

**T.C.**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİPOPOLİSAKKARİT KAYNAĞI**  
**(E.COLİ TYPE 0111:B4) UYGULANAN TAVŞANLARDA**  
**PLAZMA NİTRİK OKSİT (NO) VE TÜMÖR NEKROZİS**  
**FAKTÖR- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Celalettin Yusuf TÜRKMEN**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman**

**Doç. Dr. Emine ATAKIŞI**

**2011-KARS**

**T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİPOPOLİSAKKARİT KAYNAĞI  
(E.COLİ TYPE 0111:B4) UYGULANAN TAVŞANLARDA  
PLAZMA NİTRİK OKSİT (NO) VE TÜMÖR NEKROZİS  
FAKTÖR- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Celalettin Yusuf TÜRKMEN**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman**

**Doç. Dr. Emine ATAKİŞİ**

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir.**

**Proje No: 2011.VF-28**

**2011-KARS**

**T.C.**  
**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde **Celalettin Yusuf TÜRKMEN** tarafından hazırlanmış olan **Lipopolisakkarit Kaynağı (E.Coli Type 0111:B4) Uygulanan Tavşanlarda Plazma Nitrik Oksit (NO) ve Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Düzeylerinin Araştırılması** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi: 28/ 12 / 2011**

Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof. Dr. Ayla ÖZCAN

.....

Üye : Doç. Dr. Emine ATAĞIŞI

.....

Üye: Yrd. Doç. Dr. Birkan TOPÇU

.....

Bu tezin kabulü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL

Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>I</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>III</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1 Sitokinler Hakkında Genel Bilgi.....	4
2.1.1 Tarihçe .....	5
2.1.2 Sınıflandırma .....	5
2.1.3 Moleküler Yapıları .....	7
2.1.4 Genel Özellikleri .....	8
2.1.5 Etki Tarzları .....	10
2.2 Tümör Nekroz Faktör-Alfa .....	16
2.2.1 Tanımı ve Tarihçesi .....	16
2.2.2 Yapısı .....	18
2.2.3 Özellikleri .....	19
2.2.4 Etki Mekanizması .....	21
2.2.5 Fizyolojik Etkileri .....	22
2.2.6 Klinik Önemi .....	27
2.3. Bakteriyel Kaynaklı Lipopolisakkarit .....	28
2.3.1 Tarihçesi .....	29

2.3.2 Moleküler Yapısı .....	30
2.3.3 Etki Mekanizması .....	32
2.3.4 Fizyolojik Etkileri .....	32
2.3.5 LPS TNF- $\alpha$ İlişkisi .....	33
2.4. Nitrik Oksit .....	34
2.4.1 Tanımı ve Tarihçesi .....	35
2.4.2 Yapısı ve Genel Özellikleri .....	36
2.4.2.1 Enzimleri .....	36
2.4.2.2 Konstitütif Nitrik Oksit Sentetaz .....	38
2.4.2.3 İndüklenebilir Nitrik oksit Sentetaz .....	38
2.4.3 Nitrik Oksit'in Patolojik Etkileri .....	39
2.4.4 LPS ile NO Arasındaki İlişki .....	42
<b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>42</b>
3.1 Materyal .....	42
3.2 Metot .....	42
3.2.1 Kan Örneklerinin Alınması .....	42
3.2.2 Analizler İçin Kullanılan Cihazlar .....	43
3.2.3 Analizler İçin Kullanılan Kimyasallar .....	44
3.2.4 Plazma TNF- $\alpha$ Düzeyi Tayini .....	45
3.2.4.1 Mikroplakların Kaplanması .....	46
3.2.4.2 Standartların Hazırlanması .....	45
3.2.4.3 Deneyin Yapılışı .....	46
3.2.5 Plazma Nitrik Oksit Düzeyi Tayini .....	47
3.2.5.1 Deneyin Yapılışı .....	47
3.2.5.1.1 Nitrat Analizinin Yapılışı .....	47
3.2.5.1.2 Nitrit Analizinin Yapılışı .....	48

3.2.6 İstatistiksel Analizler .....	48
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>49</b>
4.1 Plazma TNF- $\alpha$ Düzeyleri .....	49
4.2 Plazma NO Düzeyleri .....	50
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>52</b>
<b>6. ÖZET.....</b>	<b>58</b>
<b>7. ABSTRACT.....</b>	<b>59</b>
<b>8. KAYNALAR.....</b>	<b>60</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>71</b>
<b>10. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>72</b>

**KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>ACTH</b>	:	Adrenokortikotropik hormon
<b>BCG</b>	:	Verem aşısı
<b>BMI</b>	:	Vücut kitle indeksi
<b>cAMP</b>	:	Siklik adenzin monofosfat
<b>CSF</b>	:	Koloni stimüle edici faktör
<b>DIC</b>	:	Yaygın damar içi pıhtılaşma
<b>EBV</b>	:	Epstein Barr virüsü
<b>EDRF</b>	:	Endotel kaynaklı damar genişletici faktör
<b>EGF</b>	:	Epidermal büyüme faktörü
<b>ELAM</b>	:	Endotel lökosit adhezyon molekülleri
<b>EPO</b>	:	Eritropoietin
<b>FGF</b>	:	Fibroblast büyüme faktörü
<b>GLUT</b>	:	Glukoz transport protein
<b>HDL</b>	:	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
<b>HGF</b>	:	Hepatosit büyüme faktörü
<b>ICAM</b>	:	İntrasellüler adhezyon molekülleri
<b>IFN</b>	:	İnterferonlar
<b>IGF</b>	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>IL</b>	:	İnterlökinler
<b>INCAM</b>	:	İndüklenebilir adhezyon molekülü
<b>İDK</b>	:	İdiyopatik dilate kardiyomiyopati
<b>İKH</b>	:	İskemik kalp hastalığı
<b>İNOS</b>	:	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
<b>KY</b>	:	Kalp yetersizliği
<b>LIF</b>	:	Lösemi inhibitör faktör

<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>LBP</b>	: Lipopolisakkarit bağlayıcı protein
<b>MHC</b>	: Major histocompatibility complex (Doku uyusurluk antijeni)
<b>NGF</b>	: Sinir büyüme faktörü
<b>NK</b>	: Natural killer (Doğal öldürücü)
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentetaz
<b>nNOS</b>	: Nöral nitrik oksit sentetaz
<b>PAF</b>	: Platelet aktive edici faktör
<b>PARS</b>	: Poli ADP-riboz sentaz
<b>PDGF</b>	: Platelet orijinli büyüme faktörü
<b>PG-2</b>	: Prostatiklin
<b>RA</b>	: Romatoid artrit
<b>TGF</b>	: Transforme edici büyüme faktörleri
<b>TLR4</b>	: Toll-like reseptör-4
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörleri
<b>TNFR</b>	: Tümör nekroz faktör reseptörü
<b>TRADD</b>	: Tümör nekroz faktör reseptörü ölüm bölgesi proteini
<b>USYE</b>	: Üst solunum yolları enfeksiyonu
<b>VCAM</b>	: Vasküler adhesyon molekülü
<b>VLDL</b>	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein



**GRAFİKLER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Grafik 1. Tavşan TNF- $\alpha$ Standart Grafiği .....	46
Grafik 2. Nitrat Standart Grafiği .....	47
Grafik 3. Nitrit Standart Grafiği .....	48
Grafik 4. Damar iđi LPS verilen Tavşanlarda Plazma TNF- $\alpha$ Seviyeleri.....	50
Grafik 5. Damar iđi LPS verilen Tavşanlarda Plazma NO Seviyeleri.....	51

**TABLolar DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Sitokinlerin Sınıflandırılması .....	5
Tablo 2. TNF- $\alpha$ 'nın Genel Özellikleri.....	19
Tablo 3. TNF- $\alpha$ 'nın Fizyolojik Etkileri.....	26
Tablo 4. Nitrik Oksit Biyolojisindeki Değişikliklerin Rol Aldığı Kardiyovasküler Bozukluklar .....	40
Tablo 5. LPS Kaynağı Verilen Tavşanlarda Plazma TNF- $\alpha$ Değerleri... ..	49
Tablo 6. LPS Kaynağı Verilen Tavşanlarda Plazma NO Değerleri.....	51

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Sitokinlerin Helikal Yapıları	6
Şekil 2. Sitokinler ve Üretildikleri Hücre Tipleri	7
Şekil 3. Sitokinlerin Etki Mekanizması	10
Şekil 4. Sitokinlerin Etki Tarzları	10
Şekil 5. Akut Solunum Zorluğunda Sitokinlerin Davranışı	12
Şekil 6. Sitokin Reseptörlerinin Sinyal İletimi	13
Şekil 7. Farklı Sitokinlerin Birlikte Etki Tarzları	15
Şekil 8. TNF- $\alpha$ 'nın Yapısı	18
Şekil 9. TNF- $\alpha$ Reseptörleri ve TNF- $\alpha$ 'nın Reseptörlere Bağlanması	20
Şekil 10. TNF- $\alpha$ 'nın Farklı Konsantrasyonlardaki Etkileri	25
Şekil 11. Gram Negatif ve Pozitif Bakterilerin Membran Yapısı	28
Şekil 12. Lipopolisakkaritlerin Yapısı	29
Şekil 13. Yağ Asiti Farklılıklarına Göre Bazı LPS Türleri	30
Şekil 14. LPS'nin Biyolojik Etkileri	32
Şekil 15. Nitrik Oksitin Yapısı	34
Şekil 16. Nitrik Oksit Sentezi	36
Şekil 17. Nitrik Oksitin Etkileri	39

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sitokinler vücutta çok çeşitli hücreler tarafından sentezlenen, multi fonksiyonel polipeptidlerdir. Hastalıkların fizyopatolojisinde etkili olan protein yapılı moleküllerdir. İmmun sistem hücreleri arasındaki ilişkileri kontrol ederek, inflamatuvar cevabı destekleyerek fizyolojik olaylarda önemli rol oynarlar. Günümüzde 80'in üzerinde sitokin tanımlanabilmiştir. Sitokinler hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, hematopoez ve bağışıklık sisteminin regülasyonu, yaraların iyileşmesi, kemik formasyonu ve hücrel metabolizmanın değiştirilmesi gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır.

Sitokinlerden TNF- $\alpha$ , günümüzün en korkulan hastalıklarından olan kanserde, kanserli hücrelerin yıkımını sağlayan ve birçok hücre türü tarafından salınan bir sitokindir. TNF- $\alpha$  aktivitesi, tümör hücrelerini öldürürken bunun yanında vücut harabiyeti, kaşeksi gibi olumsuz etkilere de sebep olmaktadır.

Lipopolisakkarit (LPS), gram-negatif bakterilerinin dış membranının büyük bir bölümünü oluşturan, membranın yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan ve çeşitli kimyasalların saldırısından koruyan başlıca bileşendir. LPS, TNF- $\alpha$  üretimi için makrofajların en güçlü uyarıcısıdır. LPS, makrofajları aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) üretimlerini ve fonksiyonlarını etkiler.

LPS sistemik inflamatuvar cevaba ve ardından insan ve hayvanda birçok organın iflas etmesiyle sonuçlanan septik şoka neden olur. Ayrıca özellikle akciğer, karaciğer ve böbreklerde sitokin, nitrik oksit (NO), süper oksitlerin sentez ve salınımını tetikler. LPS, iNOS enziminin salınımı ile beraber NO seviyesinde artışa sebep olur.

Yapılan bir çok çalışmada LPS'nin TNF- $\alpha$  ve NO üzerine olan etkisi bilinmektedir. Ancak verilen LPS'nin hem zamana hem de doza bağlı olarak nasıl etki gösterdiği yeterince çalışılmamıştır.

Yapılan bu çalışmada bakteriyel bir endotoksin olan LPS'nin damar içi yolla tavşanlara verilmesinin yangının erken belirteçlerinden biri olan TNF- $\alpha$  ve NO üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağlı olarak incelenmesi amaçlandı.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Sitokinler Hakkında Genel Bilgiler

Sitokinler, çeşitli hücre türlerinde üretilen, hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan bir protein ve peptid grubudur. Salınımları geçici olup, hücre yüzeyinde yer alan sitokin reseptörleri aracılığıyla görevlerini yaparlar. Yangı (enflamasyon) ve bağışıklık reaksiyonlarında, aktif lenfositler, makrofajlar, endotel, epitel ve konnektif dokular tarafından oluşturulurlar.

Hormonlar ve nörotransmitterler gibi işlev gören sitokin ailesi başlıca suda çözünür küçük proteinlerin ve glikoproteinlerin 8 ila 30 kDa'lık birimlerini içermektedirler. Hormonlar özgül organlardan kana salınır ve nörotransmitterler nöronlarca üretilirken, sitokinler bazı hücre tiplerince salınırlar. Bağışıklık sistemindeki temel rolleriyle sitokinler, çeşitli immünolojik, enfeksiyöz ve yangısal hastalıklarda salınırlar. Bununla beraber, tüm fonksiyonları bağışıklık sistemiyle sınırlı değildir, embriyogenezin gelişimsel süreçlerinin basamaklarında da görülmektedirler.

Başlangıçta, sitokinlerin sadece lenfositlerden kaynaklandığı sanıldığından bu proteinlere lenfokin adı verilmiştir. Daha sonra monositlerin de bu faktörleri ürettiği anlaşılmış ve monokin adı da kullanılmıştır. Günümüzde bu mediyatörlerin sadece lenfoid hücreler tarafından salgılanmadığı tespit edilmiş ve tüm hücre türlerini kapsayan sitokin adı kullanılmaya başlanmıştır (21, 61).

### 2.1.1 Tarihçe

Sitokinlerin aktiviteleri ilk kez 1926'da Zinsser ve Tamiya tarafından tanımlanmış ve bunların lökositlerden salgılanan çözünen ürünler oldukları ve damar duvarı fonksiyonlarını etkiledikleri bildirilmiştir. Bu yıllarda enfeksiyon hastalıklarının ve antijene bağımlı immün yanıtın araştırılmasıyla sitokinlerle ilgili bilgiler artmış, 1980'lerden itibaren moleküler klonlama ile sitokinlerin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu sayede yeni sitokinlerin bulunması mümkün olabilmiştir. Gün geçtikçe sitokinlerin biyolojik aktiviteleri ve molekül yapılarıyla ilgili bilgiler artmıştır. Böylece hastalıkların ortaya çıkış mekanizmalarıyla ilgili rolleri anlaşılmaktadır.

Günümüzde 80'in üzerinde sitokin tanımlanabilmiştir. Sitokinler hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, hematopoez ve bağışıklık sisteminin regülasyonu, yaraların iyileşmesi, kemik formasyonu ve hücrel metabolizmasının değiştirilmesi gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır (21).

### 2.1.2 Sınıflandırma

Sitokinler fonksiyonlarına göre sınıflandırılıp adlandırılabilirler. Buna göre lenfositler ile diğer immün sistem hücreleri arasındaki ilişkileri düzenleyen sitokinlere interlökin (IL) adı verilir. Yangı olayında görevi olan ve kemotaktik özellikli sitokinlere "kemokin" denir. Bazı sitokinler hücrelerin üreme ve çoğalmasını uyarır ki bunlara da büyüme faktörleri denir (21).

Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırma sitokinler arasındaki fonksiyonel benzerliklere ve etki mekanizmalarına dayanmaktadır. Sitokinlerin sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmektedir (22).

