X yıkama solüsyonu 950 mL distile su ile sulandırıldı) olacak şekilde yıkandı,
3. Standartlar, örnekler ve blank konulacak kuyucukların yerleri mikroplaka üzerinde belirlendi ve çalışma tablosu üzerine eşleştirilerek, eşleştirilmiş kuyucuklara göre yüklendi,
4. Assay buffer ile seri sulandırma yapılarak yedi farklı standart hazırlandı,
5. Standartlar için belirlenen kuyucuklara her bir standarttan 100 µL eklendi,

6. Herbir örnek kuyucuğuna 50 µl, blank olarak belirlenen kuyucuğa ise 100 µl assay buffer eklendi,
7. Belirlenmiş örnek kuyucuklarına 50 µl örnek eklendi,
8. Her bir kuyucuğa 50 µl Biotin-Conjugate solüsyonu eklendi,
9. Mikroplaka film ile kaplandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi,
10. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak 4 kez yıkandı,
11. Her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi,
12. Mikroplaka film ile kaplandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi,
13. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak 4 kez yıkandı,
14. Her bir kuyucuğa 100 µl TMB Substrate Solution eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildi,
15. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 100 µl Stop Solüsyon eklenerek enzim aktivitesi durduruldu,
16. Mikroplaka okuyucuda 450 nm’ de okutuldu. Örnekteki IL1-β konsantrasyonunun tespiti için, hazırlanmış “kalibrasyon eğrisi” kullanıldı. Sonuçlar mililitrede pikogram (pg/mL) olarak ifade edildi.
17. IL1-β için intra-assay ve inter-assay % CV değerleri sırasıyla % 5 ile % 10 olarak belirlendi.

3.8.3. Plazma IL-6 Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmada SEA079Ra kod numaralı (USCN, Wuhan, China) ELISA kiti kullanıldı, aşağıdaki basamaklar uygulanarak plazma IL-6 düzeyleri belirlendi.

1. Çalışmadan önce tüm kit reaktifleri, mikroplaka ve örnekler oda ısısına (18 – 25 °C) getirilinceye kadar bekletildi,
2. Örnekler yüklenmeden önce mikroplaka kuyucuklar 2 kez her kuyucuk için 400 µL yıkama tamponu (50 mL, 20X yıkama solüsyonu 950 mL distile su ile sulandırıldı) olacak şekilde yıkandı,
3. Standartlar, örnekler ve blank konulacak kuyucukların yerleri mikroplaka üzerinde belirlendi ve çalışma tablosu üzerine eşleştirilerek, eşleştirilmiş kuyucuklara göre yüklendi,
4. Assay buffer ile seri sulandırma yapılarak yedi farklı standart hazırlandı,
5. Standartlar için belirlenen kuyucuklara her bir standarttan 100µL eklendi.

6. Herbir örnek kuyucuğuna 50 µl, blank olarak belirlenen kuyucuğa ise 100 µl assay buffer eklendi,
7. Belirlenmiş örnek kuyucuklarına 50 µl örnek eklendi,
8. Her bir kuyucuğa 50 µl Biotin-Conjugate solüsyonu eklendi,
9. Mikroplaka film ile kaplandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi,
10. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 6 kez yıkandı,
11. Her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi,
12. Mikroplaka film ile kaplandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi,
13. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 6 kez yıkandı,
14. Her bir kuyucuğa 100 µl TMB Substrate Solution eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildi,
15. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 100 µL Stop Solüsyon eklenerek enzim aktivitesi durduruldu,
16. Mikroplaka okuyucuda 450 nm’ de okutuldu. Örnekteki IL-6 konsantrasyonunun tespiti için, hazırlanmış “kalibrasyon eğrisi” kullanıldı. Sonuçlar mililitrede pikogram (pg/ml) olarak ifade edildi.
17. IL-6 için intra-assay ve inter-assay % CV değerleri sırasıyla % 5 ile %10 olarak belirlendi.

3.8.4. Plazma IL-10 Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmada SEA056Ra kod numaralı (USCN, Wuhan, China) ELISA kiti kullanıldı, aşağıdaki basamaklar uygulanarak plazma IL-10 düzeyleri belirlendi.

1. Çalışmadan önce tüm kit reaktifleri, mikroplaka ve örnekler oda ısısına (18 – 25 °C) getirilinceye kadar bekletildi,
2. Örnekler yüklenmeden önce mikroplaka kuyucuklar 2 kez her kuyucuk için 400 µL yıkama tamponu (50 mL, 20X yıkama solüsyonu 950 mL distile su ile sulandırıldı) olacak şekilde yıkandı,
3. Standartlar, örnekler ve blank konulacak kuyucukların yerleri mikroplaka üzerinde belirlendi ve çalışma tablosu üzerine eşleştirilerek, eşleştirilmiş kuyucuklara göre yüklendi,
4. Assay buffer ile seri sulandırma yapılarak yedi farklı standart hazırlandı,
5. Standartlar için belirlenen kuyucuklara her bir standarttan 100 µL eklendi,

6. Herbir örnek kuyucuğuna 50 µl, blank olarak belirlenen kuyucuğa ise 100 µl assay buffer eklendi,
7. Belirlenmiş örnek kuyucuklarına 50 µl örnek eklendi,
8. Her bir kuyucuğa 50 µl Biotin-Conjugate solüsyonu eklendi,
9. Mikroplaka film ile kaplandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi,
10. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak ile 4 kez yıkandı,
11. Her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi,
12. Mikroplaka film ile kaplandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi,
13. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu kullanılarak 4 kez yıkandı,
14. Her bir kuyucuğa 100 µl TMB Substrate Solution eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edildi,
15. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 100 µl Stop Solüsyon eklenerek enzim aktivitesi durduruldu,
16. Mikroplaka okuyucuda 450 nm' de okutuldu. Örnekteki IL-10 konsantrasyonunun tespiti için, hazırlanmış "kalibrasyon eğrisi" kullanıldı. Sonuçlar mililitrede pikogram (pg/mL) olarak ifade edildi.
- 17-IL-10 için intra-assay ve inter-assay % CV değerleri sırasıyla % 5 ile % 10 olarak belirlendi.

3.9. Genetik Analizler

3.9.1. Total RNA İzolasyonu

DeneySEL sürecin sonunda her bir gruba ait sıçanlardan alınarak -80 ° C'de bekletilen doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla dokulardan yaklaşık 25 mg alınarak homojenizatorde (Qiagen Tissue Lyser, Hilden Almanya), yüksek frekansta 10 dk homojenize edildi. Homojenize edilecek dokular 2 ml'lik steril tüplere alındı ve her birine bir adet steril çelik bilye konulduktan sonra cihaza yerleştirilerek dokuların homojenize edilmesi sağlandı. Elde edilen homojenatlardan RNA izolasyon kiti (Ambion Pure Link RNA MiniKit Katolog No:1218301A, Life Technologies, ABD) kullanılarak manuel yolla total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA'ların kalite ve miktar tayini NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak yapıldı ve sonrasında örnekler -80 °C' de saklandı.

3.9.2. cDNA Eldesi

İzole edilen RNA'lar çalışma yapılncaya kadar -80 °C' de bekletildi. Daha sonra spektrofotometre de ölçümü yapılan RNA'lar yoğunluklarına göre steril 0,2 ml'lik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tüplerine konuldu. cDNA eldesi manuel olarak kit yardımıyla yapıldı (High Capacity cDNA Revere Transcription Kit, 200 reaction, ABD).

Total RNA örneklerinden cDNA eldesi işleminin yapılabilmesi için aşağıdaki protokol uygulandı;

Tablo 2. cDNA Sentezi Protokolü

Çözelti/Numune	Miktar
10 x RTbuffer	2 µl
DNTP	0.8 µl
Random Primer	2 µl
Enzim	1 µl
DH ₂ O	4.2 µl
RNA Örneği	10 µl
Toplam	20 µl

Hazırlanan bu karışım PCR tüplerine dağıtıldı ve aşağıda verilen uygun şartlar altında PCR cihazında çalışıldı (Applied Biosystems®) örneklerden cDNA eldesi için PCR cihazında aşağıda verilen protokol uygulandı.

Tablo 3. PCR Koşulları

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dk
37°C	120 dk
85°C	5 dk

3.9.3. Primer Dizileri

Belirlenen genler için primer dizileri hazırlandı ve analiz edildikten sonra çalışıldı. Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.



Tablo 4. Ekspresyon seviyeleri belirlenen genlere ait primer dizileri

Gen	Dizi	TM (°C)	Uzunluk (bp)	GC%
TNF-α Forward	ACTGAAC TTCGGGGTGATCGGT	63.65	22	54.55
TNF-α Reverse	TGGTTTGCTACGACGTGGGCTA	64.18	22	54.55
IL-1β Forward	AATGCCCTCGTGTCTGACCCCAT	66.54	24	54.17
IL-1β Reverse	CCAAGGCCACAGGGATTTTGTTCGTT	65.93	25	52
IL-6 Forward	ACCAC TTCACAAGTCGGAGGCTT	64.22	23	52.17
IL-6 Reverse	CTGACAGTGCATCATCGCTGTTCA	63.67	24	50
IL-10 Forward	AAAAGCAAAGGCAGTGGAGCAGGTG	66.12	24	54.17
IL-10 Reverse	TGGCCTTGTAGACACCTTTGTCTTG	63.17	25	48

TM: Erime Sıcaklıkları, GC%: Guanin-Cytosin Yüzdesi, BP: Baz Çifti Uzunluğu (Wei ve ark., 2013).

3.9.4. Real Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması

Çoğaltılan cDNA örnekleri quantitative real time PCR (The StepOne™ Real-Time PCR System) çalışması için kullanıldı. Syber Green kullanılarak gen ekspresyon seviyeleri analiz edildi (Power SYBR Green PCR Master Mix, 5 ml, Applied Biosystems, İngiltere). cDNA örneklerinden belirlenen genlerin ekspresyon düzeylerini belirlemek için aşağıda verilen protokol uygulandı;

Tablo 5. Real Time PCR Malzeme Miktarları

Bileşenler	Örnek Başına Hacim
SyberGreen Master Mix	10 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
RNAse Free Su	7 µl
cDNA	2 µl
Toplam	20 µl

qRT-PCR yönteminde gen ifade düzeylerine bakılan TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 genlerinin normalizasyonu hamarat (housekeeping gene) gen olan β -actin geni ile yapıldı. Bu çalışmada, kısmi miktarlara dayalı PCR yönteminde bulunan sonuçları doğrulamak için Real-Time PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanıldı. qRT-PCR analizi cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 6. qRT-PCR Sentez Basamak Ayarları

Basamağın Adı	Döngü Sayısı	Zaman	Sıcaklık (°C)
Hold	1	2 dk	50
		15 sn	95
Döngü	40	2 dk	95
E	1	1 dk	60

3.10. İstatistiksel Analiz

Biyokimyasal veriler, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 16.0 (Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirilmiştir. Bulgular ortalama ve standart hata şeklinde verilmiştir. İki grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İki'den fazla grubun karşılaştırmalarında ise Kruskal-Wallis analizi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis analizinde fark bulunması durumunda ikili karşılaştırma testi olarak Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Genetik analizler için qRT-PCR yönteminde elde edilen CP (Crossing points) değerleri düzenlendi. qRT-PCR sonuçlarına istatistiksel analiz yapılırken $2^{-\Delta C_p}$ formülü kullanıldı. ($\Delta C_p = \text{Hedef gen} - \text{Referans Gen}$; Livak ve Schmittgen, 2001). Elde edilen sonuçların yorumlanmasında $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada sıçanlardan SHAM, PLT-CLP ve SHAM PLT-CLP olmak üzere 3 ana grup oluşturuldu. Tüm gruplar 18 adet sıçandan oluştu ve çalışmada toplam 54 adet sıçan kullanıldı. Her bir gruptan rastgele 6 sıçan seçilerek 0., 12. ve 24. saatlerde kan örnekleri alındı ve ötenazi uygulanarak karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri elde edildi. Alınan kan örneklerinden plazma elde edilerek, TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-1 β düzeyleri ölçüldü. Ayrıca böbrek ve karaciğer doku örneklerinden TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-1 β gen ekspresyon düzeyleri belirlendi. Çalışmaya alınan tüm sıçanlar çalışmayı sağlıklı bir şekilde tamamlamış ve araştırma sonucunu etkileyecek herhangi bir olumsuzlukla karşılaşmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular plazmadan ölçülen biyokimyasal parametreler ile karaciğer ve böbrekte belirlenen gen ekspresyon değerleri olarak iki farklı grupta değerlendirilmiştir. Biyokimyasal değerler olarak plazmada TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-1 β , gen ekspresyonu parametreleri olarak karaciğer ve böbrekte TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-1 β değerleri belirlenmiştir.