**Tablo 1.** Sitokinlerin Sınıflandırılması (8).

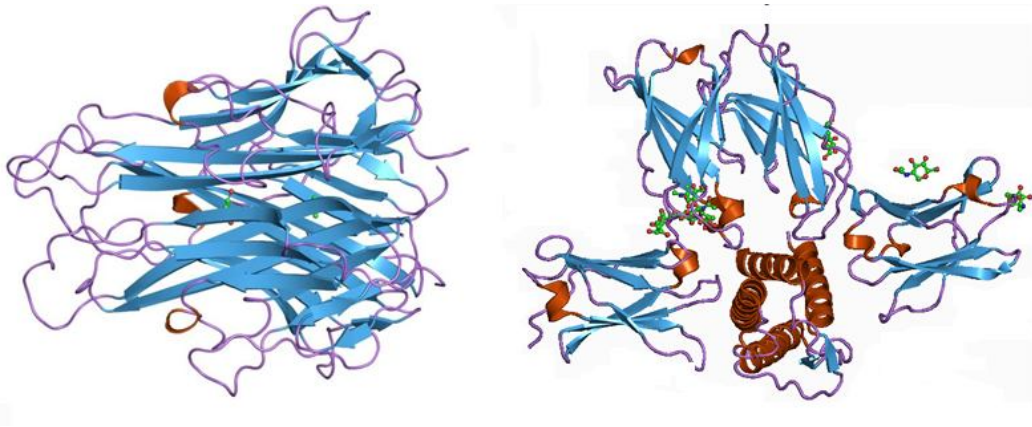
<b>Büyüme faktörleri</b>	Epidermal büyüme faktörü (EGF) Platelet orijinli büyüme faktörü (PDGF) İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 ve 2 (IGF-1, IGF-2) Sinir büyüme faktörü (NGF) Fibroblast büyüme faktörü (aFGF, bFGF) Neurolokin; Amfiregulin Hepatosit büyüme faktörü (HGF)
<b>Lenfokinler</b>	İnterlökinler (IL-1; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15)
<b>Koloni stimüle eden faktörler</b>	Granülosit koloni stimüle eden faktör (G-CSF) Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör (GM-CSF) Eritropoietin (EPO) Lösemi inhibitör faktör (LIF)
<b>Transforme edici büyüme faktörleri</b>	TGF-Alfa; TGF-Beta
<b>Tümör nekroz faktörleri</b>	TNF-Alfa; TNF-beta
<b>İnterferonlar</b>	IFN-Alfa; IFN-Beta; IFN-Gama



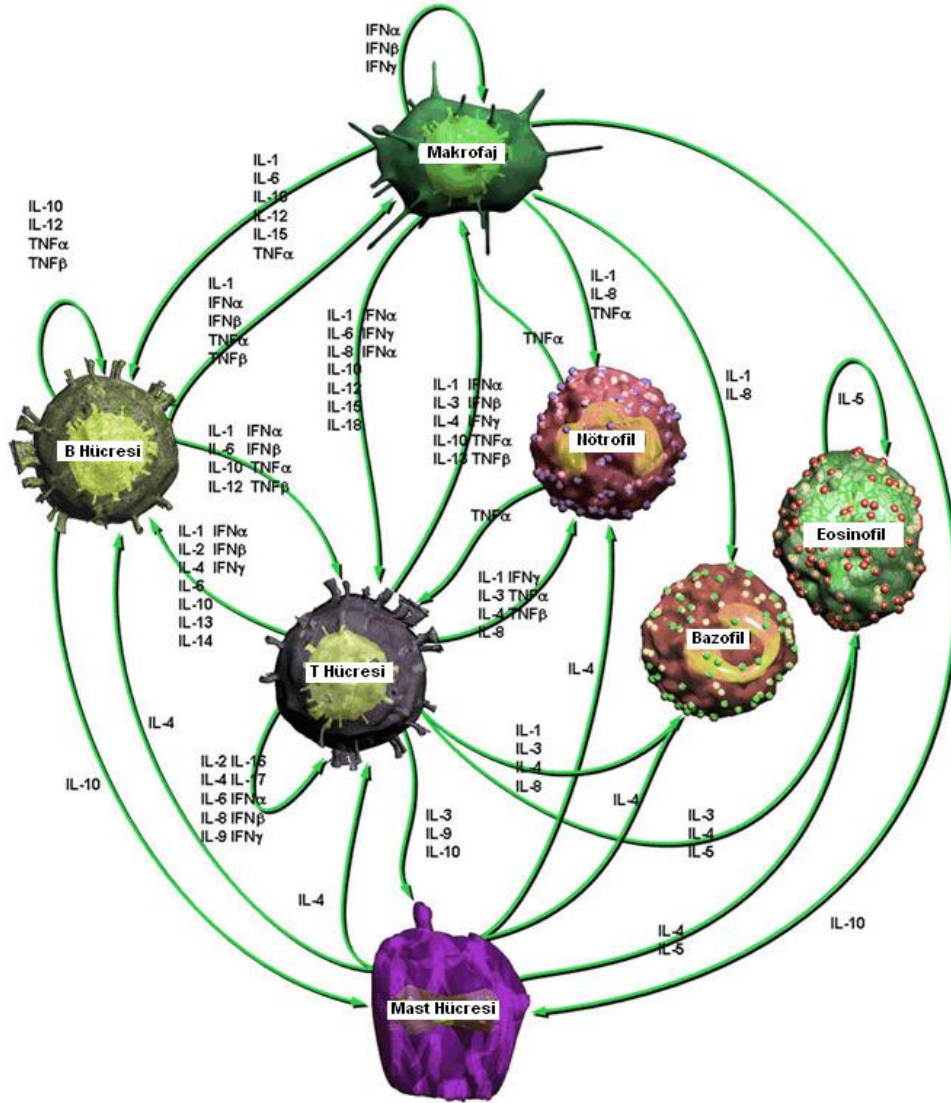
İmmün ve inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerinin artırılması sitokinler aracılığı ile olur. Sitokinler antijen için spesifik değildir, etkileri çeşitli faktörlerle düzenlenebilir. İndüklenebilir nitelik taşırlar. Aktif T lenfositler tarafından sentezlenip salınan sitokinler ‘lenfokin’; aktif monosit ve makrofajlardan sentezlenip salınan sitokinler ‘monokin’ ve lökositler arasında etkileşim yapan sitokinler interlökin adı altında toplanmışlardır (91).

### 2.1.3 Moleküler Yapıları

Sitokin molekülleri dört yapısal grup altında incelenebilirler. Grup-1 sitokinler 4 adet kümelenmiş alfa helikalinden oluşmuş yapılardır. İnterlökinlerin çoğu, büyüme faktörleri ve interferonlar bu temel yapıyı gösterirler. Grup-2 sitokinler uzun zincirli bir beta kalıbına sahiptirler. Bu gruba IL-1, TNF ve TGF girer. Grup-3 sitokinleri hem helikal hem de beta kalıbına sahip küçük proteinlerdir. Bu grup içinde kemokinler yer alır. Grup-4 sitokinler, farklı şekillere sahip moleküllerin bir araya geldiği mozaik yapılardır. Bu grupta IL-12 sayılabilir. Sitokinler, genellikle 6.000 ile 80.000 dalton arasında değişen moleküler ağırlıktaki peptid ya da glikoproteinler şeklinde sentez edilip salgılanmaktadır. Spesifik bağ-reseptör etkileşiminin ardında hedef hücre fonksiyonlarını,  $10^{-9}$ ,  $10^{-15}$  mol/ lt konsantrasyonlarda stimule edebilen bileşiklerdir. Bu yüksek spesifik aktivite, sitokinlerin saptanmasını kolaylaştırmıştır (89).



**Şekil 1.** Sitokinlerin helikal yapıları (97).



**Şekil 2.** Sitokinler ve üretildikleri hücre tipleri (97).

#### 2.1.4 Genel Özellikleri

İmmün yanıtın her aşamasında hormon benzeri bir etki ile hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal molekülleri olan sitokinler, immün sistem hücreleri de dahil bir çok hücre tarafından salgılanırlar. Belli bir sitokin birden fazla hücre tipi tarafından üretilebilir. İmmün sistem hücreleri dışında fibroblastlar, keratinositler, endotel hücreleri, hatta epitel hücreleri bile bazı sitokinleri sentezlemektedir. Sitokinler hücre gelişmesi, çoğalması, aktivasyonu, yangı, bağışıklık, doku tamiri ve morfogenezis gibi önemli biyolojik faaliyetleri düzenlerler (21, 33).

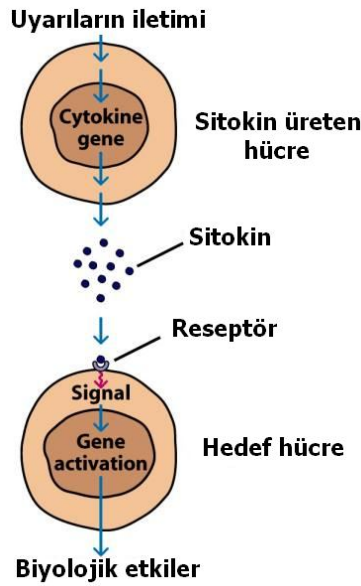
Özet olarak sitokinlerin genel özellikleri;

- Bağışıklık ve inflamatuvar yanıtların oluşmasını ve düzenlenmesini sağlarlar. Doğal bağışıklıkta lipopolisakkarid gibi mikrobik ürünler mononükleer fagositleri direkt uyararak kendi sitokinlerini salgılatırlar. T hücrelerinden üretilen sitokinler yabancı antijenlerin özel olarak tanınmasıyla birlikte hücrede oluşan yanıt sonucu meydana gelirler.
- Sitokin salınımı kısa, kendini sınırlayan bir olgudur. Genel olarak sitokinler öncül moleküller olarak depolanmazlar ve sentezleri yeni gen transkripsiyonu ile başlatılır. Bu transkripsiyonel aktivasyon genellikle geçici olup, sitokinleri kodlayan mRNA'lar stabil değildir. Bu nedenle sitokin salınımı geçicidir ve bir kez sentezlendiğinde, hızla salınırlar.
- Çeşitli hücreler tarafından üretilir. Yani bu molekülleri sitokin, lenfokin ya da monokin gibi sellüler kökenlerini belirten genel isimler koymamak daha uygundur.
- Birçok farklı hücre tiplerine etki ederler. Bu özelliğe pleiotropizm denir.
- Aynı hedef hücrede farklı bir çok etkileri vardır. Bazı etkiler aynı anda meydana gelirken, bazı etkiler farklı zaman aralıklarıyla (dakikalar, saatler, günler) oluşabilir.
- Sitokin üretimi genellikle gerektiğinden fazladır.
- Diğer sitokinlerin sentezini etkiler; yani, ikinci, üçüncü sitokin, birinci sitokinin biyolojik etkisine ortam hazırlayabilir.
- Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin fonksiyonlarını etkilerler. İki sitokin birbirini antagonize eder veya additif etki gösterebilir. Ya da bazı durumlarda sinerjik etki gösterebilirler.
- Sitokinler, diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar. Bu reseptörler transmembran proteinler olup, ekstrasellüler reseptörleri vardır ve özel olarak sitokinleri ve büyüme faktörlerini tanır ve bağlarlar.
- Birçok sitokin reseptörünün ekspresyonu özel sinyaller tarafından üretilir.

- Sitokinele verilen hücrel yanıtın çoğu yeni mRNA ve protein sentezini gerektirmektedir.
- Bir çok hedef hücre için sitokinler hücre bölünmesini düzenler yani büyüme faktörü gibi etki ederler (56).

### 2.1.5 Etki Tarzları

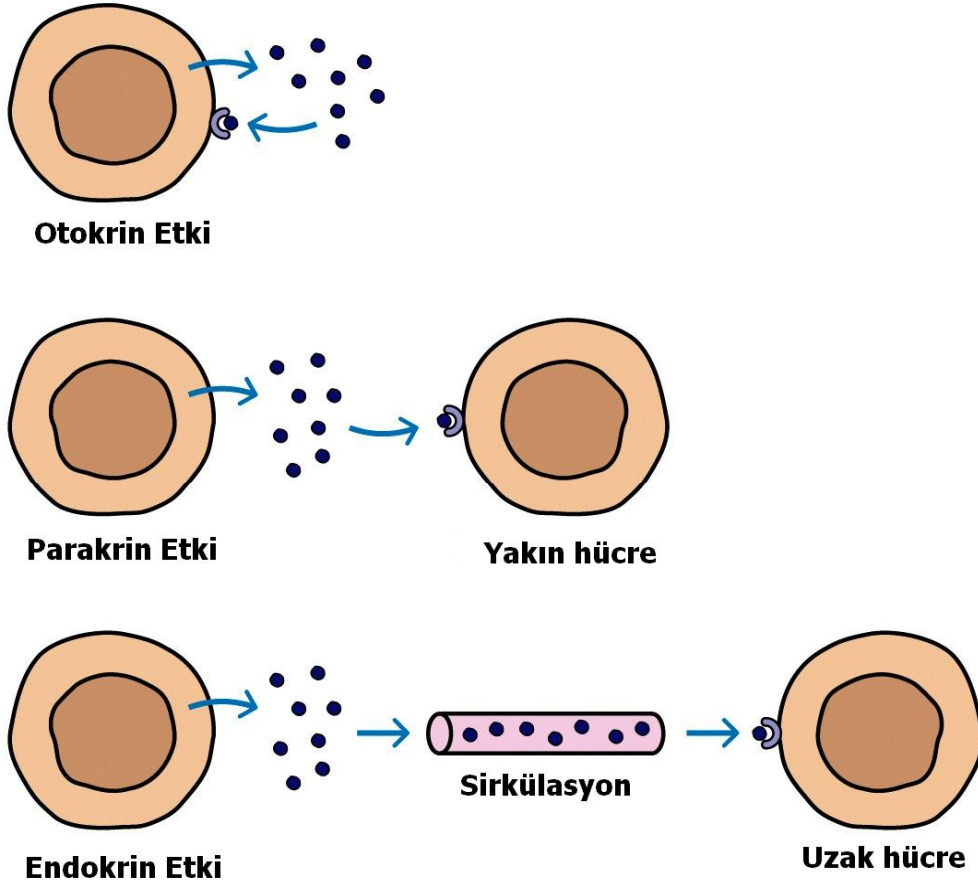
Sitokinler birçok yönden hormonlara benzerler. Her ikisi de hücreler tarafından salgılanıp, çok düşük dozlarda bile kendisi için uygun reseptörleri taşıyan hücreleri etkiler, hormonlar gibi mRNA ve protein sentezini uyarırlar. Hücre dışarıdan gelen uyarımlardan sonra sitokin sentezine başlar ve uyarım bitince durdurur. Sentezlenen sitokinler hemen salgılanır, hücre içinde biriktirilmez. Genel olarak sentezleri gen transkripsiyonu ile başlatıldığından sitokin salınımı geçicidir ve hızlı gerçekleşir. Sitokinler, diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar (33).



**Şekil 3.** Sitokinlerin etki mekanizması (19).

Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücrel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücrel reseptörlerine bağlanırlar. Sitokin üretimi sınırlı ve bölgeseldir, depolanamaz. Bu nedenle ihtiyaç halinde yeni bir gen transkripsiyonu gerekmektedir.