4.1. Plazmada Belirlenen Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimler

Çalışmada elde edilen kan örneklerinde araştırılan TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-1 β değerlerindeki değişimler aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

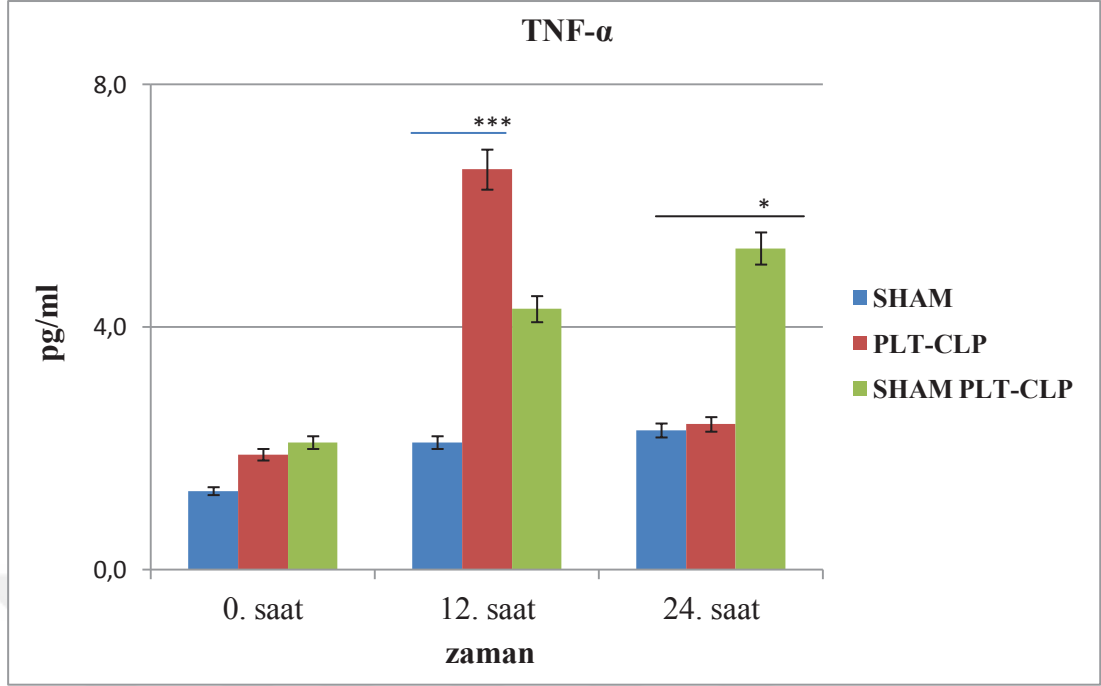
4.1.1. Kan TNF- α Düzeylerindeki Değişimler

TNF- α düzeyleri açısından en düşük düzey SHAM grubunun 0. saatinde 1,3 pg/ml olarak, en yüksek değer ise 6,6 pg/ml olarak PLT-CLP grubunun 12. saatinde tespit edilmiştir.

Tablo 7. Tüm gruplarda plazma TNF- α düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişikliklerin grup içinde karşılaştırılması (*: 0. saate göre $p<0.05$, ***: 0. saate göre $p<0.001$).

Gruplar	Plazma TNF- α düzeyleri (pg/ml)		
	Sepsis öncesi	Sepsis sonrası	
	0.saat	12. saat	24. saat
SHAM	1.3 \pm 0.1	2.1 \pm 0.4	2.3 \pm 0.5
PLT-CLP	1.9 \pm 0.5	6.6 \pm 0.6 ***	2.4 \pm 0.4
SHAM PLT-CLP	2.0 \pm 0.3	4.3 \pm 1	5.3 \pm 0.7 *

TNF- α plazma değerleri incelendiğinde; SHAM grubunda 0. saatte 1,3-2,0 pg/ml değerleri arasında değişen düzeylerin 12. ve 24. saatlerde yine bu düzeylere yakın seyrettiği görülmüştür. PLT-CLP ve SHAM PLT-CLP gruplarında ise özellikle 12. saatlerde TNF- α düzeylerinde artışların olduğu ve bu artışların PLT-CLP grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Diğer taraftan SHAM PLT-CLP grubunun 24. saatinde belirlenen TNF- α düzeyinin aynı grubun 0. Saat değerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 7; $p<0.05$).



Şekil 6. Plazma TNF- α düzeylerinin gruplararası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi (***: SHAM grubuna göre $p < 0.001$; *: SHAM ve PLT-CLP grubuna göre $p < 0.05$).

Plazma TNF- α düzeylerinde meydana gelen değişimler gruplararası karşılaştırıldığında; 0. saatte tüm gruplardaki değerlerin birbirlerine yakın seyrettiği belirlendi. Ancak, PLT-CLP grubunun 12. saat plazma TNF- α değerinde, SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış belirlendi. Diğer taraftan SHAM PLT-CLP grubu 24. saat TNF- α düzeyinde hem SHAM hem de PLT-CLP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 6).

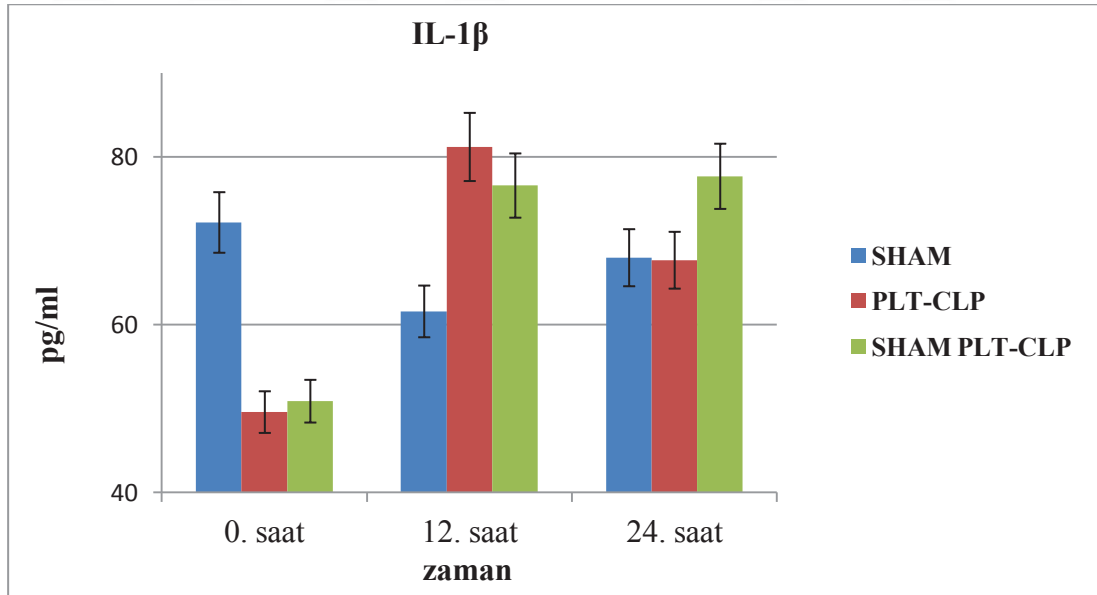
4.1.2. Kan IL-1 β Düzeylerindeki Değişimler

Plazma IL-1 β düzeyleri açısından grupların kendi içerisinde değerler incelendiğinde ve karşılaştırma yapıldığında; SHAM grubu dışındaki diğer iki grupta sepsis sonrası 12. ve 24. saatlerde anlamlı değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. IL-1 β plazma değerleri açısından en yüksek değer PLT-CLP grubunda 12. saatlerde ortaya çıktığı göze çarpmaktadır. PLT-CLP ve SHAM PLT-CLP gruplarının, 12. ve 24. saatlerdeki IL-1 β düzeyleri aynı grupların 0. saatleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$, $p < 0.001$). PLT-CLP grubunda 12. saatte artış gösteren IL-1 β

seviyelerinin 24. saatte tekrar azalmaya başladığı, SHAM PLT-CLP grubunda ise 24. saat IL-1 β düzeylerinin halen yüksek kaldığı anlaşılmıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Tüm gruplarda plazma IL1- β düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişikliklerin grup içinde karşılaştırılması (**: 0. saate göre $p < 0.01$, ***: 0. saate göre $p < 0.001$).

Gruplar	Plazma IL-1 β düzeyleri (pg/ml)		
	Sepsis öncesi	Sepsis sonrası	
	0. saat	12. saat	24. saat
SHAM	72,2 \pm 18,6	61,6 \pm 2,3	68 \pm 6,9
PLT-CLP	49,6 \pm 1,3	81,2 \pm 8,9 **	67,7 \pm 3,9 **
SHAM PLT-CLP	50,9 \pm 3,9	76,6 \pm 6,9 **	77,7 \pm 2,8 ***



Şekil 7. Plazma IL-1 β düzeylerinin gruplararası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi.

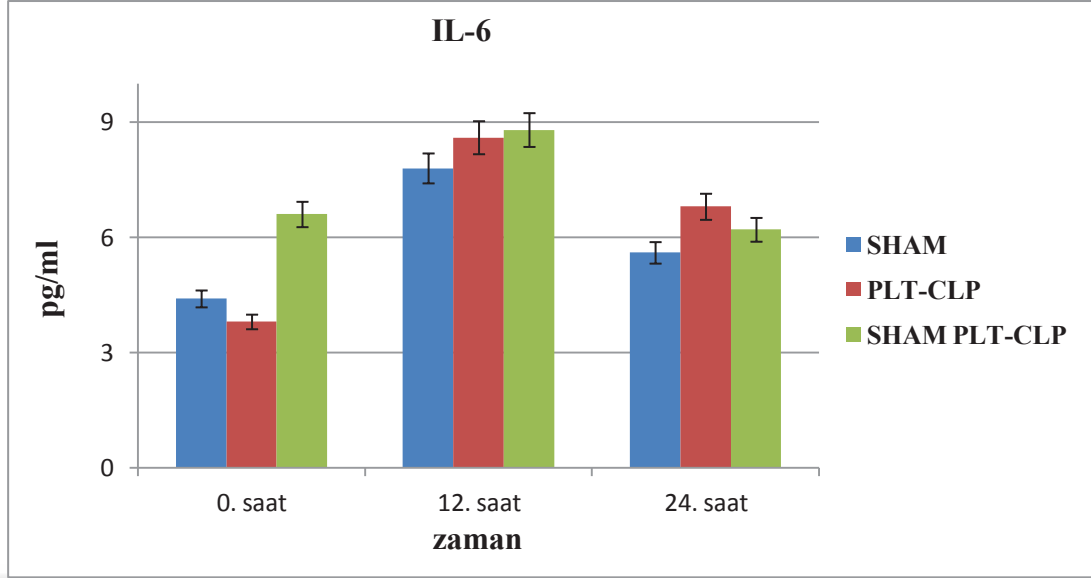
Plazma IL-1 β seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması yapıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. IL-1 β plazma düzeyleri açısından tüm gruplar için en belirgin artışlar 12. Saatte ortaya çıkmıştır. Nitekim 12. saatte SHAM grubunda 61,56 pg/ml olan IL-1 β plazma düzeyi, PLT-CLP grubunda 81,20 pg/ml, SHAM PLT-CLP grubunda ise 76,64 pg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 7).

4.1.3. Kan IL-6 Düzeylerindeki Değişimler

Plazma IL-6 düzeyleri incelendiğinde; tüm gruplarda 12. saatte IL-6 düzeylerinde artışlar olduğu ve bu değerlerin 24. Saatlerde 0. saat düzeylerine yaklaştığı belirlenmiştir. Ancak SHAM ve SHAM PLT-CLP gruplarındaki değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı, PLT-CLP grubunda ise $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı bir yükselme olduğu ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Tüm gruplara ait IL-6 düzeylerindeki değişimleri gösteren veriler Tablo 9'de gösterilmiştir.

Tablo 9. Tüm gruplarda plazma IL-6 düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişikliklerin grup içinde karşılaştırılması (*: 0. saate göre $p < 0.05$).

Plazma IL-6 düzeyleri (pg/ml)				
Gruplar	Sepsis öncesi		Sepsis sonrası	
	0. saat	12. saat	24. saat	
SHAM	4,4 \pm 1,3	7,8 \pm 1,7	5,6 \pm 0,8	
PLT-CLP	3,8 \pm 0,7	8,6 \pm 1,6 *	6,8 \pm 0,9 *	
SHAM PLT-CLP	6,6 \pm 2,6	8,8 \pm 1,7	6,2 \pm 0,7	



Şekil 8. Plazma IL-6 düzeylerinin gruplararası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi.

Plazma IL-6 seviyeleri açısından 0., 12. ve 24 saatlerdeki değerlerin karşılaştırılması yapıldığında ise gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Grupların ortalama değerlerinin birbirlerine yakın olduğu gözlemlenmiş olup tüm verilerin grafiksel gösterimi Şekil 8’de verilmiştir.

4.1.4. Kan IL-10 Düzeylerindeki Değişimler

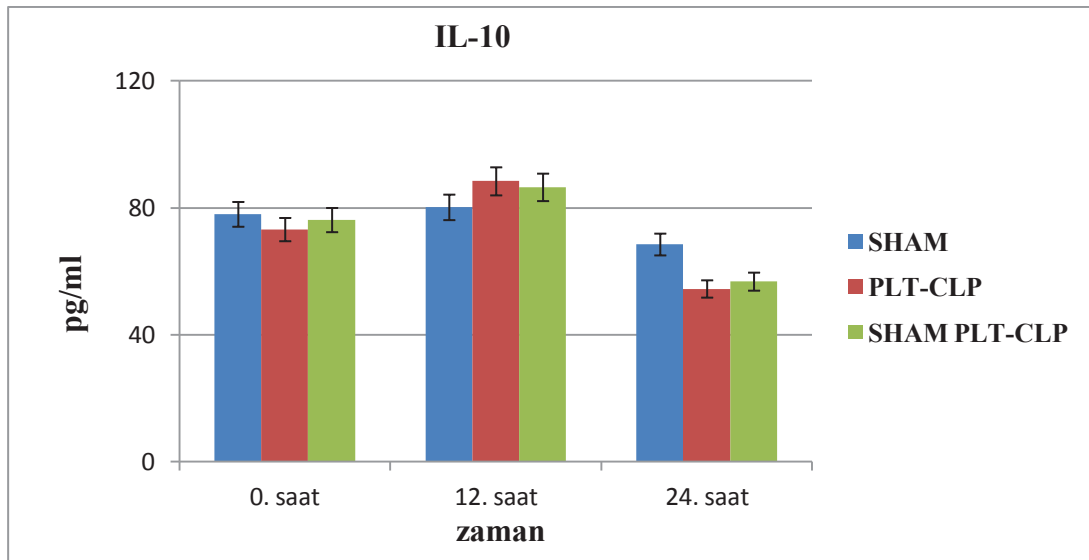
Plazma IL-10 seviyelerinde hem PLT-CLP hem de SHAM PLT-CLP gruplarında 12. saatte 0. saate göre artışların olduğu ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Her iki grupta 24. saat verilerinin ise hem 0. hem de 12. saat verilerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (Tablo10).

PLT-CLP grubunda 73.2 pg/ml olan IL-10 değerinin 12. saatte 88.4 pg/ml’ye ulaştığı ancak 24. saatte ise 54.5 pg/ml değerine düştüğü gözlemlenmiştir. Benzer şekilde SHAM PLT-CLP grubunda da IL-10 düzeyleri sepsis sonrası 24. saatte 56,8 pg/ml düzeyine kadar düşüş göstermiştir.

Tablo 10. Tüm gruplarda plazma IL-10 düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişiklikler ve grup içi karşılaştırılması (*: 0. saate göre $p<0.005$; †: 12. Saate göre $p<0.01$; ‡: 0. Saate göre $p<0.01$; §: 12. Saate göre $p<0.05$).

Gruplar	Plazma IL-10 düzeyleri (pg/ml)		
	Sepsis öncesi	Sepsis sonrası	
	0. saat	12. saat	24. saat
SHAM	78 ± 2,2	80,2 ± 6,6	68,5 ± 3,7
PLT-CLP	73,2 ± 4,7	88,4 ± 8	54,5 ± 6,2 *†‡
SHAM PLT-CLP	76,2 ± 4,2	86,5 ± 11,7	56,8 ± 5 ‡§

Plazma IL-10 değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması yapıldığında ise, saatler itibarı ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. IL-10 düzeyleri tüm gruplarda birbirine çok yakın değerde bulunmuştur. Tüm gruplar için en yüksek IL-10 düzeyi 12. saatte, en düşük değerler ise 24. saatte belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Plazma IL-10 düzeylerinin gruplararası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi.

4.2. Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Bu çalışmada elde edilen karaciğer ve böbrek dokusu örneklerinde TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 gen ekspresyonu düzeylerindeki değişimler incelenmiştir.

4.2.1. Karaciğer Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

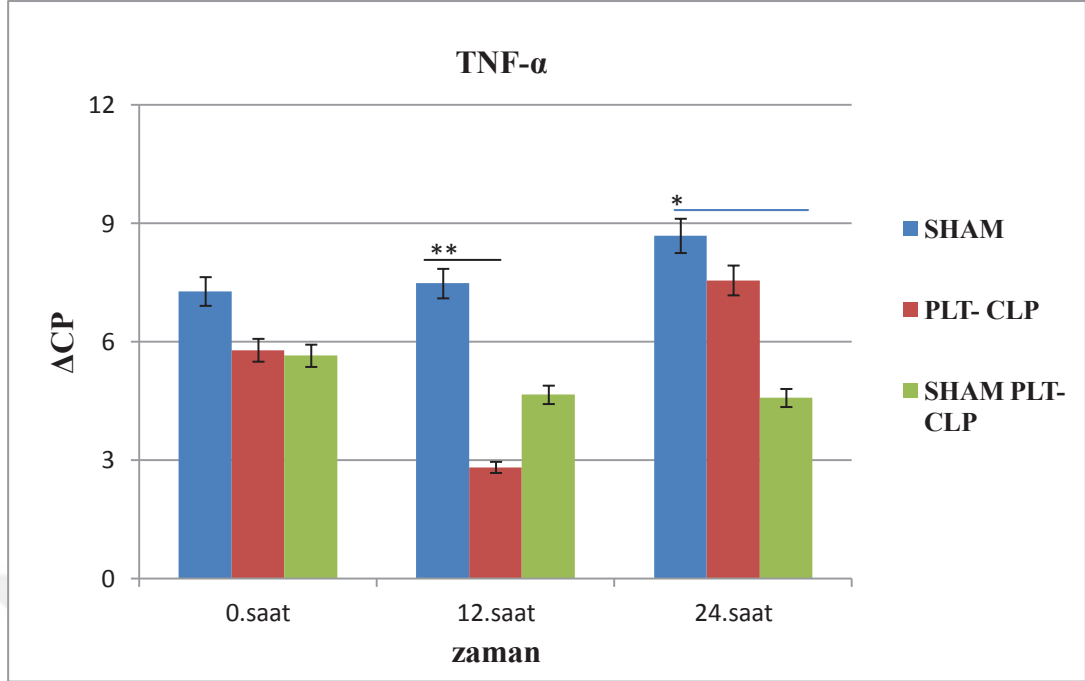
Karaciğer dokusunda TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 için belirlenen gen ekspresyonu düzeylerindeki değişimler aşağıda ayrı ayrı belirtilmiştir.

4.2.1.1. Karaciğer TNF- α Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Karaciğer TNF- α gen ekspresyon düzeyleri açısından grup içi karşılaştırmalar yapıldığında; anlamlı değişimin sadece PLT-CLP grubunda 12. ve 24. saatlerde arasında olduğu belirlenmiştir. PLT-CLP grubu sepsis sonrası 12. saat karaciğer TNF- α gen ekspresyon düzeyi 2.82 seviyesinde tüm grup ve saatler olarak en düşük değeri göstermiştir. SHAM grubunda ise değerler 7.28-8.69 aralığında, SHAM PLT-CLP grubunda ise 5.65-4.58 aralığında değişim göstermiştir (Tablo 11).

Tablo 11. Tüm gruplara ait karaciğer TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması (**: 0. saat ile karşılaştırıldığında $p < 0.01$).

TNF- α gen ekspresyon düzeyleri (Δ CP)				
Gruplar	Sepsis öncesi		Sepsis sonrası	
	0. saat	12. saat	24. saat	
SHAM	7,28 \pm 1,3	7,48 \pm 1,3	8,69 \pm 1,3	
PLT-CLP	5,79 \pm 1,3	2,82 \pm 1,3**	7,56 \pm 1,3**	
SHAM PLT-CLP	5,65 \pm 1,3	4,66 \pm 1,3	4,58 \pm 1,3	



Şekil 10. Karaciğer TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi (**: SHAM grubu karşılaştırıldığında $p < 0.01$, *: SHAM grubu karşılaştırıldığında $p < 0.05$)

Karaciğer TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi gruplar arası istatistiksel değerlendirmesi Şekil 10'da sunulmuştur. Karaciğer TNF- α gen ekspresyon düzeyleri açısından PLT-CLP grubunda belirlenen değerlerin SHAM grubuna göre 12. saatte ($p < 0.01$) istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir. SHAM PLT-CLP grubunda 24. saatte ($p < 0.05$) SHAM grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 10).

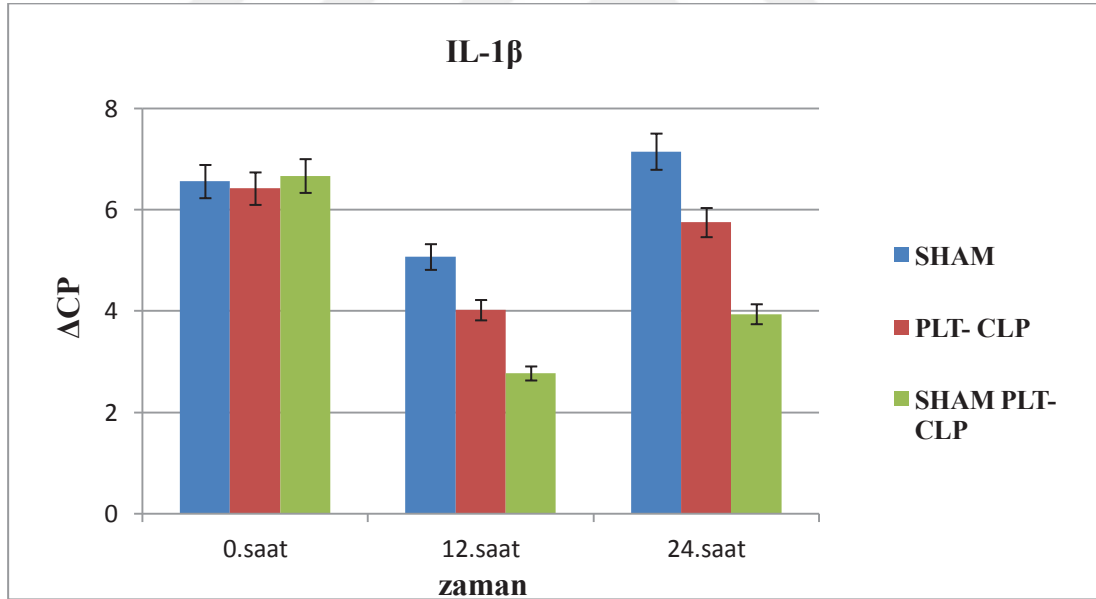
4.2.1.2. Karaciğer IL-1 β Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Karaciğer IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler incelendiğinde; SHAM grubundaki değerlerin tüm saatler boyunca birbirlerine yakın seyrettiği gözlenmiştir. Benzer şekilde PLT-CLP grubunda da değerlerin ortalama 4.02-6.42 aralığında değiştiği anlaşılmıştır. Bu iki gruptan farklı olarak ise SHAM PLT-CLP grubunda 0. Saatte 6.67 olan değer 12. saatte ortalama 2.77 düzeyine kadar indiği ve 24. saatte ise ortalama 3.94 düzeyini gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar

istatistiksel olarak anlamlı olmasa da SHAM PLT-CLP grubunda sepsis sonrası IL-1 β seviyelerinde önemli azalmaların olduğunu göstermiştir (Tablo 12).

Tablo 12. Tüm gruplara ait karaciğer IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması.

Karaciğer IL-1 β gen ekspresyon düzeyleri (Δ CP)				
Gruplar	Sepsis öncesi		Sepsis sonrası	
	0. saat	12. saat	24. saat	
SHAM	6,56 \pm 1,7	5,07 \pm 1,7	7,15 \pm 1,7	
PLT-CLP	6,42 \pm 1,7	4,02 \pm 1,7	5,75 \pm 1,7	
SHAM PLT-CLP	6,67 \pm 1,7	2,77 \pm 1,7	3,94 \pm 1,7	



Şekil 11. Karaciğer IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi.

Karaciğer IL1- β gen ekspresyon değerleri gruplar arası saatlere göre değerlendirildiğinde; 0. saatte tüm gruplara ait değerlerin birbirleri ile benzerlik gösterdiği, 12. saatte tüm gruplarda genel bir azalma ortaya çıktığı ve 24. saat

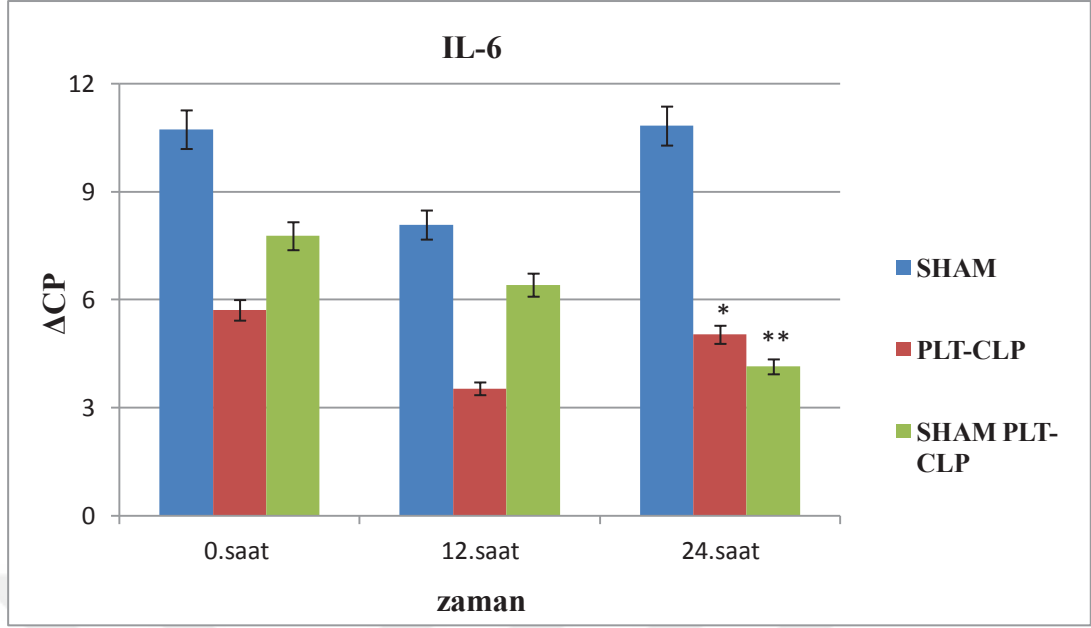
verilerinin ise tekrar 0. saat düzeylerine yaklaşmaya başladığı belirlenmiştir. IL-1 β karaciğer gen ekspresyonu değerlerindeki değişimler Şekil 10’da gösterilmiştir.