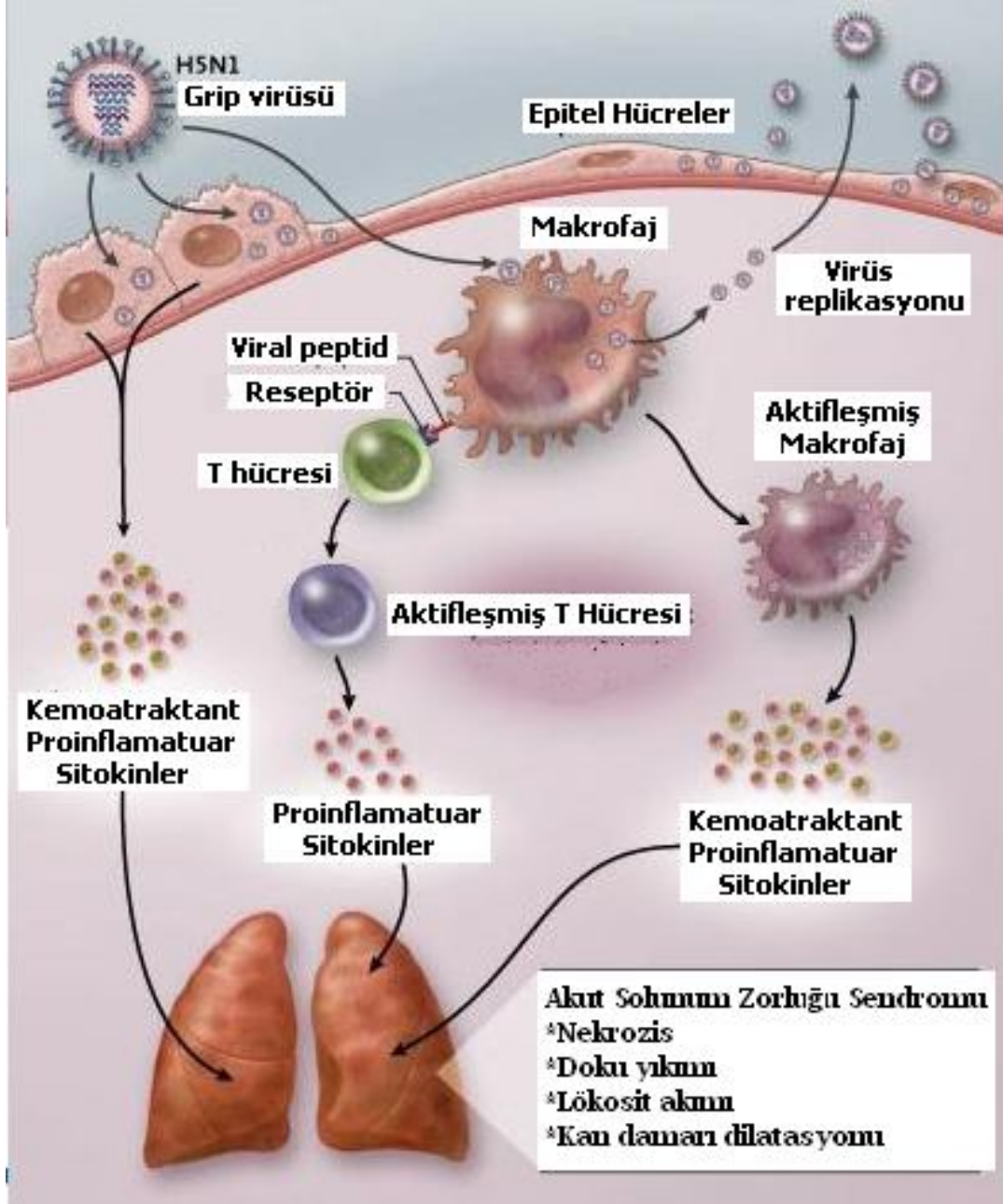
Transkripsiyon periyodu kısadır. Sonuç olarak hızlı sentez hızlı salınımla birlikte olur. Sitokinler birbirlerinin sentezini ve/veya salınımını etkilemektedir (76). Sitokinlerin etki tarzları etkiledikleri hücre ve bunun uzaklığına göre üç şekilde olur. Bunlar; otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir (21). Üçüncü etki tarzında sitokinler salgılandıktan sonra vücuda dağılarak uzak dokulardaki hücreleri etkileyebilirler. Nadiren görülen bu etki tarzı “endokrin etki” olarak nitelendirilir (21, 33).



**Şekil 4.** Sitokinlerin etki tarzları (19).

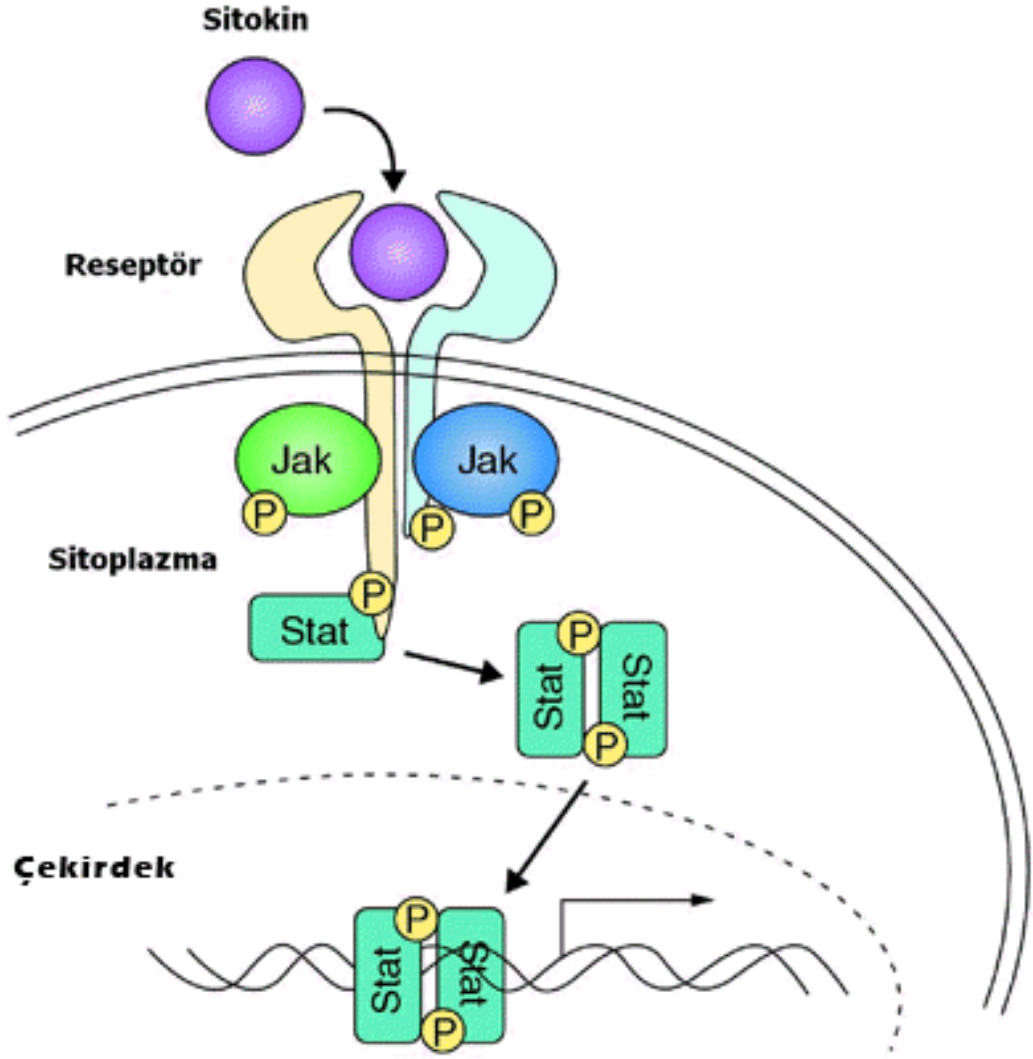
Çoğunlukla sitokinler lokal olarak üretilir ve etki ederler. Az bir kısım, sistemik dolaşıma girer ve önemli fizyolojik etkiler oluştururlar. Ancak, ‘endokrin’ rolleri, klasik endokrin hormonlarınkinden biraz farklıdır. Endokrin hormonlarının amacı normal dokular ve tüm organizmanın etkili fonksiyonunu sağlamak iken, dolaşımda

fizyolojik bir role sahip olan sitokinler, üretildikleri dokuya normal fonksiyonunu geri vermekle ilgilidirler. Aslında, dokular ağır biçimde zorlandıklarında ve büyük miktarlarda sitokin dolaşıma girdiğinde, ateş, hastalık semptomları, kaşeksi ve çeşitli hormon dengesizlikleri dahil sistemik homeostazın bozulmasından sorumlu olabilirler (38).



**Şekil 5.** Akut solunum zorluğu sendromunda sitokinlerin davranışı (54).

Bir sitokin hücre üzerindeki etkisini gösterebilmesi için mutlaka reseptörlerine bağlanması gerekir. Bu açıdan bakıldığında sitokin reseptörleri sitokinler kadar önemlidir. Hücre yüzeyindeki sitokin reseptörlerinin sayısı uyarım sonucu artırılabilir.



**Şekil 6.** Sitokin reseptörlerinin sinyal iletimi (21).

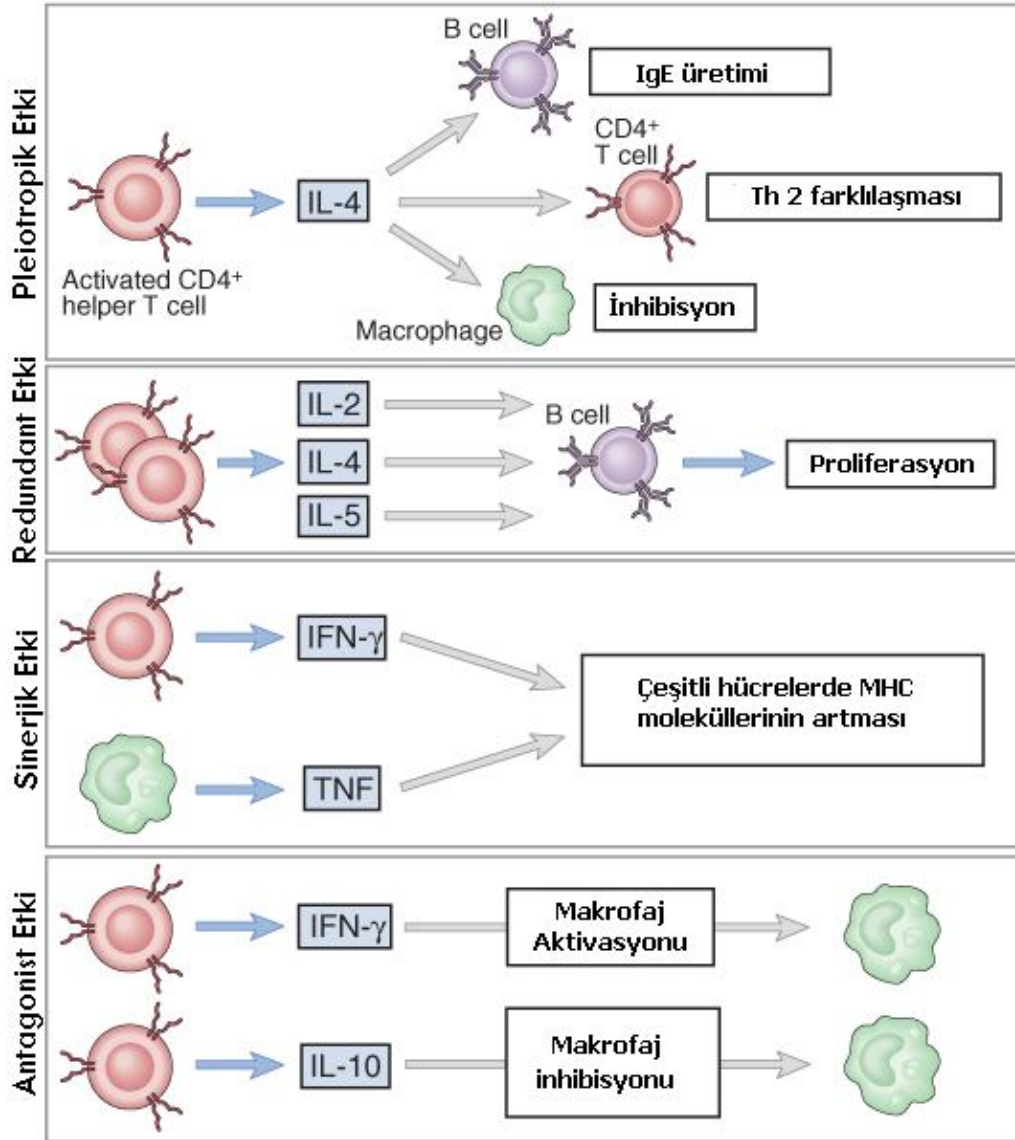
Reseptörler sitokin sinyallerini hücreye çeşitli yollarla iletebilirler. Çoğu sitokin reseptörü hücre yüzeyinde tek bir zincir halinde bulunur. Sitokin bu zincire göre düşük affinite ile bağlanır. Bu aşamadan sonra, reseptörün sinyal iletimi ile ilgili diğer zinciri ilk zincire bağlanır. Böylece sitokin-reseptör bağlantısı tamamlanır ve sağlamlaştırılır. Bu durumda reseptörün bir zinciri sitokin tanıyan bölüm, diğer zincir ise hücreye sinyal ileten bölümü olmaktadır. Bu bağlamadan sonra sinyal iletici zincirin intrasitoplazmik bölümü, sinyalleri hücre için protein kinaz sistemi vasıtasıyla iletir. Eğer farklı sitokinlere has reseptörlerin sinyal iletim zinciri ortak ise



sitokinlerin hücre üzerindeki etkisi aynı olur. Buna karşın, eğer tek bir sitokine has reseptör farklı sinyal iletim zincirleri taşıyabiliyorsa sitokinin hücre üzerinde farklı etkileri olur. Bu mekanizmadan başka, büyüme faktörü reseptörleri, sitoplazmik kısımlarında sahip oldukları enzimatik aktivite ile sinyal iletimini gerçekleştirirler (79).

Sitokinlerin, benzer diğer polipeptid hormonlarında olduğu gibi, aktivasyonu hedef hücre yüzeyinde bulunan özgül reseptörlere bağlanmasına bağlıdır. Özgül reseptörün ekspresyonu ise özgül sinyaller aracılığıyla düzenlenir (6).

Bazı sitokinlerin üretimi veya etkisi diğer sitokinler tarafından engellenebilir (antagonizm) veya arttırılabilir (sinergizm). Ayrıca bir sitokinin üretimi genellikle kendinden önceki sitokinin etkisiyle başlatılır. Sitokinler karakteristik olarak multipl ve birbirlerinin içine geçen biyolojik aktiviteye sahiptirler (71).



Şekil 7. Farklı sitokinlerin birlikte etki tarzları (71, 103).

## 2.2 Tümör Nekrozis Faktör Alfa

### 2.2.1 Tanımı ve Tarihçesi

15 ile 60 kilodalton (kDa) ağırlığında olan TNF başlıca makrofaj ve T lenfositlerden salgılanan bir sitokindir (96, 103). TNF'nin TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$  olmak üzere iki formu vardır. TNF- $\alpha$  kaşektin ve TNF- $\beta$  Lenfotoksin- $\alpha$  olarak ta bilinir (94). 185 amino asitlik bir glikoprotein hormonudur, ancak bazı hücreler daha uzun veya daha kısa izoformlarını salgılayabilir. İnsanlarda 7. kromozomda kodlanır. İki tipi kodlayan genler de doku uyşurluk antijeni'de (MHC) bulunmaktadır. TNF- $\alpha$ , makrofajlar ve bazı diğer doku hücreleri, TNF- $\beta$ , T hücre lenfositleri tarafından üretilir (87). TNF- $\alpha$ , makrofajlar ve diğer proinflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu takiben kanda en erken saptanan sitokinlerden birisidir (66).

TNF- $\alpha$ 'nın keşfi, immünolojik sistem biyolojisinin anlaşılması açısından önemli bir ilerlemedir ve klinisyenlerde; gerek önemli birçok hastalığın patagenezinin anlaşılmasına yardımcı ve gerekse de tedavi edici bir ajan olarak ümit verici olması nedeniyle heyecan uyandırmıştır.

1800'lerin sonlarında kanser hastalarını tedavi etmek için ilk olarak William B. Coley tarafından "Coley toksini" olarak adlandırılan ölü bakteri aşılı kullanılmıştır. Tümörlerin bu tedavi ile gerçekten gerilemesine rağmen bu kaba tedavi metodu, kemoterapi ve radyoterapinin çok daha rasyonel sonuçlar vermesi nedeniyle ve taşıdığı toksisite nedeniyle terk edilmiştir. Mikropların kanser tedavisindeki bu potansiyel rolü, ABD Kanser Araştırma Enstitüsünde çalışan William B. Coley'in kızı Helen Coley Nauts'ın çabaları ile devam etmiştir (89).

1975 yılına kadar ise herhangi bir gelişme sağlanamamış ve nihayet o yıl Carswell ve Old adlı iki araştırmacı BCG ile infekte edilen sıçanlara endotoksin uygulandığında serumda beliren bir faktörün sarkomların hemorajik nekrozuna yol açtığını göstermişler, bu hipotetik maddeyi de TNF olarak isimlendirmişlerdir (14).

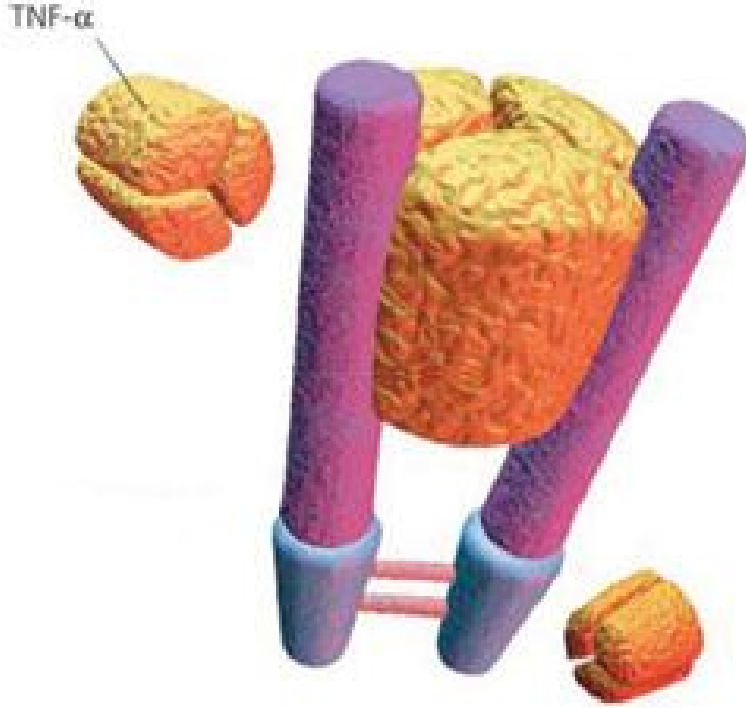
1984'te Aggarwal ve ark. (2) TNF'yi pürifiye ve klon etmiştir. Böylece TNF'nin yaklaşık bir asır süren temel tanımlanma süreci tamamlanmıştır. 1985 yılına kadar kaşeksiye yol açan bir maddeden söz edilmiştir. Bu madde, endotoksin ve diğer

protozoal ya da bakteriyel ürünlerin makrofajları uyarması sonucu üretilmekte, *in vivo* ve *in vitro* şartlarda lipoprotein lipaz enzimini inaktive etmektedir. Beutler ve ark. (6) ilk defa kaşektin olarak isimlendirilen bu maddeyi saflaştırmış ve 17 kDa ağırlığında bir protein olduğunu tanımlamışlardır. Beutler ve Cerami (7), 1986 ve 1987 yıllarında yaptıkları çalışmalarda ise TNF ile kaşektinin aynı madde olduğunu kanıtlamışlardır. Birçok yayında TNF ve kaşektin birlikte veya birbirinin yerine kullanılmaktadır (6, 7).

### 2.2.2 Yapısı

Kaşektin olarak ta bilinen ve 17 kDa'luk bir protein olan TNF- $\alpha$ , lipopolisakkarit içeren gram negatif bakteriyel komponentler ve diğer enfeksiyöz ajanların stimülasyonundan sonra makrofajlar ve monositlerce salınan sitokinlerden biridir. Doğal öldürücü ve mast hücreleri tarafından da salınabilen TNF- $\alpha$ 'nın esas fizyolojik fonksiyonu, nötrofil ve monositleri enfeksiyon alanına çekerek aktive etmektir.

İnsan TNF- $\alpha$ 'sının propeptid formu 233 aminoasitten oluşmakta ve bir adet disülfid köprüsü içermektedir. Sekresyondan önce veya sekresyon sırasında propeptidin N terminalinden 76 aminoasitlik bir bölüm enzimatik yolla uzaklaştırılarak, 157 aminoasitten oluşan 17 kDa ağırlıktaki olgun TNF- $\alpha$  formu ortaya çıkar. TNF- $\alpha$ , nonglikozile bir moleküldür (12, 89).



**Şekil 8.** TNF- $\alpha$ 'nın yapısı (97).

### 2.2.3 Özellikleri

TNF- $\alpha$  düşük yoğunluklarda (yaklaşık  $10^{-9}$ M) lökosit ve endotel hücreleri için lokal olarak parakrin ve otokrin düzenleyicidir. Düşük yoğunluklarda biyolojik etkileri şunlardır:

- Lökosit ve nötrofillerin endotel hücre yüzeyini adezyon molekülleri aracılığı ile daha yapışkan hale getirerek damar endotel hücrelerinin yeni yüzey reseptörlerini ekspresse etmelerine neden olur.
- İnflamatuar lökositleri özellikle nötrofilleri mikropları öldürecek şekilde aktive eder.
- IL-1, IL-6, kemokinler ve TNF- $\alpha$ 'nın kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır. IL-6 ile sinerjik etki gösterir.

- Virüslere karşı interferon benzeri koruyucu etki gösterir.
- Endojen pirojen olarak etki ederek ateşi yükseltir.

TNF- $\alpha$ 'nın bu etkileri mikroplara karşı verilen inflamatuvar yanıtta önemlidir (89).

**Tablo 2.** TNF- $\alpha$ 'nın genel özellikleri (65).

<b>ÖZELLİK</b>	<b>Tümör nekrozis faktör</b>
<b>Kromozom</b>	7
<b>Proform</b>	233 aminoasit-----TNF- $\alpha$ 204 aminoasit-----TNF- $\beta$
<b>Olgun form</b>	157 aminoasit----- TNF- $\alpha$ 171 aminoasit-----TNF- $\beta$
<b>Hücre kaynakları</b>	Makrofajlar, T ve B lenfositler, Keratinositler, Fibroblastlar, Endotel hücreleri, Astrositler (TNF- $\alpha$ için ), T lenfositler (T H1 alt grubu ), EBV B hücre dizileri ( TNF- $\beta$ )
<b>Reseptör</b>	300 kDa glikoprotein Kd = 1 / 100000000000 mol / L 1.000—10.000 bölge/hücre
<b><i>In vivo</i> etkileri</b>	Lokal nötrofilik infiltrasyon Schwartzman reaksiyonu ve tümör nekrozu Endojen pirojen Kaşeksi Radyasyona karşı koruma Yeni damar oluşumu

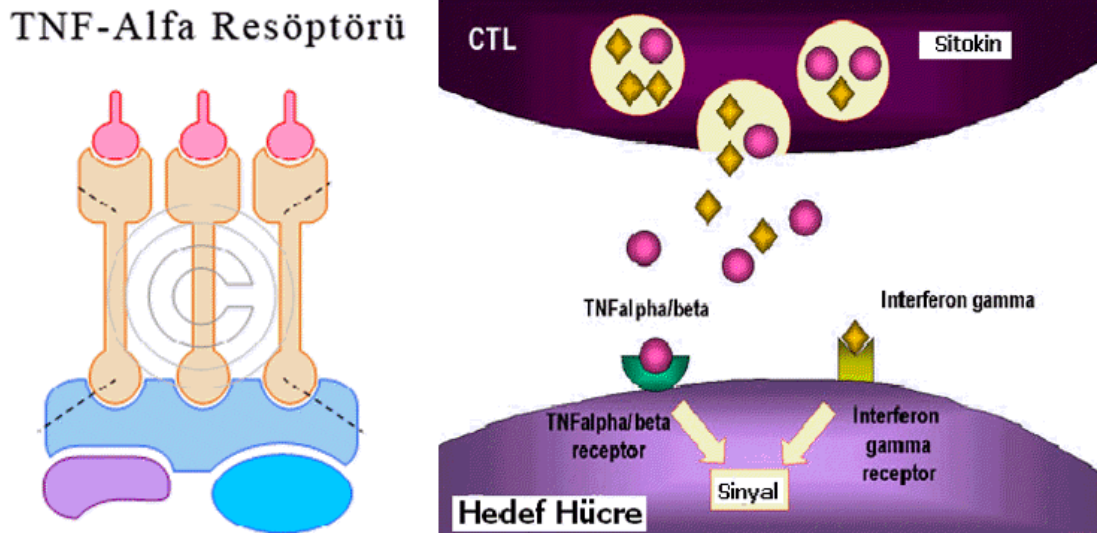
### 2.2.4 Etki Mekanizması

TNF- $\alpha$  hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. TNF- $\alpha$  reseptör kompleksi, hedef hücrede birçok biyolojik aktivitenin başlamasına neden olur. TNF- $\alpha$  reseptörü, 300kDa moleküler ağırlığında bir proteindir ve iki alt üiteden oluşur. Etki mekanizması 3 basamakta incelenebilir.

1.Basamak: TNF- $\alpha$ 'nın hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanması  
TNF- $\alpha$  reseptör kompleksi oluşması

2.Basamak: G protein sisteminin ikincil mesajları aktive etmesi

3.Basamak: Değişik hedef hücrelerde fosforilasyon reaksiyonlarının hızlanması intraselüler cAMP birikmesi ve protein kinaz A aktivasyonu (89).



**Şekil 9.** TNF- $\alpha$  reseptörü ve TNF- $\alpha$ 'nın reseptöre bağlanması (12).

### 2.2.5 Fizyolojik Etkileri

Doğal öldürücü ve mast hücreleri tarafından da salınabilen TNF- $\alpha$ 'nın esas fizyolojik fonksiyonu, nötrofil ve monositleri enfeksiyon alanına çekerek aktive etmektir. Aynı zamanda lökositlerin endotelial hücrelere yapışmasında yardımcı olur ve bunların fagositoz ve kemotaksisini artırır. Makrofaj indüklü anjiogenezise yol açan

makrofajları etkileyerek, periodontal hastalıkla birlikte seyreden vasküler değişikliklerde rol oynayabilir. Ayrıca dişeti fibroblastları dahil bütün fibroblastları uyarak kollajenaz üretmelerine neden olur. Osteoklastların aktivasyonunda da rol oynar ve bunları kemik rezorpsiyonu için stimüle eder (19).

Hepatositlere etki ederek serum amiloid A ve P proteini, kompleman faktör 3, haptoglobulin, C-reaktif protein, A1- asid glikoprotein, Faktör B gibi bazı akut faz proteinlerinin sentezini artırır (91).

Damar endotelinin prokoagulan ve antikoagulan aktiviteleri arasındaki dengeyi değiştirerek pıhtılaşma sistemini aktive eder.

Kemik iliğini baskılayarak ana hücre bölünmesini engeller. Sürekli TNF verilmesi lenfopeni ve immun yetmezliğe neden olur.

TNF- $\alpha$ , deney hayvanlarına uzun süre verildiğinde kaşektik metabolik değişikliklere neden olur. Kaşeksi, TNF- $\alpha$  ile uyarılan iştah azalması sonucu oluşur. TNF- $\alpha$  lipoprotein lipaz aktivitesini artırır. TNF- $\alpha$ 'nın bizzat kendisi deney hayvanlarında kaşeksiye neden olurken, IL-1 gibi sitokinler tüberkiloz ve kanser gibi kronik hastalıklarda kaşeksi nedenleri arasındadırlar. Gram negatif bakteriyel sepsis durumlarında çok yüksek miktarda TNF- $\alpha$  üretilir ve plazma TNF- $\alpha$  yoğunluğu artar. Bu yoğunluktaki TNF- $\alpha$ , dolaşımda kollaps ve yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC)'ya neden olur. Yani TNF, septik ve endotoksik şokun önemli bir mediyatörüdür. Yüksek düzeyde infüzyonu ölümcüldür ve şok benzeri bir sendrom oluşturur (34).

TNF- $\alpha$ 'nin pik konsantrasyonlarının artan vücut ısısı ve kalp hızı ile olduğu kadar dolaşımdaki Adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve epinefrin düzeyi ile de ilişkili olduğu saptanmıştır. TNF- $\alpha$  seviyesinin proinflamatuvar yanıtı takiben aniden artıp sonra hızlı bir şekilde kaybolduğu tespit edilmiştir (54).

İntravasküler koagülasyona neden olarak doku perfüzyonunu azaltır (38). TNF- $\alpha$ 'nın en fazla etki gösterdiği yer, immunité, koagülasyon ve homeostaz üzerinde düzenleyici rolü olan endotel hücreleridir. Kan komponentleri ile ilişkiye girerek aktif mekanizmalar oluşturmaktadır. Bu güçlü fonksiyonları nedeniyle doku lezyonlarının oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Endotel hücreler tüm sitokinlerle reaksiyona girmekte ve TNF- $\alpha$  hariç, diğer sitokinlerin hepsi endotel



hücreleri tarafından da salgılanmaktadır. TNF- $\alpha$  ve diğere sitokinler, endotel ile sıkı cevap ilişkisi olan immünolojik hücrelerden salınmakta ve salınan moleküller polimorfomononükleer hücreler ile endotel arasındaki ilişkide sinyal görevi görmektedir (68).

Ciddi sepsisli olguların yaklaşık %50'sinde görülen DIC bu hastalarda ortaya çıkan multi organ yetmezliğinden başlıca sorumlu mekanizmadır. Örneğin TNF- $\alpha$ , IL-10 sentezini arttırarak kendi etkisinin kontrolünü de sağlamış olur (100).

TNF- $\alpha$ , ağır metabolik bozukluklara neden olabilir. Bu etki, glukozun kaslarda aşırı kullanımına ve karaciğerde glukozun tekrar yerine koyulamamasına bağlıdır. TNF- $\alpha$ 'nın hem diyabetik hem de nondiyabetik olgularda insülin direncine sahip olduğu kaydedilmiştir (26). TNF- $\alpha$  ile Vücut kitle indeksi (BMI) arasındaki ilişki tartışmalı olup henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Bununla birlikte BMI ile adipoz doku TNF- $\alpha$  mRNA seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulmuştur (48).

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 ve IFN- $\gamma$  kalp fonksiyonları üzerine depressör etkileri olan sitokinlerdir. Özellikle TNF- $\alpha$ , kalp üzerine etkileri en çok incelenen sitokindir. TNF- $\alpha$ , septik şok, kansere bağlı kaşeksi ve otoimmün inflamasyonlarda birçok patolojik değişikliği kontrol eden sitokindir. Kalp yetmezliğinde, TNF- $\alpha$  düzeyinin yükseldiği ve bu sitokinin reseptörlerinin artmış olduğu, son yıllarda, kalp yetmezliğinin yanısıra miyokardit, iskemik kalp hastalığı, idiyopatik dilate kardiyomiyopati ve septik kardiyomiyopatide de TNF- $\alpha$  düzeyinin yükseldiği ve bunun bir kısmının kalp dokusundan salındığı tespit edilmiştir (28).