4.2.1.3. Karaciğer IL-6 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeyleri açısından her üç grup içerisinde de istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanamamıştır. SHAM grubunda IL-6 gen ekspresyonu değerlerinin tüm çalışma boyunca en yüksek düzeyi gösterdiği belirlenmiştir. PLT-CLP grubunda ise 0. saatte belirlenen gen ekspresyon değeri SHAM grubundaki değer yaklaşık % 50’si kadardır. Bu gruptaki değerlerin çalışma boyunca SHAM grubuna göre yaklaşık % 50 düzeylerinde kaldığı anlaşılmıştır. PLT-CLP grubunda tüm saatler için belirlenen IL-6 gen ekspresyonu değerleri SHAM PLT-CLP grubuna göre de düşük seyretmiştir (Tablo 13).

Tablo 13. Tüm gruplara ait karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması.

Karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeyleri (Δ CP)				
Gruplar	Sepsis öncesi		Sepsis sonrası	
	0. saat	12. saat	24. saat	
SHAM	10,73 \pm 1,8	8,08 \pm 1,8	10,83 \pm 1,8	
PLT-CLP	5,71 \pm 1,8	3,53 \pm 1,8	5,03 \pm 1,8	
SHAM PLT-CLP	7,77 \pm 1,8	6,41 \pm 1,8	4,14 \pm 1,8	



Şekil 12. Karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi (*:SHAM grubuna göre $p<0.05$, **:SHAM grubuna göre $p<0.01$).

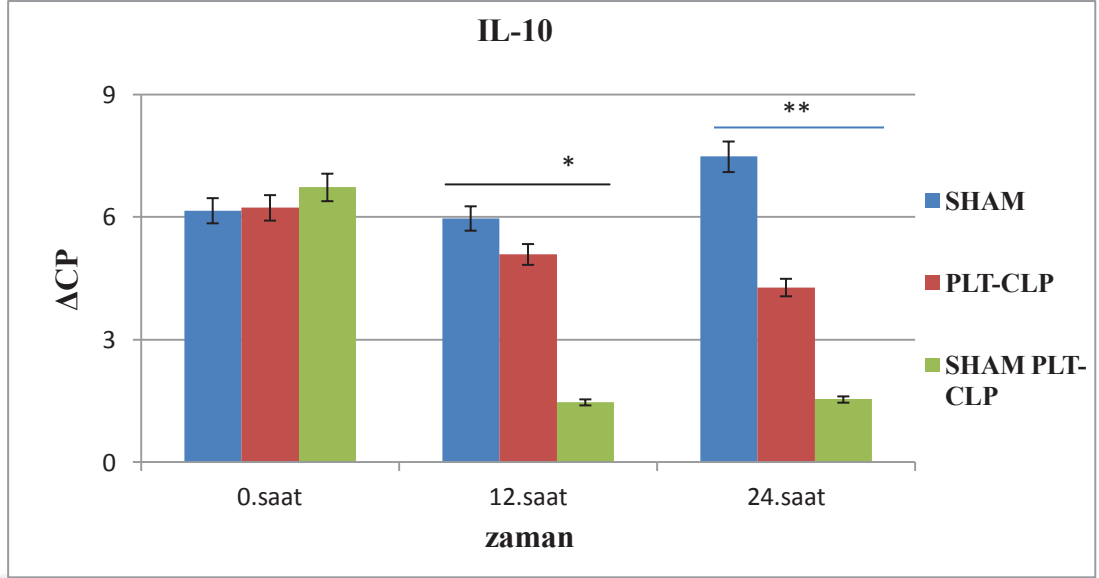
Karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında 0. ve 12. saat değerleri açısından da farklılıklar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler 24. saatte ortaya çıkmıştır. Nitekim PLT-CLP grubu 24. saat IL-6 gen ekspresyon düzeyi SHAM grubunun aynı saatteki değeri ile karşılaştırıldığında $p<0.05$ seviyesinde, SHAM PLT-CLP grubunun 24. saat verisi karşılaştırıldığında ise $p<0.01$ düzeyinde bir azalma göstermiştir (Şekil 12).

4.2.1.4. Karaciğer IL-10 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Karaciğer IL-10 gen ekspresyon seviyesi verileri incelendiğinde, en büyük değişimin SHAM PLT-CLP grubunda olduğu saptanmıştır. Diğer gruplarda anlamlı değişiklikler gözlenmezken bu grupta 0. Saatte 6.73 olan böbrek IL-10 gen ekspresyon düzeyi, 12. saatte 1.47 seviyesine inmiş, 24. saatte ise 1.54 düzeylerinde seyretmiştir (Tablo 14).

Tablo 14. Tüm gruplara ait karaciğer IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması (**: 0. saat ile karşılaştırıldığında $p<0.01$).

Karaciğer IL-10 gen ekspresyon düzeyleri (Δ CP)				
Gruplar	Sepsis öncesi		Sepsis sonrası	
	0. saat	12. saat	24. saat	
SHAM	6,16±1,49	5,97±1,49	7,48±1,49	
PLT-CLP	6,23±1,49	5,09±1,49	4,28±1,49	
SHAM PLT-CLP	6,73±1,49	1,47±1,49**	1,54±1,49**	



Şekil 13. Karaciğer IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi (*:SHAM grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$, **:SHAM grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.01$).

Gruplar arası karaciğer IL-10 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında PLT-CLP ile SHAM PLT-CLP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Ancak SHAM PLT-CLP grubu SHAM grubu ile kıyaslandığında 12. saatte $p<0.05$ düzeyinde, 24. saatte ise $p<0.01$ düzeyinde anlamlı bir azalma ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 13).

4.2.2. Böbrek Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

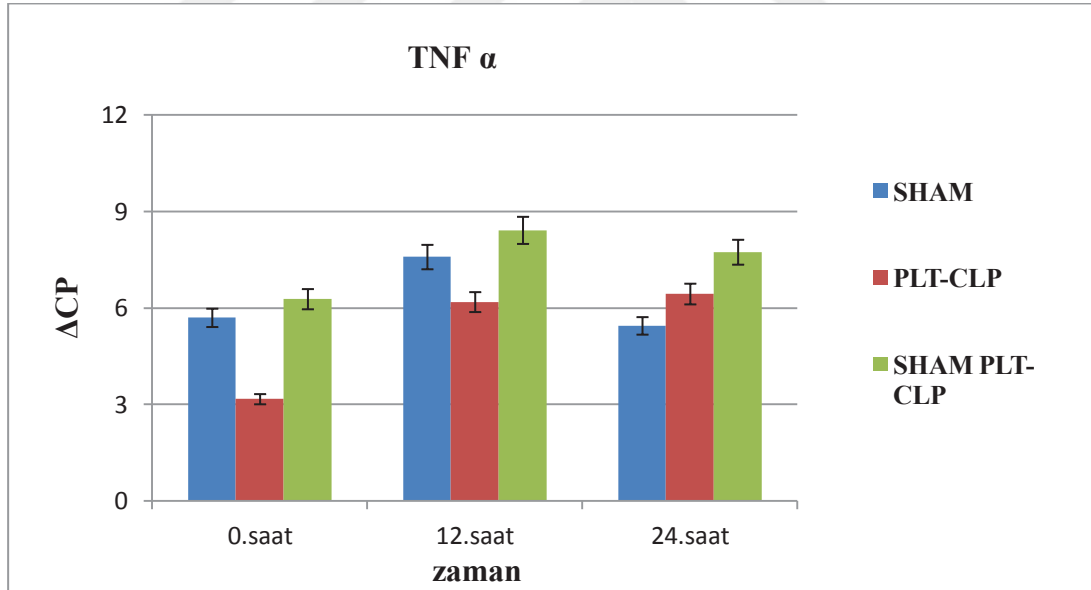
Elde edilen böbrek dokusu örneklerinden de karaciğer dokusunda olduğu gibi TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 gen ekspresyonu düzeylerindeki değişimler araştırılmış olup elde edilen veriler aşağıda ayrı ayrı belirtilmiştir.

4.2.2.1. Böbrek TNF- α Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Böbrek TNF- α gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde en büyük değişimin PLT-CLP grubunda olduğu saptanmıştır. Bu değişim istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 0. saatte 3.17 düzeyinde olan değer yaklaşık 2 katı artarak 12. saatte 6.19 seviyesine ulaştığı ve 24. saatte de benzer bir seviyede kaldığı anlaşılmıştır. SHAM ve SHAM PLT-CLP gruplarında ise anlamlı değişikliklere rastlanılmamıştır (Tablo 15).

Tablo 15. Tüm gruplara ait böbrek TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması.

Böbrek TNF-α gen ekspresyon düzeyleri (ΔCP)			
Gruplar	Sepsis öncesi	Sepsis sonrası	
	0. saat	12. saat	24. saat
SHAM	5,7 \pm 1,37	7,59 \pm 1,37	5,45 \pm 1,37
PLT-CLP	3,17 \pm 1,37	6,19 \pm 1,37	6,44 \pm 1,37
SHAM PLT-CLP	6,28 \pm 1,37	8,42 \pm 1,37	7,74 \pm 1,37



Şekil 14. Böbrek TNF- α gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi.

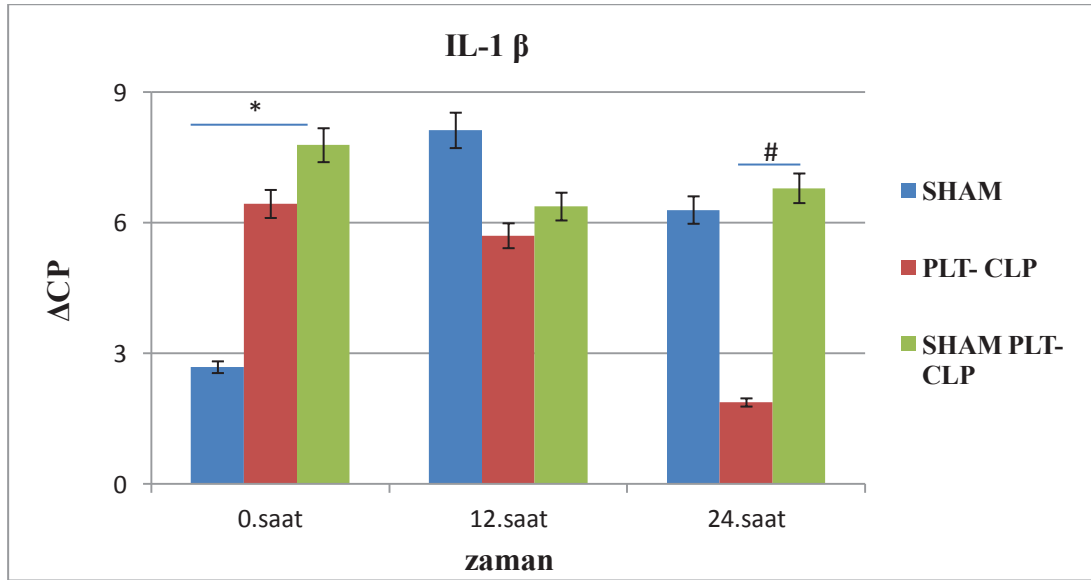
Böbrek TNF- α gen ekspresyon değerleri açısından gruplarda saatlere göre anlamlı değişikliklere rastalanılamamıştır (Şekil 14).

4.2.2.2. Böbrek IL-1 β Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Böbrek IL-1 β gen ekspresyon düzeylerinin grup içi karşılaştırılması yapıldığında, SHAM grubu sepsis öncesi olan 0. saat değerine kıyasla 12. saat ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak artmış olduğu saptanmıştır (Tablo 16; $p<0.05$).

Tablo 16. Tüm gruplara ait böbrek IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması (*:0. Saat ile karşılaştırıldığında $p<0.05$).

Gruplar	Böbrek IL-1 β gen ekspresyon düzeyleri (Δ CP)		
	Sepsis öncesi		Sepsis sonrası
	0. saat	12. saat	24. saat
SHAM	2,69 \pm 1,7	8,13 \pm 1,7*	6,3 \pm 1,7
PLT-CLP	6,44 \pm 1,7	5,71 \pm 1,7	1,88 \pm 1,7
SHAM PLT-CLP	7,79 \pm 1,7	6,38 \pm 1,7	6,8 \pm 1,7



Şekil 15. Böbrek IL-1 β gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi (*:SHAM grubu ile kıyaslandığında $p<0.05$, #: PLT-CLP grubu ile SHAM PLT-CLP grubu kıyaslandığında $p<0.05$).