TNF- $\alpha$ 'nın kardiyak fonksiyon üzerine etkisi salınım miktarına ve süresine bağlıdır. Yüksek TNF- $\alpha$  seviyeleri sol ventrikül fonksiyon bozukluğu, kardiyomiyopati ve akciğer ödemi dolayısıyla konjestif kalp yetmezliği ile ilişkilidir. İnsülinin tarafından uyarılan glukoz kullanımını glukoz taşıyıcısı olan GLUT 4 sentezini inhibe ederek azaltır. Kanser, endotoksemi, travma veya TNF'nin arttığı herhangi bir durumda periferik insülin rezistansı görülür. Karaciğerde lipogenezi ve VLDL yapımını arttırır ve hipertrigliseridemiye neden olur (74).

TNF- $\alpha$ 'nın fizyolojik etkileri genel olarak kaşeksi, endotoksik şok, inflamasyon, doku yenilenmesi, infeksiyon ve immünite ile sitotoksisite şeklinde verilebilir (50).

**Kaşeksi:** TNF- $\alpha$  ile kaşeksi arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Adipositler ve iskelet kası hücrelerinin TNF- $\alpha$  ile inkübasyonundan sonra katabolizmanın, lipolizin ve glikojenolizisin arttığı bildirilmektedir. TNF- $\alpha$  tüm vücudun enerji tüketimini, lipolizi ve protein döngüsünü artırırken, diğer yandan da iştahsızlık ve anemi yaparak total vücut kitlesinin kaybına yol açar (89).

**Endotoksik (Septik) Şok:** Septik şok yüksek ölüm oranıyla ilişkili olan başlıca gram negatif bakterilerinin sebep olduğu klinik bir sendromdur. TNF- $\alpha$ 'nın akut sistemik salınımının septik şok patogenezinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. TNF- $\alpha$ 'nın salınımı, ateş, miyalji, kusma ve baş ağrısıyla korelasyon göstermektedir. Monoklonal anti TNF- $\alpha$  antikoları letal etki gösteren endotoksin enjeksiyonlarından sonra farelere verildiğinde bu etkinin azaldığı bildirilmektedir. TNF- $\alpha$ 'nın yüksek plazma düzeyleri, meningokok enfeksiyonunda, serebral malaryada ve gram (-) purpura fulminansda mortalite artışı ile ilişkilidir .

**İnflamasyon:** İnflamasyon, inflamatuvar bir uyarıya cevap olarak elde edilen dinamik olaylar zinciridir. İnflamasyon alanında vazodilatasyonu takiben kan akımı değişiklikleri, damar permeabilite artışı, ödem sıvısı oluşumu, lokal lökosit birikimi gözlenir. Bu birbirini takip eden olayların gelişiminden çeşitli mediyatörler sorumludur. İnflamasyonda mediyatör çağı 1927 yılında Thomas Lewis'in, histaminin klasik olarak bilinen etkisini tanımlamasıyla başlamıştır. Lewis, dokunun künt travmaya maruz kalmasıyla açığa çıkan histaminin, doğrudan doğruya lokal kan damarlarına etki ederek travma bölgesinde:

- Saniyeler içinde kızarıklık
- 15-30 saniye içinde, travmanın birkaç santimetre çevresinde yayılan kırmızılık
- 2-3 dakika içinde vasküler permeabilite artışına bağlı olarak oluşan lokal ödem geliştiğini tanımlamıştır.

TNF- $\alpha$ , monosit ve nötrofiller için kemotaktik bir ajandır. Fagositozu, endotele yapışmayı, süperoksit türevlerinin salınımını ve insan endotel doku kültürlerinde prokoagulan aktiviteyi uyarmaktadır. TNF- $\alpha$ , prostasiklin (PG-2), endotel kaynaklı damar genişletici faktör (EDRF) ve platelet aktive edici faktör (PAF) sentezini

uyarmaktadır. Böylece erken dönemde vazodilatasyondan ve lökositlerin damarda birikmesinden sorumludur. PAF'ın erken dönemde (30 dakikada) nötrofillerin endotele yapışmasında etkili olduğu söylenmektedir. TNF- $\alpha$  direkt olarak endotelde zedelenme yapmaz, endoteli, lökositlerin zedeleyici etkisine karşı duyarlı kılar.

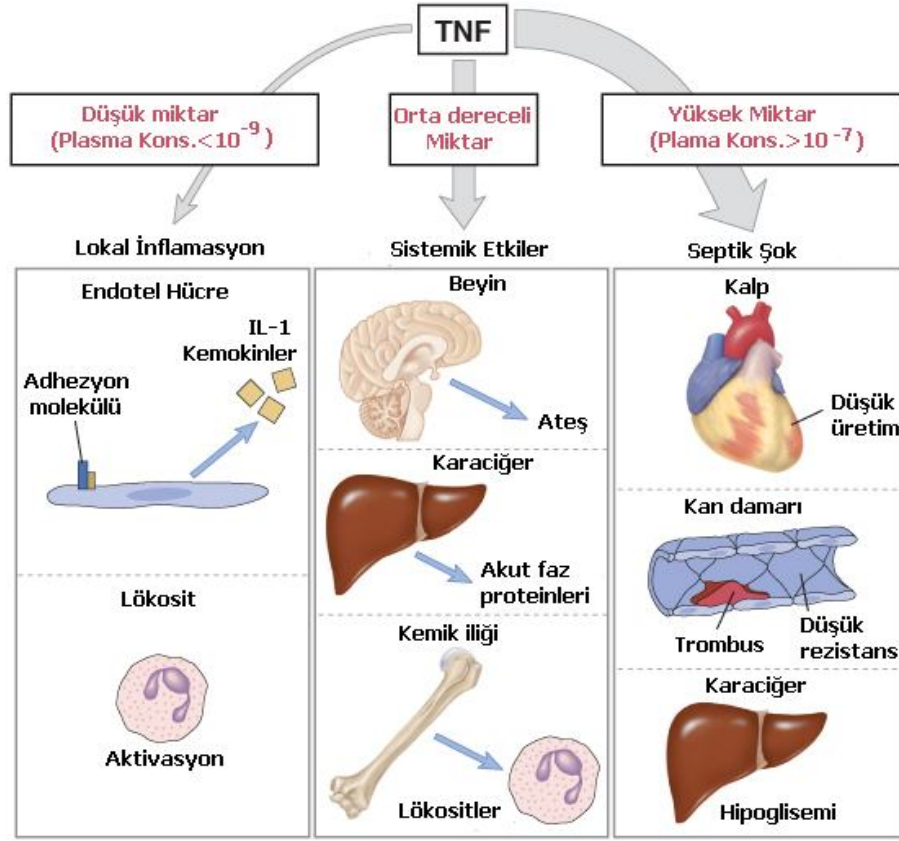
İndüklenebilen hücre adhezyon molekülü (INCAM-110) ve vasküler hücre adhezyon molekülü (VCAM-1) inflamasyonun geç fazında (12-24 saat) görev yaparlar. Bu faz endotel lökosit adezyon molekülünün (ELAM-1) azalmaya başladığı dönemdir. Majör histokompatibilite (MHC) antijenlerinin endotel hücrelerinden açığa çıkması, bu hücreleri duyarlılaşmış T hücreleri için antijen sunucu veya hedef hücre haline getirmektedir. TNF- $\alpha$ 'nın serum ve dokulardaki artışı, romatoid artrit, renal allograft rejeksiyonu ve Graft Versus hastalığı gibi durumlarda gerçekleşmektedir.

**Doku yenilenmesi:** TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$  kırıkta ve kemik rezorpsiyonunda önemli rol oynar. TNF- $\alpha$  proteoglikan sentezini inhibe ederek bazı eklem hastalıklarında kırıkta fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. TNF- $\alpha$ , fibroblast ve mezenkimal hücre proliferasyonunu direkt uyararak sağlam ve inflamatuvar dokuların yeniden şekillenmesinde büyüme faktörü etkisi yapar. Ayrıca aynı görevi yapan sitokinlerin de salınımını uyararak TNF- $\alpha$ , epidermal büyüme faktörünün mitojenik etkisini ve bu faktöre duyarlı hücre yüzey reseptörlerini arttırmaktadır. TNF- $\alpha$  neoanjiogenezis için promotör görevi yapmaktadır.

**İnfeksiyon ve immünite:** TNF- $\alpha$  fagositozu aktive ederek nötrofillerin süperoksit anyon üretimini ve degranülasyonunu dolayısı ile mikrop öldürücü etkilerini artırır. *In vitro* olarak TNF'nin antişistozomal, antimikobakteriyel ve antiviral etkileri vardır. T lenfositlerde hücre aktivasyonuna yol açar ve IL-2 bağımlı T hücrelerinin proliferasyonunu artırır.

**Sitotoksikite:** TNF- $\alpha$ , apoptozise ve nekrotik hücre lizisine yol açmaktadır. Bazı kanser hücreleri TNF- $\alpha$ 'nın sitotoksik etkisine duyarlı iken bazıları tamamen duyarsızdır (89).

TNF- $\alpha$  pankreas adacık hücrelerine toksik etki yaparak, monosit ve makrofajları olgunlaştırır, yangı hücrelerinin damar adezyonunu artırır, PMN lökositlerin antikor bağımlı sitotoksitesini artırır (94).



Şekil-10. TNF- $\alpha$ 'nın farklı konsantrasyonlardaki etkileri (78).

**Tablo 3.** TNF-  $\alpha$ 'nın fizyolojik etkileri (6).

TNF- $\alpha$ 'nın Fizyolojik Etkileri	Vasküler hücrelerde fosfolipaz A ve PAF sentezini artırma
	Nötrofil lökositler, makrofajlar ve endotel hücrelerinde $\alpha$ -1 antikomtripsinin inhibisyonu
	Bazı serbest radikaller ( $O_2^*$ ve $OH^*$ gibi) ve non-radikaller ( $H_2O_2$ ) aracılığıyla vasküler permeabilityyi artırma
	Bazı hücrelerden koloni stimüle edici faktörlerin salınımını etkileme
	Kan damarlarını etkileme, lökosit adhezyon moleküllerini indüklemeye ve prokoagulan maddelerin sentezini artırma.
	Damar düz kaslarını etkileme, IL-1 ve prostaglandin salınımını aktive etme

### 2.2.6 Klinik önemi

TNF- $\alpha$  iç organlardaki cerrahi veya travmatik yaralanmalar, yangı mediyatörlerin oluşumu ve akut faz proteinlerinin sentezi gibi homeostatik cevapların oluşumunda belirgin etkiye sahiptir. Akut travmaya karşı TNF- $\alpha$  salınımı hızlı ve kısa sürelidir. TNF- $\alpha$  üretiminin kısa sürmesi, ortamda regüle edilemeyecek kadar çok TNF- $\alpha$  aktivitesinin oluşmasını engelleyen efektif endojen mediyatörlerin olduğunu gösterir. TNF- $\alpha$ , stres sırasındaki kas katabolizması ve kaşeksi üzerine de önemli etkileri olan bir sitokindir. İskelet hücresinden mobilize olan aminoasitler hepatik dolaşımdaki sikluslar aracılığı ile enerji metabolizmasında kullanılırlar (21).

TNF- $\alpha$ 'nın obezite ve insülin direnci patogeneğinde, dolayısıyla da Tip 2 diyabet gelişiminde rolü vardır. Yağ dokusu kitlesi ve insülin direnciyle pozitif korelasyon gösterdiği ve obez bireylerde düzeyleri arttığı (48), Obez bireyler kilo verdiklerinde TNF- $\alpha$  düzeylerinde düşme olduğu kaydedilmiştir. Bununla birlikte anoreksia nervozada da hem TNF- $\alpha$  hem de reseptörünün plazma seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. Beta adrenerjik uyarılma da TNF- $\alpha$  sekresyonunu artırır (68).

Nekrotizan sitokinlerden olan TNF- $\alpha$ , immünohistokimyasal yöntemlerle düz kas hücrelerinde, endotele, aterosklerotik koroner, femoral ve karotis arterlerinde artmış

olarak tespit edilmiş ve lezyonun şiddeti ile TNF- $\alpha$  artışı arasında belirgin ilişki olduğu gösterilmiştir (4).

Ölüm oranları ve komplikasyonlar refrakter astımlı hastalarda yüksektir ve bu hastalar için tedavi seçenekleri sınırlıdır. Astımlı hastaların hava yollarından alınan lavaj örneklerinde TNF- $\alpha$ 'nın artmış konsantrasyonlarda bulunduğu ve mast hücreleri tarafından fazla miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (5).

TNF- $\alpha$ 'nın artan vücut ısısı ve kalp hızı ile olduğu kadar dolaşımdaki ACTH ve epinefrin düzeyi ile ilişkili olduğu da saptanmıştır (18).

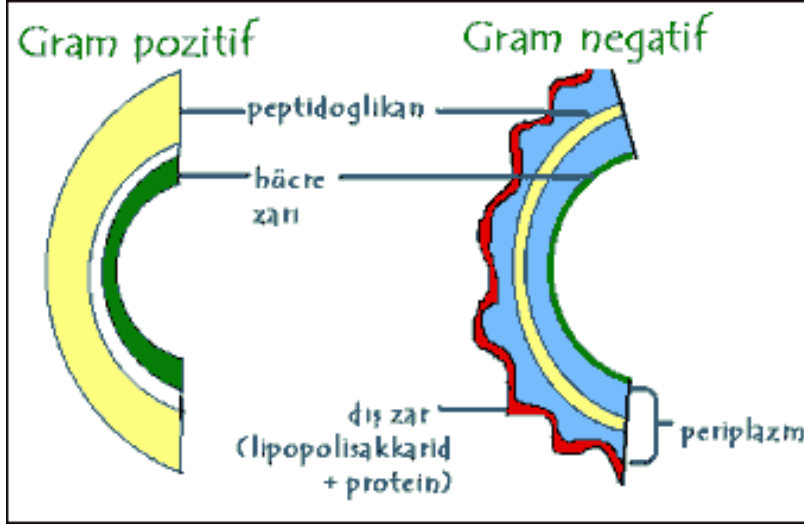
Duyarlı tümör hücrelerinin ve virüsle enfekte hücrelerin apoptozis yoluyla ölümünü sağlar. Sistemik olarak endojen pirojen etkisi gösterir ve yüksek ateşe neden olur. Bu sitokinler tarafından aşırı uyarım, şiddetli doku tahribine, hatta şoka neden olabilir (21).

*In vitro* çalışmalar, düşük doz TNF- $\alpha$ 'nın bazı malign hücre gruplarında proliferasyona neden olduğunu ortaya koymaktadır (96).

RA'lı hastaların sinovial sıvılarında yüksek seviyede TNF- $\alpha$  bulunduğu bildirilmiştir. Buna rağmen TNF- $\alpha$ 'nın eklem sıvısı veya kandaki değerleri, hastalık aktivitesi ile korelasyon göstermemektedir (71).

### **2.3 Bakteriyel Kaynaklı Lipopolisakkarit (LPS)**

Lipopolisakkarit, gram-negatif bakterilerinin dış membranının yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan ve membranı çeşitli kimyasalların saldırısından koruyan başlıca bileşendir. LPS, bakteri canlı organizmaya girdiğinde bakteriler tarafından salınan ve immün sistem hücrelerini uyaran bir endotoksindir. Birçok hücre tipinde proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu destekleyen CD14 / Toll-like-reseptör-4'e (TLR4) / MD2 reseptör komplekslerini bağlandığı için prototip bir endotoksin olarak davranır (15, 72, 81, 86, 92, 101).



**Şekil 11.** Gram negatif ve pozitif bakterilerin membran yapısı (99).

### 2.3.1 Tarihçe

1800’lerde Richard Pfeiffer hayvanlarda toksik şoka neden olan ısı dirençli bir toksin tanımlamış ve bu toksine endotoksin adını vermiştir. Daha sonra bu toksinin gram negatif bakterilerinin dış membranının başlıca bileşeni olan lipopolisakkarit olduğu saptanmıştır.