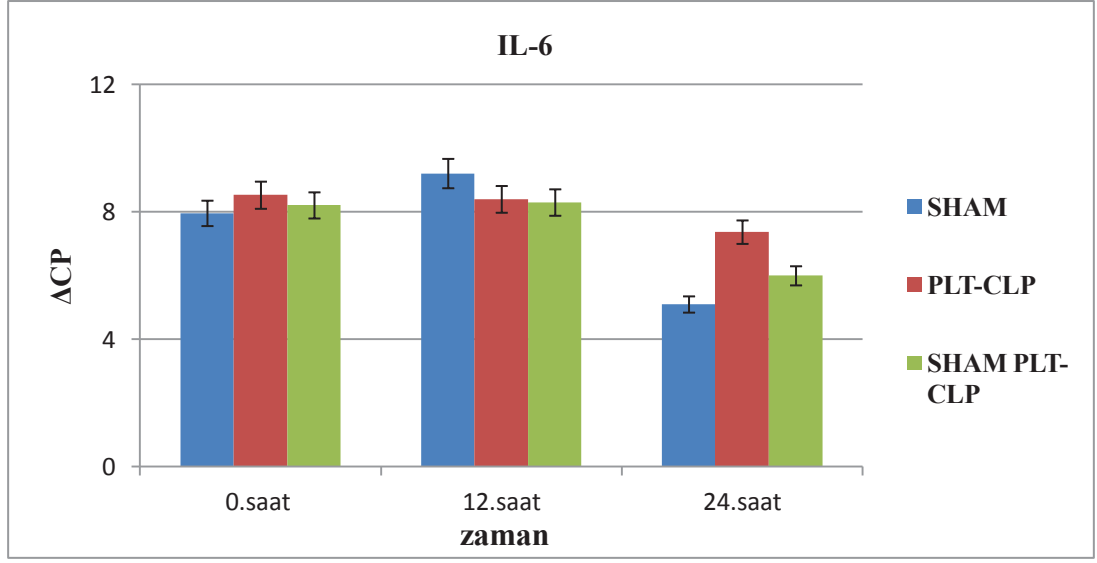
Böbrek IL-1 β gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması yapıldığında, 0. Saatte SHAM grubu ve SHAM PLT-CLP grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır. PLT-CLP grubu 24. saat ve SHAMPLT-CLP grubu 24. saat gen ekspresyon verileri kıyaslandığında PLT-CLP grubu seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır (Şekil 15).

4.2.2.3. Böbrek IL-6 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeyleri açısından grup içinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Tablo 17. Tüm gruplara ait böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması.

Böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeyleri (ΔCP)			
Gruplar	Sepsis öncesi		Sepsis sonrası
	0. saat	12. saat	24. saat
SHAM	7,96 \pm 1,8	9,21 \pm 1,8	5,1 \pm 1,8
PLT-CLP	8,53 \pm 1,8	8,4 \pm 1,8	7,37 \pm 1,8
SHAM PLT-CLP	8,21 \pm 1,8	8,3 \pm 1,8	6 \pm 1,8



Şekil 16. Böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi.

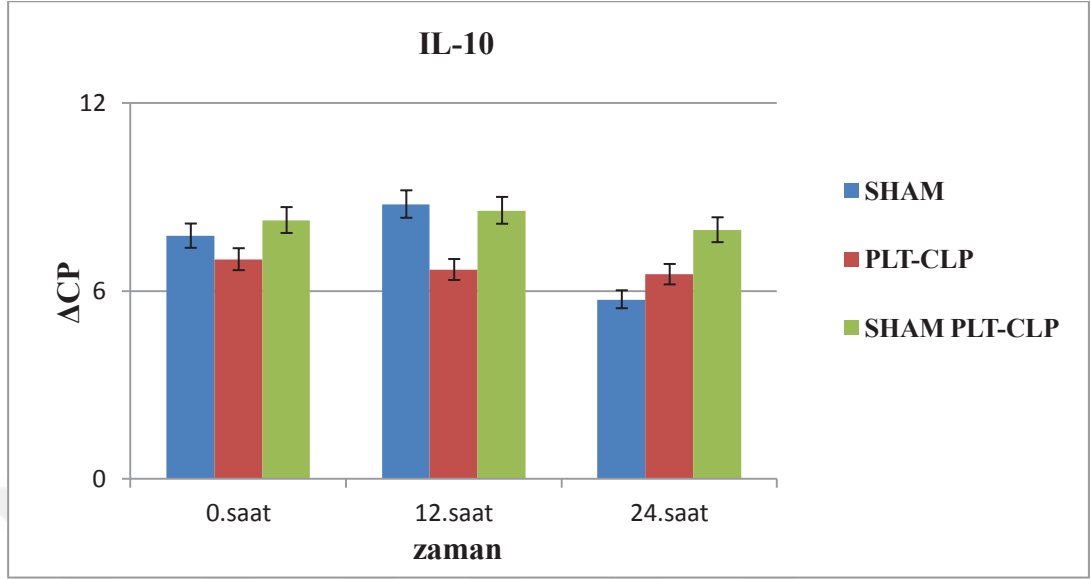
Benzer şekilde böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında saatlere göre de anlamlı değişiklikler belirlenememiştir (Şekil 16).

4.2.2.4. Böbrek IL-10 Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

Böbrek IL-10 gen ekspresyon seviyeleri tüm gruplarda birbirine yakın değerlerde saptanmıştır (Tablo 18).

Tablo 18. Tüm gruplara ait böbrek IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler ve grup içi karşılaştırılması.

Gruplar	Böbrek IL-10 gen ekspresyon düzeyleri (ΔCP)		
	Sepsis öncesi		Sepsis sonrası
	0. saat	12. saat	24. saat
SHAM	7,76±1,4	8,77±1,4	5,73±1,4
PLT-CLP	7,01±1,4	6,68±1,4	6,53±1,4
SHAM PLT-CLP	8,26±1,4	8,57±1,4	7,95±1,4



Şekil 17. Böbrek IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi.

Böbrek IL-10 gen ekspresyon değerleri açısından gruplarda ortaya çıkan değişimler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır (Şekil 17).

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada pinealektomi sonrası CLP yapılan sıçanlarda kan TNF alfa, IL1 beta, IL-6 ve IL-10 düzeyleri ile bu sitokinlerin karaciğer ve böbrek dokusundaki gen ekspresyon değerleri ilk kez belirlenmiştir.

Pinealektomi operasyonu melatonin yoksunluğu oluşturmak amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır (Simko ve ark., 2013). Operasyon ile pineal bez çıkarılmakta ve melatoninin esas salgılanma kaynağı olan bez ortadan kaldırılmaktadır. Operasyon sıçanların anatomik yapısı gereği oldukça kolay ve hayvanda fizyolojik işlevlerini etkileyebilecek herhangi bir travmatik etki oluşturmadan gerçekleştirilebilen bir işlemdir. Ancak pinealektomi sonrası melatonin yoksunluğunun tam olarak ortaya çıkması için bir süre beklenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada literatür bilgisi dikkate alınarak pinealektomi sonrası 30 gün beklenerek SHAM PLT veya PLT işlemleri uygulanmıştır (Canpolat ve ark., 2001).

Sepsis modeli olarak ise CLP yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem cekumun öncelikle bir sütür ile bağlanması ve daha sonra belli ölçüleri olan bir iğne ile delinmesi, böylelikle bağırsak florasındaki mikroorganizmaların karın boşluğu ve peritona bulaşmasının sağlanması esasına dayanan bir yöntemdir (Yang ve ark., 2002). Bu işlem sonrasında hayvanlarda güçlü bir peritonit ve sepsis tablosu şekillenmesi beklenmektedir. Bu çalışmada karaciğer ve böbrek örneği almak üzere karın bölgesi açılan tüm CLP yapılan hayvanlarda çekum ve peritonun enfekte olduğu, nekroze odaklar bulunduğu, bakteriyemiye bağlı olduğu düşünülen kötü bir koku yayıldığı gözlemlenmiştir. Bu bulguların gözlemlendiği tüm hayvanlarda sepsis olduğu kabul edilerek doku örnekleri alınmıştır.

Sepsis modeli oluşturmak için CLP yönteminin seçilmesinin nedeni olarak bu modelin diğer modellere göre avantajları olması ve literatür bilgilerine göre çok tercih ediliyor olması dikkate alınmıştır. Bu model sitokin araştırmalarında altın standarda sahip bir model olarak bilinmektedir (Dejager ve ark., 2011). CLP modelinde sonuçları etkileyen en önemli faktör olarak ligasyonun derecesi, delme yapılan iğnenin büyüklüğü ve delik sayısı olduğu belirtilmektedir (Otero-Anton ve ark., 2001; Singleton ve Wischmeyer, 2003).

Literatür bilgisindeki bu farklılıklar dikkate alınmış ve çalışmamızda 18 Gauge iğne ile çekum iki farklı yerden delinerek ve ayrıca hafif düzeyde barsak içeriğinin dışarı çıkması sağlanarak deneysel CLP modeli gerçekleştirilmiştir. Uyguladığımız yöntem Xu ve ark. (2013)'nin yöntemine göre belirlenmiştir. Genellikle 16-25 Gauge iğne kullanıldığı belirtilmesine rağmen 18 Gauge iğnelerin daha fazla kullanıldığı anlaşıldığından bu büyüklükteki iğneler tercih edilmiştir (Wu ve ark 2008; Olguner ve ark., 2013). CLP uygulamasında dikkat edilecek bir diğer nokta ise tüm hayvanlarda çekumlara aynı sayı ve büyüklükte delik açılması gerektiğidir. Bu nedenle işlemlerin tamamı aynı kişi tarafından gerçekleştirilmiştir.

Sepsis modeli oluşturulan çalışmalarda genellikle proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışmada proinflamatuvar sitokinler olarak, TNF alfa, IL-1beta ve IL-6, antiinflamatuvar sitokin olarak ise IL-10 kan düzeyleri ile karaciğer ve böbrek gen ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

Sepsis enfeksiyona karşı verilen sistemik enflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizma ve konakçı ile karşılaşması sonrasında doğal bağışıklık süreçleri başlayarak mononükleer hücreler tarafından proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması uyarılır. Bu amaçla IL-1, IL-6 ve TNF alfa gibi sitokinler salgılanır (Chaudhry ve ark., 2013).

İnflamatuvar süreçler ve melatonin ilişkisi son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bu amaçla bir çok in vivo çalışma yapılmış olup melatoninin yeni doğanlarda septik şoka karşı faydalı etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Gitto ve ark., 2001). Melatoninin bu etkisi nedeni ile ileride insanlarda septik şokun tedavisinde yardımcı bir ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırılması öngörülmüştür.

Melatonin ve sepsis üzerine etkileri konulu birçok hayvan çalışması yapılmış olup bu çalışmalarda daha çok sıçan ve fareler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda da melatoninin hayatta kalma oranının artırdığı, NO üretimini azalttığı ve proinflamatuvar/antiinflamatuvar sitokin salgılanmasını düzenleyici etki gösterdiği belirtilmiştir (Carrillo-Vico ve ark., 2005; Huang ve Li 2016). Bu çalışmalar genel olarak incelendiğinde melatonin ilavesinin proinflamatuvar/antiinflamatuvar sitokin düzeyleri üzerine etkilerinin araştırıldığı görülmektedir. Melatonin yoksunluğu

oluşturulan çalışmalara rastlanılmamıştır. Ancak melatonin reseptör antagonisti uygulanarak yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sepsis modeli oluşturulmuş ve MT1 ve MT2 reseptör antagonisti olarak luzindole kullanılarak melatoninin etkileri araştırılmıştır (Yu ve ark., 2000; Zhou ve ark., 2003; Fink ve ark., 2014). Bu çalışmaların çıkış noktası daha çok sezonal ışık düzeylerindeki değişimlerin immun fonksiyonlar üzerine olan etkileri olmuştur. Kısa ve uzun günlerin immun işlevleri etkilediğine dair bir çok bildirim bulunmaktadır (Nelson ve Demas 1996; Champeney ve ark., 1998). Bu araştırmada ise gün değişimlerinin yanısıra uzun süreli melatonin salgılanmasını baskılayacak sürekli ışık vb. bir etkiye maruz kalmanın sepsis üzerine proinflamatuvar/antiinflamatuvar sitokinler yönünden nasıl bir etki oluşturacağına araştırılması hedeflenmiştir.

Kan sitokin düzeyleri açısından bakıldığında çalışma sonunda bütün parametreler yönü ile istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin olduğu gözle çarpılmaktadır. Bu çalışmada proinflamatuvar sitokin olarak TNF alfa, IL-1 beta ve IL-6 düzeyleri belirlenmiştir.

TNF alfa yönünden bakıldığında sepsis öncesi (0. saat) belirlenen değerlerin 1.3-2.0 pg/ml arasında değiştiği ancak sepsis sonrası 12. Saatte bu değerlerin 2.1-6.6 pg/ml arasında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. TNF alfa değerlerinin CLP yapılan her iki grupta da hem kontrol hem de kendi 0. Saat değerlerine göre anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. TNF alfa düzeyleri açısından bakıldığında 12. saatte PLT yapılan grupta PLT yapılmayan gruba göre yaklaşık % 50 daha fazla bir artış olduğu görülmektedir. Ancak 24. saatte bu değer kontrol grubu değerine yaklaşmışken SHAM PLT grubunda 12. saate göre daha da yükseldiği görülmektedir.

IL 1 Beta seviyeleri hem PLT hem de PLT yapılmayan ancak CLP yapılan her iki grup açısından incelendiğinde CLP sonrası değerlerde istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu anlaşılmaktadır. TNF alfa düzeylerine benzer şekilde PLT-CLP grubunda 12. saatteki artış daha yüksek olmuş ve bu değer 24. saatte kontrol grubundaki değere yaklaşmıştır. IL 1 beta açısından en yüksek değer PLT-CLP grubunda 12. saatte 81.2 pg/dl olarak ölçülmüştür.