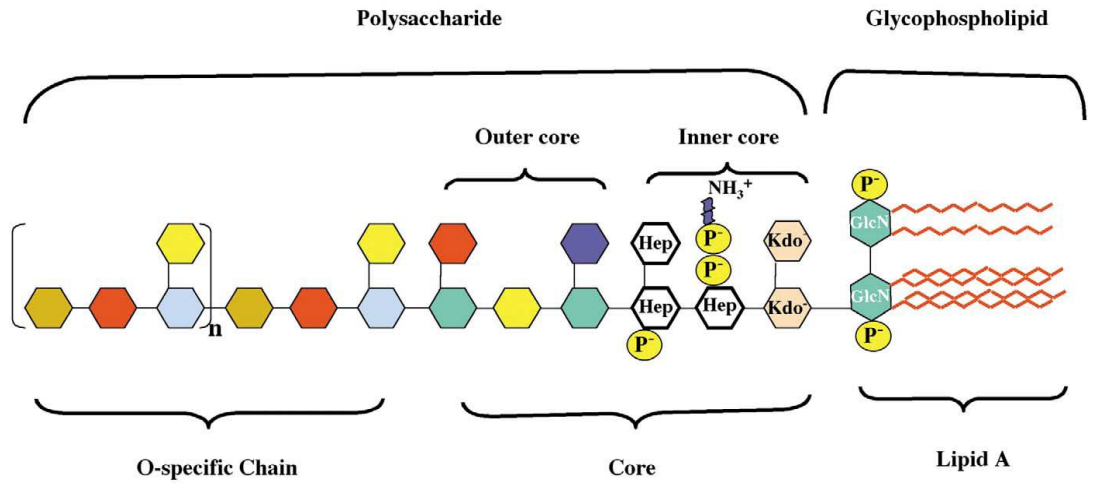
1950’lerden bu yana LPS’yi ekstrakte ve pürifiye etmek için çeşitli teknikler geliştirilerek temel yapısı hakkındaki çalışmalar, LPS moleküllerinin 2-20 kDa aralığında kütleyle sahip olduğunu göstermiştir. Günümüzde hem patojenik hem de patojenik olmayan yaygın bakteri türlerinin LPS yapılarını belirlemede manyetik rezonans ve kütle spektrofotometresi önemli bir yer tutmaktadır. 1954’ten bu yana LPS’nin lipid kısmının aktif olan bölge olduğu düşünülmektedir (34). Yapılan çalışmalarda ayrıca glikozidik çekirdek bölgesi ile CD14 reseptörleri arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (77).

### 2.3.2 Moleküler Yapıları

Lipopolisakkaritte her serotip için farklı antijenik özellik taşıyan bir oligosakkarit zinciri, benzer bakteriler arasında aynı yapıyı gösteren bir çekirdek oligosakkaridi ve tüm serotipler için aynı özelliğe sahip lipid komponenti (Lipid A) bulunur.

Literatürde LPS ve endotoksin aynı anlamda kullanılsa da aralarında fark vardır. LPS saflaştırılmış glikolipid yapıya sahiptir. Endotoksin ise LPS'e ek olarak az miktarda hücre duvarı proteinleri, lipidler, lipoproteinler ve polisakkarit içerir. LPS'nin toksisitesi çoğunlukla içerdiği Lipid A yapıdan kaynaklanır (40).

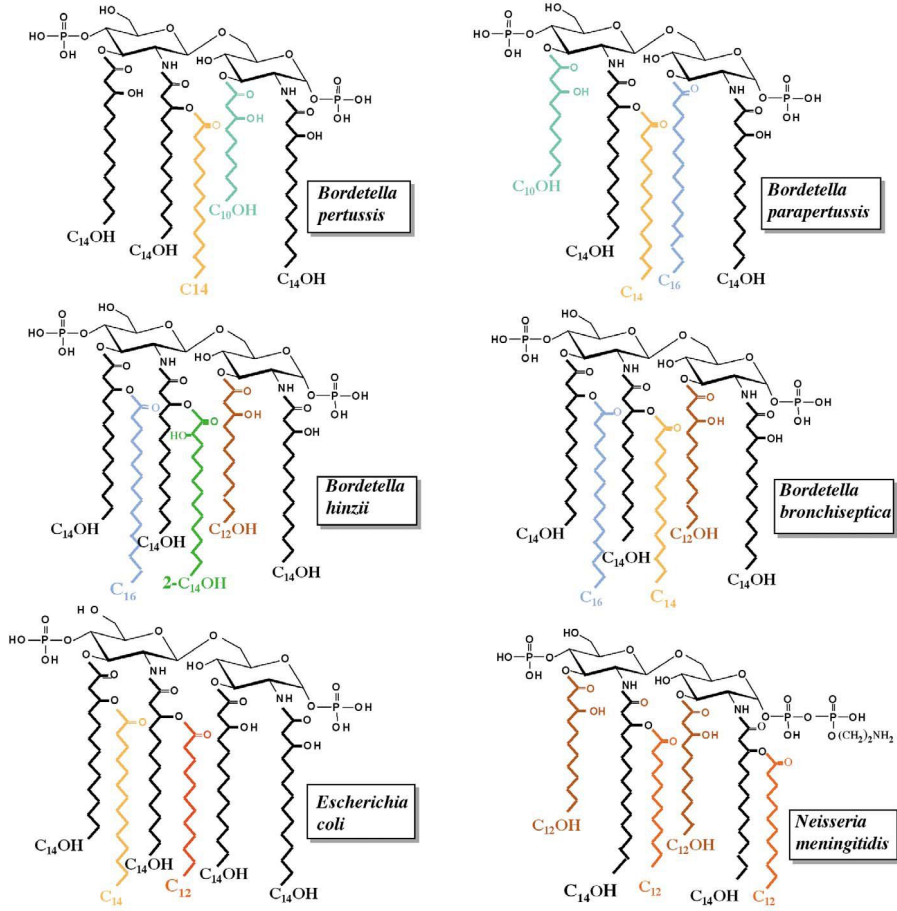
Polisakkarit grubu farklı bakteriler arasında büyük çeşitlilik gösterir. Endotoksinlerin moleküler ağırlığı yaklaşık 10 kDa olmasına rağmen, bunlar 1000 kDa'a varan büyüklükte öbekler oluşturabilirler (20).



Şekil 12. Lipopolisakkaritlerin yapısı (15).



Lipid A yapısı bağlanan yağ asiti farklılıklarından dolayı bakteriden bakteriye göre değişiklik gösterebilir.



**Şekil 13.** Yağ asiti farklılıklarına göre bazı LPS türleri (15).

LPS genelde liyofilize toz halinde ticari olarak temin edilir. E.coli, Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa gibi birçok gram (-) bakteriden elde edilmesine rağmen deneysel septik şok çalışmaları E.coli'den elde edilen LPS'ler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu grupta O26:B6, O55:B5, O111:B4 gibi farklı serotiplere sahip farklı suşlardan elde edilmiş LPS türleri mevcuttur. Toz halindeki LPS planlanan deneysel çalışma protokollerine göre suda çözünerek deney hayvanlarına periton veya damar içine tek doz veya infüzyon şeklinde verilir. Literatür incelendiğinde uygulanacak dozun 1 µg/kg ile 500µg/kg aralığında geniş bir doz aralığına sahip olduğu gözlenmektedir (30, 41, 58).

### 2.3.3 Etki Mekanizması

Gram-negatif bakterilerdeki dış membran tabakası bir fiziksel bariyer olarak rol oynar ve antimikrobiyal maddelerin hücreye girişini kısıtlar. LPS molekülleri hidrofobik maddelerin hücre içine girişini engeller.

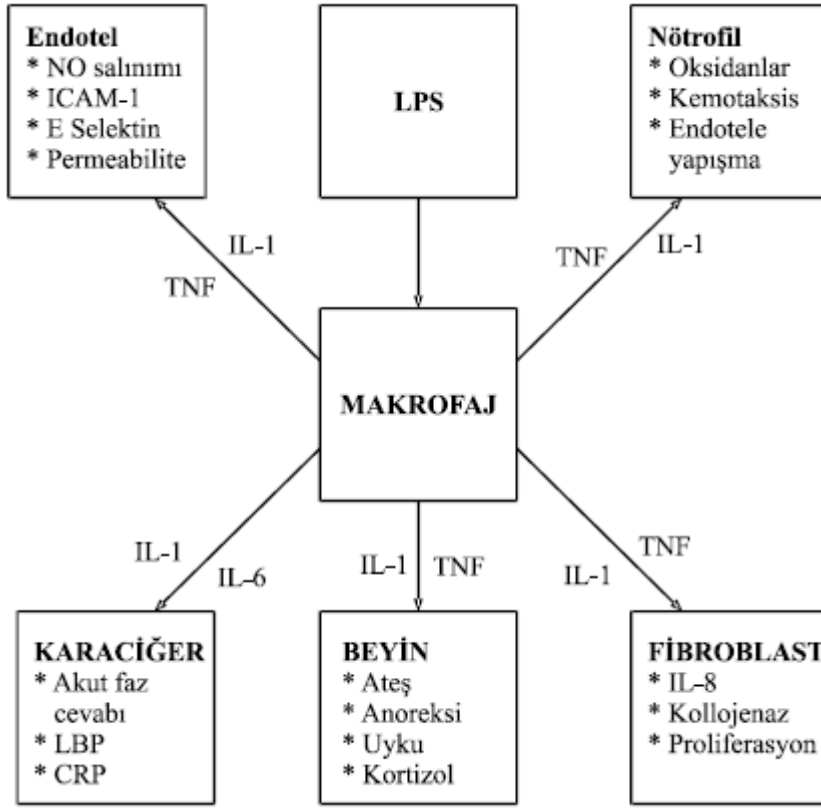
LPS, serumda bulunan lipid bağlayıcı proteine (LBP) bağlanarak, hücre zarında bulunan CD14 adlı reseptöre aktarılır. CD14, LPS'yi MD2 adlı proteine aktarır, MD2 ise TLR-4 ile ilişiktir.

CD14 ve TLR4, bağışıklık sisteminin çeşitli hücrelerinde (makrofaj ve dendritik hücreler dahil) bulunur. Makrofaj/endotel hücrelerin pro-enflamatuar sitokin ve nitrik oksit salgılamasını tetiklerler, bu da "endotoksik şok"a yol açar (75).

### 2.3.4 Fizyolojik Etkileri

LPS immün sistem ve birçok endojen medyatörlerin salınımını gerçekleştiren makrofajların birbirini etkilemesiyle hastalıktaki semptomların oluşmasına sebep olmaktadır (75). Yangıyı başlatan en güçlü komponentlerden biri olan LPS septik şok patogenezinde en önemli ajandır. Hayvanlara LPS enjekte edilerek şok benzeri bir durum gözlenebilir. LPS sitokinin aktivasyonuna neden olur ve enfeksiyon bulgularını taklit ederek HDL kolesterol düzeyini azaltır. Bu etkiyi lesitin kolesterol açıltransferaz enzim düzeyini azaltarak yapar. Ayrıca TNF- $\alpha$  veya IL-1 etkisiyle serum trigliserid ve kolesterol düzeyinin arttığı gösterilmiştir (26).

LPS, makrofajları aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) üretimlerini ve fonksiyonlarını etkiler (95). Endojen ve eksojen pirojen etki yaparak TNF- $\alpha$  üretimini uyarır (16, 40). Hayvanlara enjekte edildiğinde patofizyolojik etkiler meydana getirmektedir. Ratlara ve domuzlara LPS enjeksiyonundan sonra ACTH ve TNF- $\alpha$  seviyeleri pozitif korelasyon göstermekte, intravenöz olarak ratlara enjekte edildiğinde ise glikaminin hızlı bir şekilde artışı gerçekleşmektedir (5, 24, 85).



Şekil 14. LPS'nin biyolojik etkileri (84).

### 2.3.5 LPS ile TNF- $\alpha$ Arasındaki ilişki

Makrofajların, *in vivo* üretilen TNF- $\alpha$ 'nın başlıca kaynağı olduğuna inanılır. LPS ise TNF- $\alpha$  üretimi için makrofajların en güçlü uyarıcısıdır. TNF- $\alpha$  aktivitesinin tümör hücrelerini öldürdüğü gösterilmiş ve vücut harabiyetine veya kaşeksiye sebep olduğu bulunmuştur. Farelere direkt TNF- $\alpha$  infüzyonunun kas erimesini hızlandırdığı tespit edilmiştir (25).

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı yapısında bulunan ve aynı zamanda bir endotoksin olan LPS, TNF- $\alpha$  üretimini tetikler. TNF- $\alpha$  ise, nötrofil ve monositler için kemotaktiktir ve nötrofil aktivitesini artırır. TNF'nin lokal konsantrasyonunun artması, bakteriyel enfeksiyonlarda ortaya çıkan semptomlara (septik şok, ateş, kas ağrısı, uyuşukluk, baş ağrısı, mide bulantısı ve inflamasyon) neden olur (51).

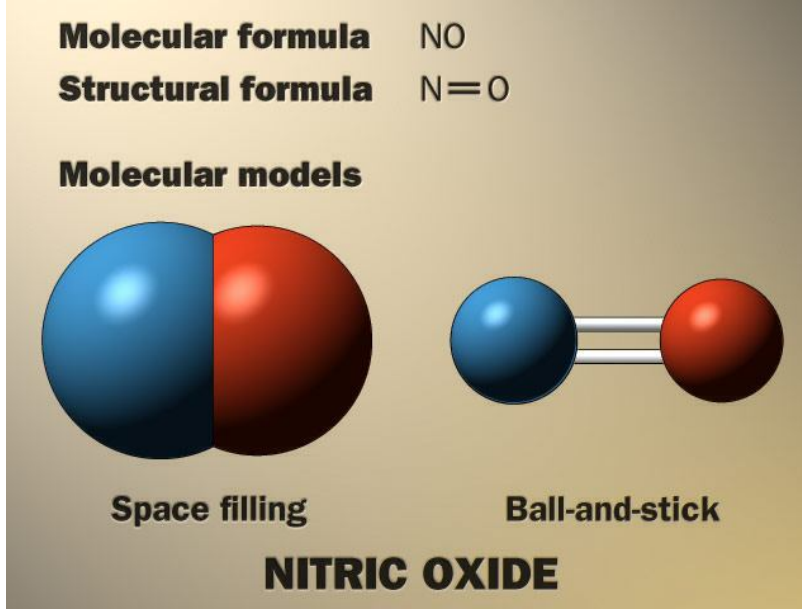
LPS ve proinflamatuvar sitokinler, mortaliteyi arttırmada sinerjizm gösterirler. Bundan dolayı sepsis süresince proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı, hastalık

prognozunun kötüye doğru gitmesinden sorumlu en önemli faktördür. Yapılan bir çalışmada LPS'in patolojik düzeyde sitokin salınımına yol açtığı gösterilmiştir. Erken evrede LPS uyarımı ile sepsisin "Santral" mediyatörleri olarak bilinen, TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 salınmaktadır. Bu moleküller, diğer sitokinlerin salınımını başlatarak sepsisin ilerlemesine neden oldukları gibi araşidonik asit metabolizmasının ve kompleman sisteminin aktivasyonuna, integrin ve NO üretiminde artışa da neden olurlar (20).

#### **2.4 Nitrik Oksit**

Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etmen kaçınılmaz bir şekilde oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır. Serbest radikaller son yörüngesinde bir veya daha fazla ortaklaşmamış elektron içeren, yüksek reaksiyon yeteneğine sahip atom veya moleküller olup, ortaklaşmamış elektron genel olarak üst kısmına yazılan bir nokta ile gösterilmektedir. Organizmanın oksijen ihtiyacının artmasıyla mitokondriyal elektron transport zincirindeki ortaklaşmamış elektron çiftlerinin artışına bağlı olarak reaktif oksijen türleri meydana gelmektedir. Bunlar süperoksit radikali, hidroksil radikali, alkoksil radikali, alkil peroksi radikali, hidro peroksi radikali, hidrojen peroksit radikali ve NO radikali gibi reaktif moleküllerdir. Bu maddeler hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçlar ve diğer kimyasalların etkisiyle oluşabilmektedir (45).