Diğer bir proinlamatuar sitokin olan IL-6 değerleri açısından elde edilen sonuçlar TNF alfa ve IL-1 beta sonuçlarına benzemekle beraber bazı farklılıklar da ortaya çıkmıştır. Yine IL-6 seviyelerinde de en yüksek artış 0. dakika değerine göre iki katından daha fazla düzeyde olacak şekilde PLT-CLP grubunda ortaya çıkmıştır. Ancak aynı grubun 24. saat IL-6 değeri de diğer gruplara göre daha yüksek seyretmiştir.

CLP sonrası her iki grupta TNF alfa, IL-1 beta ve IL-6 düzeylerindeki artışlar literatür bilgileri ile uyumluluk göstermektedir. Proinlamatuar sitokin olan TNF alfa, IL-1 beta ve IL-6 düzeylerinin CLP sonrası artması sepsis modelinin oluştuğunun bir göstergesi olarak düşünülebilir.

Benzer çalışmalarda Huang ve Li (2016) CLP yaptıkları sıçanlarda TNF alfa düzeylerinin arttığını belirlemişlerdir. Yine Fink ve ark., (2014) sıçanlarda ve farelerde yapmış oldukları çalışmada, CLP uygulamasından sonra TNF alfa seviyesinin arttığını belirlemişlerdir. Huang ve Li (2016) tarafından yine sıçanlar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada da benzer veriler elde edilmiş olup, CLP sonrası TNF alfa ve IL-6 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Huang ve Li 2016). Sıçanlar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada ise deneysel CLP modeli oluşturulmuş ve plazmada IL-1 beta düzeyleri ile karaciğer ve akciğer histopatolojik olarak incelenmiştir. Melatonin verilerek CLP sonrası 3. ve 6. saatlerdeki IL-1 beta seviyeleri incelendiğinde melatoninin IL1-beta düzeylerini azalttığı anlaşılmıştır. CLP grubundan daha düşük belirlenen IL1 beta düzeylerinin kontrol grubuna göre ise daha yüksek seyrettiği anlaşılmıştır (Wu ve ark., 2008).

Sepsiste karaciğer en çok etkilenen organlardan birisi olarak bilinmektedir (Beal ve Cerra 1994). Bu nedenle deneysel sepsis çalışmalarında karaciğer incelenen başlıca organ olarak dikkati çekmektedir. Çünkü karaciğer metabolizması sepsiste değişmekte, karaciğer Kupfferr hücreleri hem bakterilerin hem de bakteriyel ürünlerin deaktive edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Diğer taraftan sitokinler de hepatosit hücrelerinin metabolik etkinliklerini değiştirmektedir (Dhainaut ve ark., 2001).

Sepsiste karaciğer hasarı görülme oranının % 34.7 gibi yüksek bir değere ulaştığı söylenmektedir (Kobashi ve ark., 2013). Karaciğer enerji metabolizmasının ana düzenleyici organı olmasının yanısıra sitokin üreten önemli bir organ olarak ta bilinmektedir (Cai ve ark., 2016). Karaciğerden TNF alfa ve IL-6 üretiliyor olmasının yanında bu iki madde aynı zamanda karaciğerde rejenerasyon da yapmaktadır (Galun ve Axelrod 2002). Karaciğer üzerine etkileri en fazla bilinen sitokin TNF alfa'dır. Karaciğer hasarlarında TNF alfa ekspresyonlarında artış olduğu, hem akut hem de kronik karaciğer hasarlarında ise TNF alfa reseptörlerinin gen ekspresyonlarının da arttığı belirtilmektedir (Wolf ve ark., 2001). Karaciğerde sitokin üretimi barsaklardan salınan Lipopolisakkarid gibi bakteriyel endotoksinlerin portal ven yoluyla karaciğere ulaşması ile de uyarılabilir. Bu endotoksinlerin Kupffer hücrelerini aktive ederek TNF alfa ve IL-6 sentezini ve salgılanmasını uyardığı bilinmektedir (Koo ve ark., 1999). Araştırmacılar IL-1 beta ve TNF alfa gibi sitokinlerin mRNA ekspresyonlarındaki artışı hayvan modellerinde Kupffer hücrelerinin aktivasyonunun bir göstergesi olarak kabul ederler (Koo ve ark., 1999; Roland ve ark., 1994).

Karaciğerin sepsisteki önemi ve sitokinlerle olan karşılıklı etkileşimine dair literatür bilgileri dikkate alınarak bu çalışmada karaciğer sitokinlerinin gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu sitokinler de yine literatür bilgileri dikkate alınarak belirlenmiştir. Bu amaçla TNF alfa, IL1 beta, IL 6 ve IL 10 seçilmiştir.

Karaciğer IL1 beta yönünden mRNA ekspresyonlarında azalmalar ortaya çıkmış olmasına rağmen istatistiksel anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Hem PLT hem de SHAM PLT gruplarında sepsis sonrası IL1 beta ekspresyon düzeyleri 12. ve 24. saatlerde kontrol grubuna göre düşük seyretmiştir.

TNF alfa gen ekspresyonu değerlerinde ise 12. saatte PLT-CLP, 24. saatte ise SHAM PLT-CLP grubundaki değerlerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. CLP yapılan her iki gruptaki değerlerin birbirlerine yakın olduğu ve kontrol grubuna göre daha düşük olduğu anlaşılmaktadır.

Bir diğerk proinflatuar sitokin olan IL-6 karaciğerk gen ekspresyonu değerlerine bakıldığında SHAM PLT grubunda 12. ve 24. saatlerde anlamlı azalmalar ortaya çıkmıştır.

Karaciğerk IL-10 gen ekspresyonu değerleri açısından PLT grubundaki veriler ile SHAM PLT grubundaki veriler benzerlik gstermiştir. Her iki grupta da kontrol grubuna gkre 12. saatte anlamlı azalma ortaya çıkmış, bu azalma 24. saatte çok daha dikkat çekici bir düzeye ulaşmıştır. Bu sonuçlar karaciğerk IL-10 gen ekspresyonu üzerine PLT operasyonundan ziyade sepsisin etkili olduğunu düşündürmektedir.

TNF alfa, IL1 beta, IL 6 ve IL 10 olarak tüm parametrelerin karaciğerk gen ekspresyonu verileri açısından değerlendirildiğinde sepsisin daha önemli olduğu, melatoninin yoksunluğunun bu parametreleri etkilemediği anlaşılmaktadır. Melatoninin bu parametreler üzerine olan etkileri daha çok melatonin verilerek yapılmış çalışmalardır. Melatoninin ilave olarak verilmesi ile yoksunluğunun oluşturulması arasında immun sisteme olan etkileri yönünden farklar bulunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar melatonin yoksunluğunun sepsiste karaciğerk TNF alfa, IL1 beta, IL 6 ve IL 10 gen ekspresyonu düzeyleri üzerine anlamlı etkiler oluşturmadığını gstermektedir. Diğerk taraftan Cai ve ark. (2016) sıçanlarda CLP yöntemi kullanarak oluşturdukları sepsiste NO metabolizmasını etkileyen bir ajan olarak sitrullini kullanmışlardır. Sitrullin uygulanan grupta en yüksek artışlar sepsis sonrası 12. ve 24. saatlerde ortaya çıkmışken CLP grubunda en yüksek artışlar 6. Saatte gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise 6. saat verileri alınmamıştır. Dolayısı ile sepsis sonrası TNF- α , IL1- β , IL 6 ve IL 10 değişimlerinin 12. saatten önce ortaya çıktığı ve buna bağlı olarak elde edilen sonuçlara ulaşıldığı düşünülebilir.

Sepsiste etkilenen bir diğerk organ olan böbrekle ilgili yapılan bir çalışmada CLP sonrası tubular epitelyal nekroz ve dilatasyon, hemoraji ve intertisyel inflamasyon belirtileri gözlenmiştir (Başol ve ark., 2016).

Böbrek TNF- α , IL1- β , IL 6 ve IL 10 gen ekspresyonu değerlerinde verilerin tümü açısından herhangi bir istatistiksel anlamlı değişiklik belirlenmemiştir. Bu durum sepsisten böbreklerin sepsis sonrası 12. ve 24. saatlerde ya hiç etkilenmediğini ya da böbreklerin söz konusu sitokinler açısından sepsiste söz konusu saatler

içerisinde herhangi bir yanıt oluşturmadığını düşündürebilir. Böbrek işlevlerini ortaya koyan farklı herhangi bir parametre belirlenmediğinden elde edilen sonuçların yukarıdaki hangi hipoteze göre değişmediğini söyleyebilmek mümkün gözükmemektedir.

Gerek deneysel sepsis oluşturulan ve gerekse sepsis geçiren insanlarda TNF- α düzeylerinin artmış olması bu durumu değiştirebilecek moleküllerin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla etkileri araştırılan moleküllerden bir tanesi de bağışıklık sistemini etkilediği bilinen melatonin olmuştur.

Yoğun bakım ünitelerinde yatan uyanık hastalar ile sepsis nedeni ile hayati tehlikesi olup uyutulmak zorunda olun hastalarda bozulan sirkadiyen ritmin melatonin üzerinden sepsisi nasıl etkileyebileceği konusu bilim adamlarının dikkatini çekmiştir (Mundigler ve ark., 2002; Bourne ve Mills 2006). Nitekim Li ve ark.,(2012) yoğun bakım ünitelerinde yatan septik hastalarda TNF- α ve IL-6 seviyeleri ile melatonin salgılanma ritmi arasında bir ilişki belirlemişlerdir. (Li ve ark., 2013)

Farelerde yapılan bir çalışmada ise CLP işleminden sonra melatonin verilen grupta TNF- α seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (Volt ve ark., 2016). Yine, An ve ark. (2016) sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada CLP sonrası serum TNF- α düzeylerinde ortaya çıkan anlamlı artışların CLP sonrası melatonin verilen grupta azalma gösterdiğini belirlenmiştir (An ve ark., 2016).

Melatonin antiinflamatuvar bir molekül olarak bilinir. Bu etkisini oksidatif doku hasarını azaltmanın yanında seçici olarak kronik yangıyı azaltıcı etkileri ile de gerçekleştirdiği belirtilmektedir (Carrillo-Vico ve ark., 2005; Shang ve ark., 2009).

Bu çalışmada melatonin ilavesinden ziyade melatonin yoksunluğu oluşturmak amacı ile pinealektomi yapılan sıçanlar kullanılmıştır. Kan TNF alfa düzeylerine bakıldığında en yüksek artışın PLT grubunda CLP sonrası 12. saatte ortaya çıktığı görülmüştür. Bu sonuç melatonin yoksunluğunun TNF alfa seviyelerinde anlamlı bir artışa yol açtığını göstermekte ve literatür bilgileri ile örtüşmektedir. Ancak 24. saatte TNF alfa seviyeleri kontrol grubundaki değerlerine yaklaşmıştır. Oysa aynı saatte PLT yapılmayan CLP grubunda TNF alfa seviyeleri daha da artış göstermiştir.

Bu farklılığın nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde PLT-CLP grubunda yangısel süreçlerin PLT yapılmayan CLP grubuna göre daha önce ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Melatonin ve immün sistem ilişkisinin iki yönlü olduğu konusunda bildirimler bulunmaktadır (Carrillo-Vico ve ark. 2013). Bu iki yönlü etkiye göre melatonin sitokin düzeylerini etkilerken sitokinler de melatonin düzeylerini etkilemektedirler. Sitokinlerin melatonin düzeyleri üzerine olan etkisi; sitokinler, prostaglandinler ve histamin gibi yangısel mediatörlerin kan beyin bariyeri dışında olduğu için pineal bezde kolayca ulaşmaları sonucunda ortaya çıkmaktadır (Achumnarnkul ve ark., 1990; Voisin ve ark., 1993; Fabris, 1994; Mucha ve ark., 1994; Zawilska ve ark., 1997; Markowska ve ark., 2000). Bu sitokinler içerisinde IL-1 beta'nın pineal bezde arilalkilamin N asetil transferaz ekspresyonunu azaltarak melatonin salınımını ve etkilerini sınırlandırabildiği ortaya konulmuştur (Herman ve ark., 2015).