NO, membrandan kolayca geçebilme özelliğine sahip, yarılanma ömrü çok kısa olan, solüsyonlarda hızla okside olarak nitrit ve nitrata dönüşen serbest radikal bir moleküldür (16).



Şekil 15. Nitrik oksitin yapısı (56).

#### 2.4.1 Tanımı ve Tarihçesi

NO, 1980'de Robert Furchgott'un damar endotelial muskarinik reseptörlerin asetilkolin ile aktive edildiğinde EDRF salıverdiğini göstermesinin ardından 1987 yılında Salvador Moncada ve Louis Ignarro'nun EDRF'nin NO olabileceğine dair kanıtları ortaya koyması, sigara dumanında, egsoz gazlarında bulunduğu, atmosferi kirlettiği, ozon tabakasını deldiği ve asit yağmurlarına neden olduğu bilinen ufak, hafif ve basit bir molekül olan NO'nun kaderini bir anda değiştirmiştir. Günümüzde ise, endotel hücrelerinde oluşan, damar düz kaslarına etki ederek vazodilatasyona ve besleyici kan akımına sebep olan sinyal molekülleri olarak tanımlanmaktadır (27, 45).

Makrofajlar, nötrofiller ve mast hücreleri başta olmak üzere hepatik hücreler, renal mezangial hücreler, pankreatik adacık hücreleri, beyin astrositleri, granüllü hücreler, plateletler ve mikroglialar, NO üretirler (63, 93).

## 2.4.2 Yapısı ve Genel Özellikleri

NO, nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından “L-arjinin-NO Metabolik Yolu” ile L-arjinin aminoasitinden sentezlenir. NO, bir azot ve bir oksijen atomu ihtiva eden küçük bir molekül olup, herhangi bir taşıyıcıya gerek duymadan membranlardan kolayca diffüzlenebilir. Lipofil olan NO, oksijen yokluğunda suda da çözünebilir. Bu özellikleri sebebiyle ideal bir mediyatör olan NO, diğer mediyatörlerden farklı olarak etkilediği moleküle kovalent olarak bağlanır ve diffüze olduktan sonra depolanmaz .

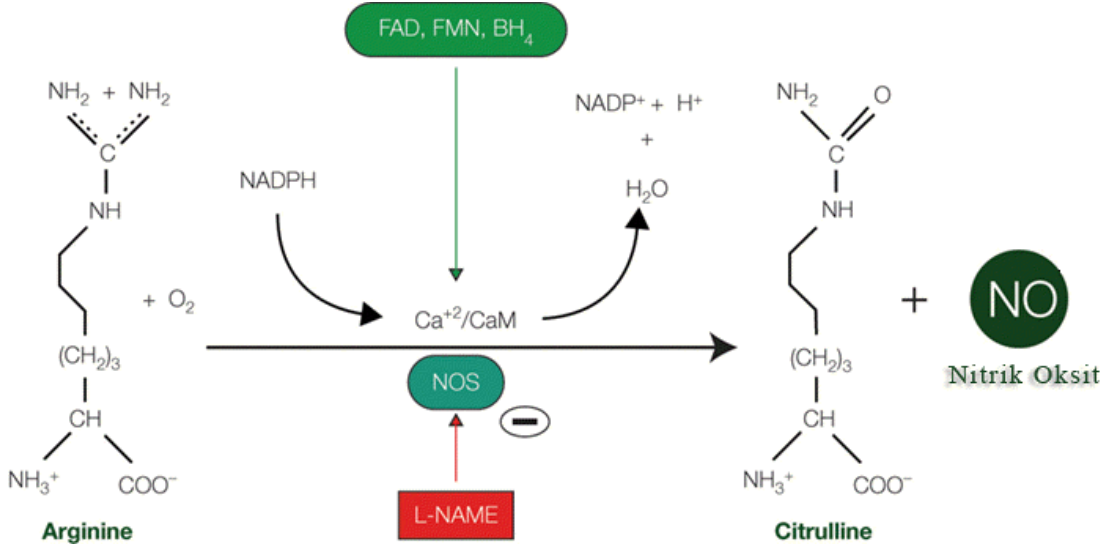
NO, havada oksijen ile reaksiyona girerek kahve renkli bir gaz olan NO<sub>2</sub>'i (nitrit) oluşturur. Düşük konsantrasyonlarda, oksijen varlığında bile oldukça stabil olan NO'nin, hemoglobine karşı affinitesi oksijenden 3000 kat daha fazladır. Bu nedenle NO, Hb'e oksijenden daha önce bağlanabildiğinden tedavi amacıyla inhalasyonla verilmesine olanak sağlar (45).

### 2.4.2.1 Enzimleri

Aynı anda farklı hücre türlerinde sentezlenen otokrin veya parakrin mediyatör fonksiyonu gören NO, NOS enzimi ile sentezlenmektedir. Bilinen üç NOS geninde (kromozom 7, 12, 17 üzerinde) sekiz DNA sekansı olduğu saptanmıştır; nöral NOS (nNOS), endotelyal NOS (eNOS) ve indüklenbilir NOS (iNOS). nNOS ve eNOS'a birlikte konstitütif NOS (cNOS) denirken, iNOS uyarılarla indüklenibilme özelliğine sahiptir. Endotoksin ve proinflamatuvar sitokinlerin (bazı interlökinler, TNF ve interferon) iNOS'u indükleyerek NO'yi arttırdığı gösterilmiştir. iNOS vasküler endotelyal hücreler, düz kas hücreleri ve makrofaj hücrelerini içeren çeşitli hücrelerce eksprese ve aktive edilmektedir.

NOS stereospesifik olarak yarı esansiyel aminoasit olan L-arjinini substrat olarak kullanmakta ve sonuçta NO ve L-sitrülin oluşmaktadır. cNOS ve iNOS arasında bazı önemli farklılıklar vardır. İlk olarak cNOS aktivitesi hücre içinde kalsiyum akışına bağlıyken iNOS aktivitesi için istirahat halinde hücre içindeki kalsiyum miktarı yeterlidir. cNOS aktivitesi kalsiyum akışı ile tetiklendiği için aktivitesi geçicidir ve

az miktarda NO üretilir. Zıt olarak iNOS aktivitesi uzun sürer ve nanomolar düzeyinde NO oluşur.



Şekil 16. Nitrik oksit sentezi (98).

NO oluşuktan sonra: 1) Methemoglobin, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) dönüşerek inaktive olur; 2) süperoksit anyonları ( $\text{O}_2^-$ ) ile birleşerek peroksinitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri ( $\text{OH}^\cdot$ ) ve tirozinle (Tyr) birleşerek nitrotirozini oluştururlar.  $\text{OH}^\cdot$  ve  $\text{ONOO}^-$  astım patogenezinde rol alan moleküllerdir; 3) guanil siklaz aktivasyonu ile cGMP'yi artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır. Nitrik oksit oldukça güçlü bir vazodilatördür. Sepsiste olduğu gibi, aşırı NO varlığı sistemik hipotansiyona neden olabilirken, tersi durumda NO sentezi azaldığında pulmoner hipertansiyon saptanmaktadır. Pulmoner hipertansiyonlu hastalarda solunumla atılan NO (eNO) oranları anlamlı derecede düşüktür. Nitrik oksit ayrıca antitrombotik etkiye de sahiptir. Nitrik oksit inhalasyonunun, dolaşımdaki trombositlerin in vivo aktivasyonlarını azalttığı gösterilmiştir (9).

#### **2.4.2.2 Konstitütif nitrik oksit sentetaz (cNOS):**

Özellikle damar endoteli, idrar yolu dokuları, periferik ve santral sinir sistemi gibi dokularda lokalize olan NOS, bu dokularda her zaman mevcuttur, ancak aktif değildir. Hücre içi iyonize  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun arttığı durumlarda  $Ca^{+2}$  kalmodulinle birleşerek NOS enzimini aktive eder ve L-arjininden NO sentezi gerçekleşir. Ancak sentez süresinin çok kısa olması, sentezlenen NO miktarının çok düşük olmasına neden olmaktadır. Çünkü hücre içi iyonize kalsiyum konsantrasyonu azalmaya başladığı an enzim inaktif forma geçerek NO sentezi durmaktadır. Enzim, kalsiyum kalmodulinle aktive olması nedeni ile kalsiyuma bağımlı-NOS veya konstitütif-NOS olarak adlandırılmıştır (56).

#### **2.4.2.3 İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS):**

Bu tip NOS, konstitütif tipin aksine hücre içinde bulunmaz. Özellikle makrofaj ve damar endotel hücrelerinde sentez edilmektedir. Bu hücrelerin spesifik sitokinlerle aktivasyonu, NOS'ın indüksiyonu ve NO'nun sentezine yol açmaktadır. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- $\gamma$  veya yüksek konsantrasyonlarda lipopolisakkaritle uyarılan makrofajlar çok miktarda NO üreterek yabancı hücrelerde sitotoksik etki meydana getirirler.

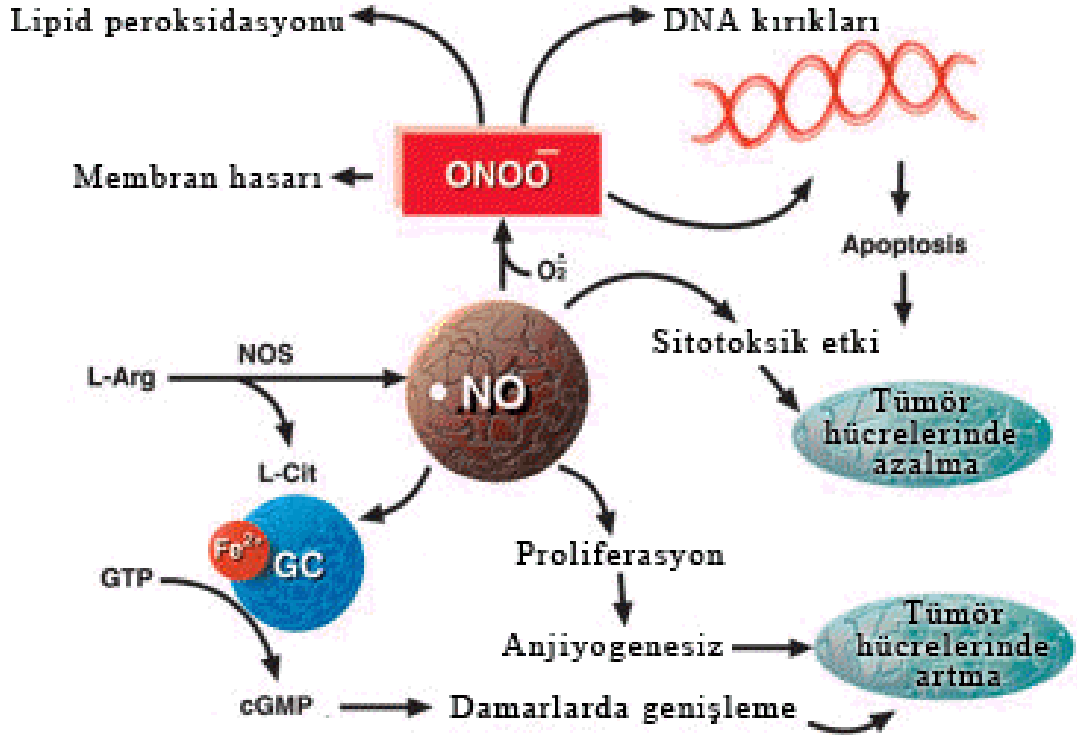
İndüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Ancak uzun süreli aşırı miktarda NO sentezi makrofaj ve diğer dokularda da harabiyete yol açar. Enzim indüksiyonu L-arjinin analogları ve glukokortikoidlerce inhibe edilebilmektedir. Bu indüksiyon, nonspesifik hücre immunitesi ile ilişkili bir mekanizmayla meydana gelmektedir. Enzim, bilinen bu özelliklerinden dolayı indüklenebilir veya kalsiyumdan bağımsız NOS olarak isimlendirilmiştir (87).



### 2.4.3 NO'in Patolojik Etkileri

Proinflamatuvar veya antiinflamatuvar etkileriyle akut ve kronik inflamasyonda önemli bir role sahip olan nitrik oksit oldukça reaktif bir moleküldür ve peroksinitrit oluşumu yoluyla oksidan etki gösterir. Bu oksidan özelliği nedeniyle bakterisit ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterir ve savunma sisteminin bir parçası olarak görev yapar. NO'in birçok zararlı etkisi süperoksit anyonu ile reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrite bağlı olarak ortaya çıkar. İnflamatuvar süreçte NO ve süperoksit radikallerinin oluşumu epitel hasarına, mediyator salınımına ve hava yolu duyarlılığının artmasına neden olmaktadır. İnflamatuvar sitokinler, özellikle IFN- $\gamma$ , hava yolu epitelinde NOS-II sentezini indüklemektedir. Kortikosteroid ve lökotrien antagonistleri gibi antiinflamatuvar ilaçların uygulanması eNOS seviyelerini ve NOS-II sentezini azaltmakta, buna karşın viral üst solunum yolu enfeksiyonu artmaktadır (66).

İnhale edilen NO'in özellikle akciğer alveollerinde kapillar damarları genişlettiği ve ventilasyon/perfüzyon oranını düzelttiği tespit edilmiştir. Solunumla alınan NO, sadece akciğerlerde lokal etki göstermekte, sistemik dolaşımında herhangi bir etki meydana getirmemektedir. Normal şartlarda insanların solunum havası ile 5-20 ppb düzeyinde NO'ı vücut dışına attığı tespit edilmiştir (87).



Şekil 17. Nitrik oksitin etkileri (21).

NO molekülü pikomolar düzeylerde cNOS ile fizyolojik ve koruyucu etki gösterir. NO, fizyolojik şartlarda mukus salgısını ve epitelial hücrelerde sıvı sekresyonunu arttırarak mikroplara, toksinlere ve safra tuzları gibi iritan maddelere karşı koruyucu etki gösterir. Endotel kaynaklı NO farklı organlarda kan basıncı, kan akımı ve vasküler tonusun fizyolojik olarak düzenlenmesinde rol oynar. NO salınımı reseptör bağımlı (asetilkolin, bradikinin, histamin, adenin nükleotidler ve serotonin) ve bağımsız (serbest yağ asitleri) olmak üzere farklı agonistler tarafından uyarılabilir. Endotel hücreleri mekanoreseptörler gibi davranır ve kan dolaşımındaki endotele yapılan fiziksel baskı kuvvetini biyokimyasal sinyallere dönüştürür (21).

NO nanomolar düzeylerde iNOS üzerinden proinflamatuvar ve hasar oluşturuvcu etkiler gösterir. Oksidatif stres altında NO'nun apoptozisi, sitotoksiteyi, mutagenезisi ve DNA hasarını arttırıcı etkisi vardır. Ayrıca demir sülfür içeren enzimlerin fonksiyonunu değiştirir, mitokondrial solunumu bozucu zararlı etkiler gösterir (54). NO'nun süperoksitle reaksiyonu peroksinitrit üzerinden hidroksil ve nitrojen dioksit

radikallerini oluşturur. Oluşan peroksinitrit hücrede nüklear bir enzim olan poli(ADP-riboz) sentazı (PARS) aktive eder. PARS enzimi nikotinamid adenin dinükleotidi substrat olarak kullanır. Sonuçta bu olay ATP tüketimine ve hücrenin ölümüne yol açabilir (83).