Bu çalışmada gerek kontrol grubunda ve gerekse SHAM PLT grubunda pineal bez çıkarılmadan sepsis modeli gerçekleştirilmiştir. PLT grubunda ise pineal bez çıkarılmıştır. Dolayısı ile belirlenen sitokinler veya CLP sonrası ortaya çıkan ancak bu çalışmada düzeyleri belirlenmeyen tüm diğer sitokinler ile melatonin sekresyonu açısından gruplar arasında bir farklılık ortaya çıkmış olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Karaciğer ve böbrek örneği almak üzere karın bölgesi açılan tüm CLP yapılan hayvanlarda çekum ve peritonun enfekte olduğu, nekroze odaklar bulunduğu, bakteriyemiye bağlı olduğu düşünülen kötü bir koku yayıldığı gözlemlenmiş olup uygulanan CLP yönteminin sepsise oluşturmak için yeterli olduğu anlaşılmıştır,
- Pinealektomi yapılan gruplarda sepsis belirteci olarak kanda belirlenen parametrelerin PLT yapılmayan gruba göre genel olarak 12. saatte artış gösterdiği anlaşılmıştır. PLT yapılmayan gruplarda ise bu parametrelerin daha çok 24. saatlerde yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu durum melatonin yoksunluğunda sepsise daha erken girilebileceğini düşündürmektedir,
- Karaciğer TNF- α ve IL-6 gen ekspresyonu düzeylerinde PLT grubunda 12. saatte ortaya çıkan azalma 24. saatlerde yükselmeye başlamış olmasına rağmen SHAM PLT-CLP grubunda hala düşmeye devam etmektedir. Bu sonuçlar da karaciğerin PLT grubunda 12. saat öncesinde daha fazla etkilendiğini düşündürmektedir,
- Böbreklerin ise sitokin üretimi açısından ilk 24 saatlerde sepsisten çok etkilenmediğine dair bulgulara ulaşılmıştır,
- Bu sonuçlara göre herhangi bir şekilde melatonin yoksunluğu oluşan insanlarda sepsise yaklaşım ve tedavi yöntemleri uygulanırken
 - a) sepsisin daha hızlı gelişebileceği,
 - b) karaciğerin sepsise diğer insanlara göre ilk 12. saat içerisinde daha hızlı yanıt verebileceği,
 - c) karaciğer sepsis yanıtında melatonin yoksunluğu kadar sepsisin de etkili olduğu,
 - d) böbreklerin ilk 24 saat içerisinde karaciğere göre daha az etkilenebileceği gibi bulguların da dikkate alınması da fayda olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, LimaCabello E, Lopez LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71:2997–3025.
- Achumnarnkul BW, Nonaka KO, Santana C, Attia AM, and Reiter RJ. “Interferon- γ modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *Journal of Interferon Research*, 1990;10(4): 403–411.
- Aikawa N. Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults, *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 1996;40:702–709.
- An R, Zhao L, Xu J, Xi C, Li H, Shen G, Zhang W, Zhang S, Sun L. Resveratrol alleviates sepsis-induced myocardial injury in rats by suppressing neutrophil accumulation, the induction of TNF- α and myocardial apoptosis via activation of Sirt1. *Mol Med Rep.* 2016;14(6):5297-5303.
- Anderson MR, Blumer JL. Advances in the therapy for sepsis in children, *Pediatr Clin North Am.* 1997;44:179.
- Angus DC. The lingering consequences of sepsis: a hidden public health disaster? *JAMA.* 2010. 27;304(16):1833-4.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303-10.
- Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* 2005;9: 25–39.
- Ataş M. Diyabetik Ratlarda retina lipid peroksidasyonu üzerine melatoninin etkisi. Göz hastalıkları AD Uzmanlık Tezi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi. (Tez no1998-70823).1998.
- Aydın M, Canpolat S, Kuloğlu T, Yaşar A, Çolakoğlu N, Keleştimur H. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on ghrelin and peptide YY in gastrointestinal system and neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus: immunohistochemical studies in male rats. *Regul Pept*, 2008; 146(1-3): 197- 203.
- Aytekin Y. ve Solakoğlu S. Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitebevleri. İstanbul.2006.273-274.
- Badley AD, Steckelberg JM. Sepsis Syndrome. İn: Wilson WR, Sandle MA (eds): *Current Diagnosis and Treatment In Infectious Diseases*. McGraw-Hill, New York, 2001:231-9.

- Başol N, Erbaş O, Çavuşoğlu T, Meral A, Ateş U. Beneficial effects of agomelatine in experimental model of sepsis-related acute kidney injury. *Ulus Travma Acil Verrahi Dergisi*. 2016;22:2.121-126.
- Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA*. 1994;271:226.
- Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture modal. *Surgery*. 1983;94:331-5.
- Baykal A, Kavuklu B, İskit AB. An experimental study of the effect of nitric oxide inhibition on mesenteric blood flow and interleukin-10 levels in lipopolysaccharide. *World J Surg*. 2000;24:1116-20.
- Becker KL, Snider R, Nysten ES. Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: A harmful biomarker and therapeutic target. *Br J Pharmacol*. 2010;159(2):253-264.
- Berthelsen LO, Kristensen AT, Tranholm M. Animal models of DIC and their relevance to human DIC: a systematic review. *Thromb Res*. 2011;128:103-116.
- Bilgili B, Haliloğlu M, Cinel İ. Sepsis ve Akut Böbrek Hasarı. *Turk J Anaest Reanim*. 2014; 42: 294-301.
- Bollinger, T.; Bollinger, A.; Skrum, L.; Dimitrov, S.; Lange, T.; Solbach, W. Sleepdependent activity of T cells and regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol*. 2009;155:231–238.
- Boloman Z, Müftüoğlu E, Bilgiç O, Ertan S. *İmmünoloji*. Saray Medikal Yayıncılık; İzmir. 1993: 79-100.
- Born J, Lange T, Hansen K, Molle M, Fehm HL. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J. Immunol*. 1997;158:4454–4464.
- Bourne RS, Mills GH. Melatonin: possible implications for the postoperative and critically ill patient. *Intensive Care Med*. 2006;32(3):371-9.
- Bruno VA, Scacchi PA, Perez-LIoret S, Esquifino AI, Cardinalli DP, Cutrera RA. Melatonin treatment counteracts the hyperthermic effects of lipopolysaccharide injection in the syrian hamster. *Neurosci Lett*. 2005;389(3):169-72.

- Brzozowska I, Strzalka M, Drozdowicz D, Konturek SJ, Brzozowski T. Mechanisms of esophageal protection, gastroprotection and ulcer healing by melatonin. Implications for the therapeutic use of melatonin in gastroesophageal reflux disease (GERD) and peptic ulcer disease. *Curr. Pharm Des.* 2014;20:4807–4815.
- Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med.* 1997;336:186–195.
- Cai B, Luo YL, Wang SJ, Wei WY, Zhang XH, Huang W, Li T, Zhang M, Wu N, Roodrajeetsing G, Zhang S. Does Citrulline Have Protective Effects on Liver Injury in Septic Rats *BioMed Research International.* 2016. doi: 10.1155/2016/1469590.
- Canpolat S, Sandal S, Yılmaz B, Yaşar A, Kutlu S, Baydas G, Keleştimur H. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur J Pharmacol*, 2001; 428(1): 145-148.
- Carre J, Singer M, Moncada S. Nitric oxide, in: E. Abraham, M. Singer (Eds.), *Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction and recovery*, Springer, Berlin, Heidelberg 2007; 76–95.
- Carpentieri A, Diaz BG, Areco V, Peralta LM, Tolosa TN. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res.* 2012;65:437–444.
- Carrilo VA, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia MS, Reiter RJ. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004; 18:537-539.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Guerrero JM, Calvo JR. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res.* 2005;39(4):400-8.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N, Rodriguez-Rodriguez A, Guerrero JM. Melatonin: Buffering the immune system. *Int J Mol Sci.* 2013;14:8638–8683.
- Champney TH, Allen GC, Zannelli M, Beausang LA. Time-dependent effects of melatonin on immune measurements in male Syrian hamsters. *J Pineal Res.* 1998;25(3):142-6.
- Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali M, Mcguire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of Cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In vivo.* 2013; 27:669-684.

- Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1108–1111.
- Currier NL, Sun LZ, Miller SC. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non specific immunity. *J Neuroimmunol.* 2000; 104,101-108.
- Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 2003;56(2):103-112.
- Çetin E. Melatonin ve bağışıklık sistemi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2005;2(2): 119-123.
- Debonera F, Aldeguer X, Shen X, Gelman AE, Gao F, Que X, Greenbaum LE, Furth EE, Taub R, Olthoff KM. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. *J Surg Res.* 2001; 96(2) : 289-95.
- Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis. *Trends Microbiol.* 2011;19(4):198-208.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 2013;39(2):165-228.
- Demas GE, Nelson RJ. Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms.* 1996;11(2):94-102.
- Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med.* 2001;29:42.
- Diker KS. İmmünoloji. Viruslara karşı bağışıklık. *Medisan Yayınları.* Ankara.1998; 206-207.
- Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:563– 573.

- Drazen DL, Bilu D, Bilbo SD, Nelson RJ. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280:R1476-1482.
- Edremitlioğlu M, Kılıç D, Öter Ş, Kısa Ü, Korkmaz A, Coşkun Ö, Bedir O. The effect of hyperbaric oxygen treatment on the renal functions in septic rats: relation to oxidative damage. *Surg Today*. 2005;35:653-661.
- Erdem MT, Güleç AI, Kızıltunç A, Yıldırım A. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha in lichen planus. *Dermatology*. 2003;207:367-370.
- Erllich SS, Apuzzo ML. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J Neurosurg*. 1985;63(3):321-41.
- Estaban-Zubero E, Alatorre-Jimenez MA, Lopez-Pingarron L, Reyes-Gonzales MC, Almeida-Souza P, Cantin-Golet A, Ruiz-Ruiz FJ, Tan DX, Garcia JJ, Reither R. Melatonin's role in preventing toxin-related and sepsis-mediated hepatic damage: A review. *Pharmacological Research*. 2016;105:108-120.
- Fabris N. Neuroendocrine regulation of immunity. *Advanced Pineal Research*. 1994;7: 41–56.
- Ferreira D, Amaral F, Mesquita C, Barbosa A, Lellissantos C, Turati A, Santos L, Sollon C, Gomes P, Faria J, Cipolla- Neto J, Bordin S, Anhe G. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. *Plos One*. 2012;7(6).
- Fink T, Glas M, Wolf A, Kleber A, Reus E, Wolf M, Kiefer D, Wolf B, Rensing H, Wolk T, Mathes A. Melatonin receptors mediate improvements of survival in a model of polymicrobial sepsis. *Critical Care Medicine*. 2014;42(1):22-31.
- Fourier F. Severe sepsis, coagulation and fibrinolysis: dead end or one way *Critical Care Medicine*. 2012;40: 2704–2708.
- Galley HF, Webster NR. The immuno-inflammatory cascade. *Br J Anaesth*. 1996; 77: 11-16.
- Galun E, Axelrod JH. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies. *Biochim Biophys Acta*. 2002;11;1592(3):345-58.
- Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez MV, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- γ production by human

- circulating CD4⁺ cells: A possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997;159:574–581.
- Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res.* 2000;29:129–137.
- Garcia JJ, Lopez-Pingarron L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, Garcia-Gil FA, Tan DX, Reiter RJ, Ramirez JM, Bernal-Perez M. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: A review. *J Pineal Res.* 2014;56:225–237.
- Geiger SS, Fagundes CT, Siegel RM. Chrono-immunology: Progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology.* 2015;146: 349–358.
- Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res.* 2001;50(6):756-60.
- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003; 74:391-401.
- Gülmezoğlu E, Ergüven S. İmmünoloji. Ankara. Hacettepe Taş Kitapçılık; 1994: 143-150.
- Gümüsova SO, Memiş YS. Bazı viral enfeksiyonlarda melatonin etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* 2014;9(1): 50-54.
- Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Sitokinler. *T Klin Med Sci.* 1997.17:65-74.
- Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis, *Advances in Immunology.* 66:101–195. 1997.
- Hanisch E, Brause R, Paetz J, Arlt B. Review of a large clinical series: Predicting death for patients with abdominal septic shock. *J Intensive Care Med.* 2011;26(1):27-33.
- Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int.* 2003;20(6):921-62.
- Herman AP, Bochenek J, Skipor J, Król K, Krawczyńska A, Antushevich H, Pawlina B, Marciniak E, Tomaszewska-Zaremba D. Interleukin-1 β Modulates Melatonin Secretion

- in Ovine Pineal Gland: Ex Vivo Study. *BioMed Research International*. 2015; 10.1155-526464.
- Huang R, Li M. Protective effect of Astragaloside IV against sepsis-induced acute lung injury in rats. *Saudi Pharm J*. 2016;24(3):341-7.
- İskit AB, Sungur A, Gedikoğlu G. The effects of bosentan, aminoguanidine and L-canavanine on mesenteric blood flow, spleen and liver in endotoxaemic mice. *Eur J Pharmacol*. 1999;379:73-80.
- İskit AB. Sepsiste deneysel modeller. *Hacettepe Üniversitesi Yoğun Bakım Dergisi*. 2005;5(2):133-136.
- Jafari HS, McCracken GH. Sepsis and septic shock: A review for clinicians. *Pediatr Infect Dis J*. 1992;11:739.
- Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K, Ohohata H, Nishino H, Koike H. Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens A*. 1987;9(7):1121-31.
- Keller E T, Wanagat J, Ershler W B. Molecular and Cellular biology of Interleukin-6 and its Receptor, *Frontiers in Bioscience*. 1996;1(1):340-357.
- Kılıçturgay K. Sitokinler. *İmmünoloji*. 2. Baskı, Bursa: Güneş-Nobel Kitabevleri, 2000: 175-177.
- Kırım B, Bayır A, Sirkecioğlu N, Aras MN. Balıklarda pineal bez ve melatonin hormonun fonksiyonları. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*. 2006.23:1(1):105-107.
- Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989;74: 1-10.
- Kobashi H, Toshimori J, Yamamoto K. Sepsis-associated liver injury: incidence, classification and the clinical significance. *Hepatology Research*. 2013;43(3): 255–266.
- Koo DJ, Chaudry IH, Wang P. Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis. *J Surg Res*. 1999;83:151.
- Kohn FR, Kung AHC. Role of endotoxin in acute inflammation induced by gram-negative bacteria: Specific inhibition of lipopolysaccharide-mediated responses with an amino-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein. *Infection and Immunity*. 1995;63(1):333-339.

- Kudo O, Fujikawa Y, Itonago I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNF α /IL-1 α) induction of human osteoclast formation. *J Pathol.* 2002;198(2):220–7.
- Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann. NY Acad Sci.* 2010;1193: 48–59.
- Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. Inflammation and alzheimer’s disease. *Arch Pharm Res.* 2010;33:1539–1556.
- Li G, Gao L, Jia J, Gong X, Zang B, Chen W. Alpha-lipoic acid prolongs survival and attenuates acute kidney injury in a rat model of sepsis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014;17. doi: 10.1111/1440-1681.12244.
- Li Y, Jin ZC, Cai Y, Ji MS, Liu J. Value of serum procalcitonin in evaluating the prognosis of sepsis in elderly patients with colorectal cancer undergoing emergency colorectal surgery. *Indian J Surg.* 2013;75(2):86-93.
- Liebmann PM, Wölfler A, Felsner P, Hofer D, Schauenstein K. Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;112:203-211.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- Macchi MM, Bruce J. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers Neuroendocrinology.* 2004;25:177-195.
- Maestroni GJM. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Exp Opin Invest Drugs* 2001;10:467-476.
- Marseglia L, D’Angelo G, Manti S, Salpietro C, Arrigo T, Barberi I, Reiter RJ, Gitto E. Melatonin and atopy: Role in atopic dermatitis and asthma. *Int J Mol Sci.* 2014;15: 13482–13493.
- Markowska M, Bialecka B, Ciechanowska M. Effect of immunization on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland. *Neuroendocrinology Letters.* 2000; 21(5): 367–373.
- Money DP, O’Reilly, Gamelli RL. Tumor necrosis factor and wound healing. *Ann Surg.* 1990;211:124-129.

- Monneret G, Finck ME, Vennet F, Debard AL, Bohé J, Bienvenu J, Lepape A. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high IL-10 concentration. *Immunol. Lett.* 2004;95:193–198.
- Moore, CB. Siopes, TD. Melatonin can produce immunoenhancement in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) without prior immunosuppression. *Gen Comp Endocrinol.* 2002;129:122–126.
- Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews.* 2008;226:205-218.
- Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, Zehetgruber M, Steindl-Munda P, Ferti Siostrzonek P. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(3):536-40.
- Mucha S, Zylinska K, Zerek-Mete G. Effect of interleukin-1 on in vivo melatonin secretion by the pineal gland in rats. *Advanced Pineal Research.* 1994;1(7):177– 181.
- Müllberg J, Geib T, Jostock T, Hoischen SH, Vollmer P, Voltz N, Heinz D, Galle PR, Klouche M, Rose-John S. IL-6-receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6. *J Immunol.* 2000;164: 4672–4677.
- Nayely LL, Erick PGG, Dulce LAP, Basilio H. Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):921.
- Nororiha IL, Niemir Z, Stein H, Waldher R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10:775-786.
- Olguner Ç, Koca U, Altekin E, Ergür B, Duru S, Girgin P, Taşdoğan A, Gündüz K, Güzeldağ S, Akkuş M, Mıcılı S. Ischemic preconditioning attenuates lipid peroxidation and apoptosis in the cecal ligation and puncture model of sepsis. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2013;(5):1581-1588.
- Orman M.A, Nguyen TT, Ierapetritou MG, Berthiaume F, Androulakis IP. Comparison of the cytokine and chemokine dynamics of the early inflammatory response in models of burn injury and infection. *Cytokine.* 2011;55: 362–371.
- Ortatatlı M, Özgüven V, Şengül A. Sepsis ve ağır infeksiyonların tanı ve takibinde yeni bir marker: Prokalsitonin. *Flora* 1999; 4:151-5.

- Otero-Antón E, González-Quintela A, López-Soto A, López-Ben S, Llovo J, Pérez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res.* 2001;33(2):77-9.
- Özşahin M. Ooferektomize ve pinealektomize ratlarda Egzojen melatonin uygulamanın kemik mineral dansitometresi üzerine etkileri. 2006. Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD. Uzmanlık Tezi. (tez no:2006-192180). İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya.
- Park SJ, Tokura H. Bright light exposure during the daytime affects circadian rhythms of urinary melatonin and salivary immunoglobulin. *A Chronobiol Int.* 1999;16: 359-371.
- Petilla V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, Valtonen M. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med.* 2002;28:1220–1225.
- Perez EM, Weisman LE. Novel approaches to the prevention and therapy of neonatal bacterial sepsis. *Clinics in Perinatology.* 1997; 24(1):213-219.
- Pfizenmaier K, Wajant H, Grell M. Tumor necrosis factors in 1996. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7(3):271-277.
- Poll T, Malefyt RT, Coyle SM, Lowry SF. Antiinflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *Journal of Infectious Diseases.* 1997;175(1):118–122.
- Pozo D, Delgado M, Fernandez SJM, Calvo JR, Gomariz RP, Martin L, Ortiz GG, Guerrero JM. Expression of Mel1a melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J.* 1997;11:466-473.
- Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci.*, 1996;17: 100-102.
- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):776-787.
- Rivers E, Nguyen S, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early goal directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001;345: 1368–1377.

- Roland CR, Goss JA, Mangino MJ. Autoregulation by eicosanoids of human Kupffer cell secretory products. A study of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, and nitric oxide. *Ann Surg.* 1994;219:389.
- Russell JA. Management of sepsis. *N Eng J Med.* 2006;355(16):1699-1713.
- Rutanen EM. Cytokines in reproduction. *Ann Med.* 1993;25: 343-347.
- Sakami S, Ishikawa T, Kawakami N, Haratani T, Fukui A, Kobayashi F, Fujita O, Araki S, Kawamura N. Coemergence of insomnia and a shift in the Th1/Th2 balance toward Th2 dominance. *Neuroimmunomodulation* 2002;10:337–343.
- Satpathy A, Ravindra S, Thakur S, Kulkarni S, Porwal A, Panda S. Serum interleukin-1 β in subjects with abdominal obesity and periodontitis. *Obes Res Clin Pract.* 2015;9:513–521.
- Shang Y, Xu SP, Wu Y, Jiang YX, Wu ZY, Yuan SY, Yao SL. Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chin Med J.* 2009;122(12):1388-93.
- Simko F, Reiter R, Pechanova O, Paulis L. Experimental models of melatonin deficient hypertension. *Bioscience.* 2013;1(18):616-625.
- Simko F. Chronobiology of blood pressure: emerging implications of melatonin. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(11):1252-4.
- Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res.* 2003;35(6):486-91.
- Slominski AT, Kleszczynski K, Semak I, Janjetovic Z, Zmijewski MA, Kim TK, Slominski RM, Reiter RJ, Fischer TW. Local melatonergic system as the protector of skin integrity. *Int J Mol Sci.* 2014;15:17705–17732.
- Samson LM, Allen UD, Creery WD, Diaz-Mitoma F, Singh RN. Elevated interleukin-1 receptor antagonist levels in pediatric sepsis syndrome. *J Pediatr.* 1997;131:587–591.
- Stasi A, Intini A, Divella C, Frazin R, Montemurno E, Grandaliano G, Ronco C, Fiaccadori E, Pertosa GB, Gesualdo L, Castellano G. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;250.

- Studnek JR, Artho MR, Garner CLJ, Jones AE. The impact of emergency medical services on the ed care of severe sepsis. *Am J Emerg Med.* 2012;30(1):51-56.
- Taşkıran N. Melatoninin fizyolojik işlevi. *Kocatepe Veteriner Dergisi.* 2011;4(2):33-43.
- Tengattini S, Reither RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res.* 2008;44(1):16-25.
- Vermuelen M, Palermo M, Giordano M. Neonatal pinealectomy impairs murine antibody dependent cellular cytotoxicity. *J Neuroimmunol.* 1993;43:97-102.
- Veneroso C, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res.* 2009;47(2):184-91.
- Voisin P, Van Camp G, Pontoire C, and Collin JP. Prostaglandins stimulate serotonin acetylation in chick pineal cells: involvement of cyclic AMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent mechanisms. *Journal of Neurochemistry.* 1993;60(2):666-670.
- Volt H, García JA, Doerrier C, Díaz-Casado ME, Guerra-Librero A, López LC, Escames G, Tresguerres JA, Acuña-Castroviejo D. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res.* 2016;60(2):193-205.
- Xu L, Bao H, Si Y, Han L, Zhang R, Cai M, Shen Y. Effects of adiponectin on acute lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis rats. *Journal of Surgical Research.* 2013;83:752-759.
- Yang S, Chung CS, Ayala A. Differential alterations in cardiovascular responses during the progression of polymicrobial sepsis in the mouse. *Shock.* 2002;17:55-60.
- Yu CX, Zhu B, Xu SF, Cao XD, Wu GC. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol.* 2000;403(1-2):49-53.
- Wei Y, Shan L, Qiao L, Liu R, Hu Z, Zhang W. Protective effects of huang-lian jie-du-tang against polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* doi: 10.1155/2013/909624, 2013.

- Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: Biochemical and structural mechanisms. *Life Sciences*. 2003;72:2183-2198.
- Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Küsters S, Fregien B, Trautwein C, Tiegs G. TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1—relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol*. 2001;166(2):1300-1307.
- Wu B, Walker J, Spur B, Rodriguez A, Yin K. Effects of Lipoxin A4 on antimicrobial actions of neutrophils in sepsis. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids (PLEFA)*. 2015; 94: 55-64.
- Wu JY, Tsou MY, Chen TH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res*. 2008;45(1):106-16.
- Zawilska JB, Woldan-Tambor A, Nowak JZ. Histamine stimulated cyclic AMP formation in the chick pineal gland: role of protein kinase C. *Biochemical Pharmacology*. 1997;54(4):501–507.
- Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. 2009;61(3):383-410.
- Zhigiang M, Yang Y, Chongxi F, Jing H, Dongjin W, Shouyin D, Wei H, Dong L, Xiaofei L, Russel JR, Xiaolong Y. Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;29(7):46768-46784.
- Zhou MO, Jiao S, Liu Z, Zhang ZH, Mei YA. Luzindole, a melatonin receptor antagonist, inhibits the transient outward K⁺ current in rat cerebellar granule cells. *Brain Res*. 2003;970(1-2):169-77.

EK-1

Etik Kurul Onay Formu



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU

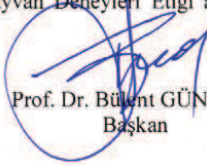
Sayı : B.30.2.ÇAU.0.05.06- 050.04-118
Konu : Hayvan Deneyleri Etik Kurul Kararı

05/11/2014

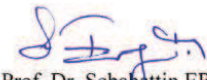
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ :05.11.2014
TOPLANTI SAYISI :2014/11
DOSYA KAYIT NUMARASI :2014/80
KARAR NUMARASI :2014/11-15
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR :Yük. Lis. Öğr. Aysun ÖZTÜRK
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI :Wistar Albino ırkı 78 adet erkek sıçan

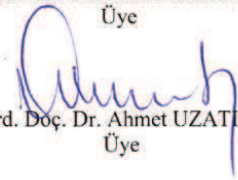
HADEK-2014-80 nolu çalışma ile ilgili olarak proje yürütücüsü Prof. Dr. Metehan UZUN, tarafından Etik Kurulumuza sunulan "Pinealektomize Edilmiş Septik Sıçanlarda Karaciğer ve Böbrek TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-1 β Gen Ekspresyonu ve Plazma Düzeylerindeki Değişimlerin Araştırılması" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin mevzuatın emirleri doğrultusunda incelenmiş, Prof. Dr. Metehan UZUN'un hazır bulunduğu bu toplantıda tartışılıp, ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oy çokluğu ile karar verilmiştir.



Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ
Başkan *Fotokopü*


Prof. Dr. Mustafa SAÇAR
Üye



Prof. Dr. Sebahattin ERGUN
Üye



Doç. Dr. Mustafa DENİZ
Üye


Yrd. Doç. Dr. Ahmet UZATICI
Üye


Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR
Üye


Vet. Hek. Sait ELMAS
Üye


Ecz. Zerrin GÜMÜŞ
Sivil Üye


Erdoğan GÜRSEL
Sivil Üye

EK-2

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	AYSUN	Soyadı	ÖZTÜRK
Doğum Yeri	ÇAN	Doğum Tarihi	23.07.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	13900879232
E-mail	aysunozturk@comu.edu.tr	Tel	05065367674

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Ç.O.M.Ü. SAĞLIK YÜKSEKOKULU- EBELİK	2006

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. VEKİL EBE	Sağlık Bakanlığı Çanakkale Çan Yaygın Köyü Sağlık Evi	Ekim 2006–Temmuz 2007
2. EBE	Sağlık Bakanlığı Kocaeli Gebze Köşklü Çeşme Sağlık Ocağı	Temmuz 2007–Eylül 2008
3. EBE	ÇOMÜ Araştırma ve Uygulama Hast.	2008-

Yabancı Dil Sınav Notu[#]


KPDS	ÜDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE
	48,75							

Ek-3**SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU**

	Evet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.	X	
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.	X	
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.	X	
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.	X	
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.	X	
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)	X	
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.	X	
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.	X	
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.	X	
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır.	X	
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlelerin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.	X	
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.	X	

Tarih: 03.01.2017 Öğrenci Aysun ÖZTÜRK İmza	Tarih: 03.01.2017 Danışmanın Prof. Dr. Metehan UZUN İmza
--	---

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİTLİ TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tarih: 03.01.2017 Öğrenci Aysun ÖZTÜRK İmza 	Tarih: 03.01.2017 Danışmanın Prof. Dr. Metehan UZUN İmza 