NOS, insan ve hayvanların beyin dokusunun her tarafında değişen oranlarda bulunmaktadır. NO'nin hafıza oluşumunda kısmen de olsa rol aldığını ortaya koyulmuştur. Hafıza oluşumu ile ilgili çalışmalar, öğrenme fonksiyonunun bozulduğu durumlarda NOS'm inhibe olduğunu ve NO düzeyinin azaldığını ortaya koymuştur. Ayrıca NO, koku alma, ağrı duyusu ve görme işlevinde de fizyolojik olarak rol almaktadır (87).

**Tablo 4.** Nitrik oksit biyolojisindeki değişikliklerin rol aldığı kardiyovasküler bozukluklar (87).

Nitrik oksit biyolojisindeki değişikliklerin rol aldığı kardiyovasküler bozukluklar	Septik şok
	Miyokard kontraktilitesinde bozukluk durumları
	İskemi ve reperfüzyon hasarı
	Ateroskleroz
	Diabetik anjiopati
	Esansiyel hipertansiyon
	Pulmoner hipertansiyon
	Konjesif kalp yetmezliği
	Gebelikte preeklampsi

#### 2.4.4 LPS NO İlişkisi

Yangısal reaksiyonların uyarılmasına neden olan maddelerin başında gelen hücre membranında kaldığı sürece biyolojik olarak inaktiftir. Ancak hızlı hücre bölünmesi ve hücre yıkımı sırasında salıverilir. LPS, lipopolisakkarit bağlayan protein (LBP) ile birleştikten sonra monosit ve makrofajlara CD-4 reseptörü aracılığı ile bağlanır. Bu bağlanma sonucunda sitoplazmik sinyal sistemi işlemeye başlar ve dakikalar içinde NO'nin transkripsiyonu gerçekleşir.

Makrofajlar, nötrofiller ve mast hücreleri en fazla oranda NO üreticileridir. İndüklenebilir NOS tarafından üretilen NO, konağın spesifik olmayan savunma mekanizması olup, antimikrobiyal etkiye sahiptir. Aktivitesinin sepsis, astım, romatoid artrit, tüberküloz, doku reddi, multiple skleroz gibi pek çok hastalıkta arttığı gösterilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda LPS'nin iNOS enzimini stimüle ederek NO sentezini arttırdıkları gösterilmiştir (39, 70).

NO radikalinin proinflamatuvar sitokin (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , endotoksin/LPS) uyarısı sonrası nötrofillerden salınarak sitotoksik, tümorisidal ve bakterisidal etki gösterdiği bilinmektedir. NO, hem vazodilatasyon yaparak, hem de vasküler geçirgenliği arttırarak inflamasyona katkıda bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada fazla miktarda üretilen NO'nin, TNF $\alpha$  ve endotoksine bağlı hipotansiyondan ve vazokonstriktörlere karşı gelişen dirençten sorumlu olduğu görülmüştür.

Kanda yüksek konsantrasyonlarda bulunan LPS, aşırı vazodilatasyona neden olmaktadır. Çünkü mevcut LPS, NOS'ı indükleyerek fazla NO sentezine yol açar. NO'nin oksidasyon ürünleri olan nitrat ve nitritin serum düzeylerindeki artışın, direkt LPS konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (87).

### 3 MATERYAL ve METOT

#### 3.1 Materyal

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Merkez laboratuvarında, Kafkas Üniversitesi deney hayvanları kullanma ve etik kurulundan bilimsel ve ahlaki konulara uygunluğuna dair izin alındıktan sonra gerçekleştirildi.

Çalışmada, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Çiftliğinde yetiştirilen ortalama 3 - 3,5 kg ağırlığında ve 20 - 24 aylık 15 adet Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanıldı. Araştırma sonuçlarının güvenilir ve sağlıklı olması için deneklerin herhangi bir çalışmada kullanılmamış, herhangi bir ilaca maruz kalmamış ve herhangi bir hastalıklarının bulunmamış olmasına özellikle dikkat edildi.

Deney hayvanları, 12 saat gece – 12 saat gündüz döngüsü sağlanarak 22–25 °C’de barındırılırken, yem ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Hayvanlar tartılarak ağırlıkları homojen olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Tavşanlara uygulanan Lipopolisakkarit kaynağı olarak E.Coli Type 0111:B4 kullanıldı.

#### 3.2 Metot

##### 3.2.1 Kan Örneklerinin Alınması

**Kontrol Grubu:** Denemeye başlamadan önce rastgele seçilen 8 hayvandan antikoagulantsız godelere kan örnekleri alınarak plazmaları elde edildi. Elde edilen bu plazmalar 0.dakika (kontrol grubu) olarak değerlendirildi. İlk kan örneği alındıktan sonra 15 tavşan 8 ve 7 hayvan içermek üzere iki gruba ayrıldı.

**Grup I (n=7):** 150 µg /kg LPS 0,5ml serum fizyolojikte çözülmüş halde damar içi yolla verildi.

**Grup II (n=8):** 300 µg /kg LPS 0,5ml serum fizyolojikte çözülmüş halde damar içi yolla verildi.

LPS verildikten sonra hayvanların kulak venalarından 1., 2. ve 3. saatlerde olmak üzere 3 defa kan örnekleri antikoagulantsız tüplere toplandı ve bu örnekler 3000 rpm de 15 dk. santrifüj edilerek plazmaları elde edildi. Bu plazmalar analizler yapılncaya kadar derin dondurucuda saklandı. TNF- $\alpha$  düzeyi, ELISA (rabbit-TNF- $\alpha$ , R&D System) yöntemi ile NO düzeyi ise Miranda ve ark.(65)'nın bildirdikleri yöntemle tayin edildi.

### **3.2.2 Analizler için kullanılan cihazlar**

Mikroplak okuyucu (Molecular Devices)

Spektrofotometre (UV-1201, Shimadzu)

Santrifüj (Heraeus christ)

Etüv (Nüve)

Su banyosu (SB100, Nüve)

Otomatik pipet (Eppendorf)

Hassas terazi (Scaltec)

Vorteks (Labinco)

Derin dondurucu (So-low Environmental Equip.Co.)

Distile su cihazı (Heidolpph, type-mono, Dest -3000)

Manyetik karıştırıcı (Labinco-532)

pH metre (Consort C 732)

### 3.2.3 Analizler İçin Kullanılan Kimyasallar

**Capture Antibody:** 360 µg/ml anti-rabbit TNF-α 1ml PBS içerisinde çözüldü.

**Detection Antibody:** 18 µg/ml biyotinlenmiş anti-rabbit TNF-α 1 ml reagent diluent içerisinde çözüldü.

**Standart:** 100 ng/ml rekombinant rabbit TNF-α 0.5 ml reagent diluent içerisinde çözüldü.

**Streptavidin-HRP:** 1ml streptavidin bağlanmış horseradish-peroxidaz kullanıldı.

**PBS:** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4 olarak ayarlanarak filtre edildi.

**Wash Buffer:** 0.05% Tween\*20 PBS'de çözüldü, pH 7,2 – 7,4 olarak ayarlandı.

**Reagent Diluent:** 1% BSA PBS'de çözümlenerek, pH 7,2 – 7,4 olarak ayarlanarak filtre edildi.

**Substrate Solution:** Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) 1:1 oranında karıştırıldı.

**Stop Solution:** 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi hazırlandı.

**Çinko Sülfat (% 10):** 10 g çinko sülfat distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Sodyum Hidroksit (0,3 M):** 1,2 g sodyum hidroksit distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Vanadyum (III) Klorür (% 0,8):** 800 mg vanadyum (III) klorür 1 M HCl'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**1 M HCl:** 8,29 ml HCl (d: 1,19; %37; MA: 36,46) içinde bir miktar distile su bulunan balon jofede çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Sülfanilamid (% 2):** 2 g sülfanilamid % 5'lik HCl'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**NEDD (% 0,1):** 100 mg N-(1-Naftil)etilendiamine dihidroklorür distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Griess Ayıracı:** 50 ml % 0,1 NEDD ve 50 ml % 2 sülfanilamid eşit miktarda karıştırıldı.

**Stok Nitrit Çözeltisi (1 mM):** 6,9 mg  $\text{NaNO}_2$  distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Stok Nitrat Çözeltisi (1 mM):** 8,5 mg  $\text{NaNO}_3$  distile suda çözülerek hacim 100ml'ye tamamlandı.

### **3.2.4 Plazma TNF- $\alpha$ Düzeyi Tayini**

TNF- $\alpha$  düzeyi, ELISA yöntemi ile ticari kit (R&D Systems) kullanılarak saptandı.

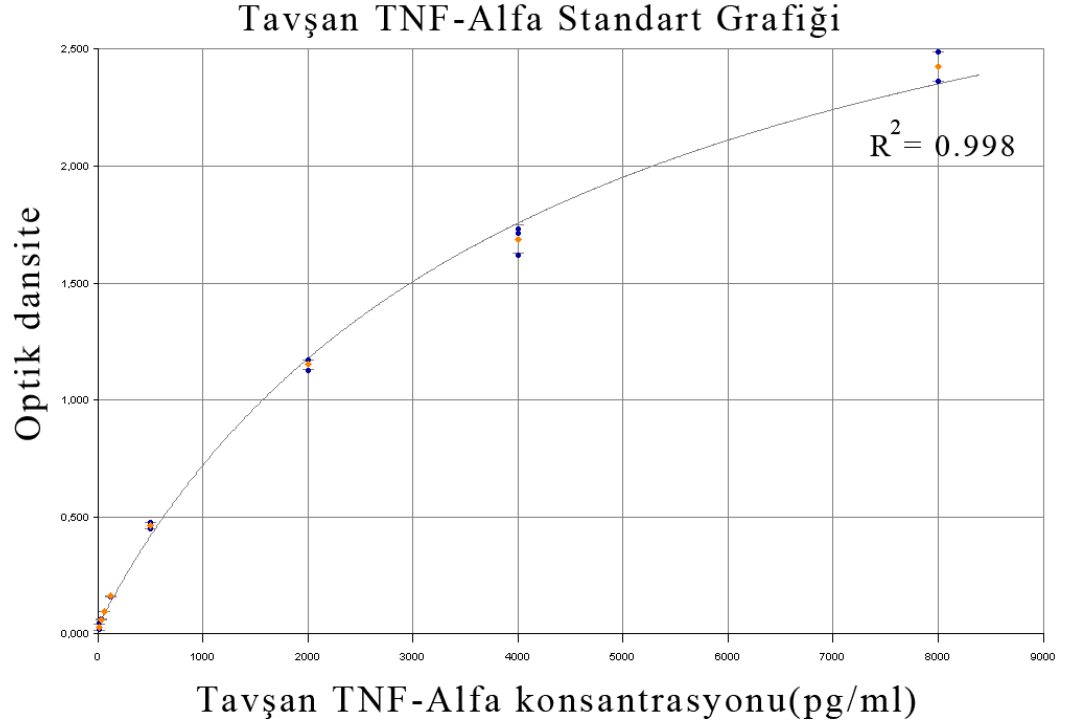
#### **3.2.4.1 Mikroplakların kaplanması**

360  $\mu\text{g/ml}$  anti-rabbit TNF- $\alpha$  1 ml PBS'de çözüldükten sonra 2  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde kuyucuklara pipetlendi. Üstleri kapatılarak oda sıcaklığında bir gece karanlıkta inkübe edildi. Ardından plaklar Wash Buffer ile 2 kez yıkandı. Reagent Diluent'ten 300 $\mu\text{l}$  tüm kuyucuklara koyularak plaklar bloklandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Son olarak yıkama işlemi tekrar yapıldı ve plaklar hazır hale getirildi.

#### **3.2.4.2 Standartların hazırlanması**

100 ng/ml tavşan TNF- $\alpha$ , tamponda çözülerek bu çözülden 8000 – 4000 – 2000 – 500 – 125 - 62,5 - 31,25 - 15,625 pg/ml'lik çalışma standartları hazırlandı. Analiz işlemleri gerçekleştirildikten sonra 540 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.





**Grafik 1.** TNF- $\alpha$  Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi

### 3.2.4.3 Deneyin yapılışı

Her kuyucuğa 100  $\mu$ l numune ve standartlar eklendi ve 2 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi plakların hazırlanması sırasında yapıldığı şekilde tekrarlandı ve 2 saat inkübe edildi. Daha sonra 100  $\mu$ l Detection Antibody ve Reagent Diluent eklendi. Ardından 2 saat daha inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrar yapıldı ve 100  $\mu$ l Streptavidin-HRP tüm kuyucuklara eklendi. 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Her kuyucuğa 100  $\mu$ l substrat solüsyonu eklendi ve 20 dakika inkübe edildi. Tüm kuyucuklara 50  $\mu$ l stop solüsyonu eklenerek nazikçe karıştırdıktan sonra TNF- $\alpha$  miktarına göre şiddeti değişen renkli bir ürün şekillendi.

Mikroplak okuyucuda 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbans değeri okundu. Hem örneklerin hem de TNF- $\alpha$  standartlarının absorbans değerleri saptandı. Ordinat ekseninde her bir standart konsantrasyonu için ortalama absorbans değeri, apsis ekseninde ise bu absorbansa karşılık gelen TNF- $\alpha$  konsantrasyonunu gösteren bir konsantrasyon eğrisi hazırlandı.

### 3.2.5 Plazma NO Düzeyi Tayini

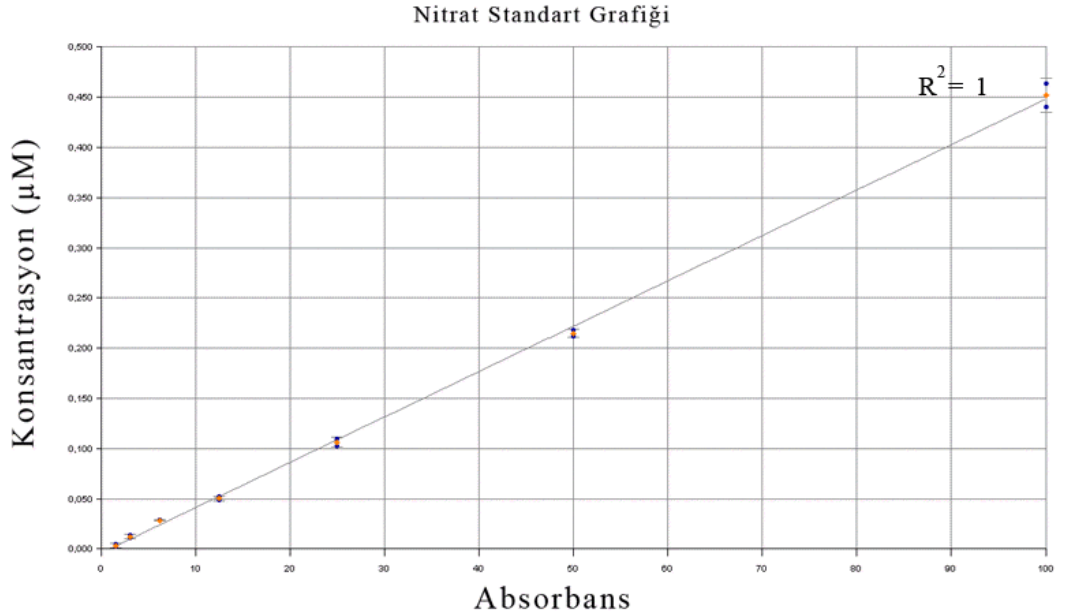
Nitrik oksit düzeyleri, Miranda ve ark.'nın (65) bildirdikleri yöntemle tayin edildi.

#### 3.2.5.1 Deneyin Prensibi

Bu yöntemde nitrat, Vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürüldü. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluştu. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm' de ölçüldü. Nitrat ve nitrit düzeyleri ayrı ayrı belirlendikten sonra ikisinin toplamı NO miktarını gösterir.

##### 3.2.5.1.1 Nitrat Analizinin Yapılışı

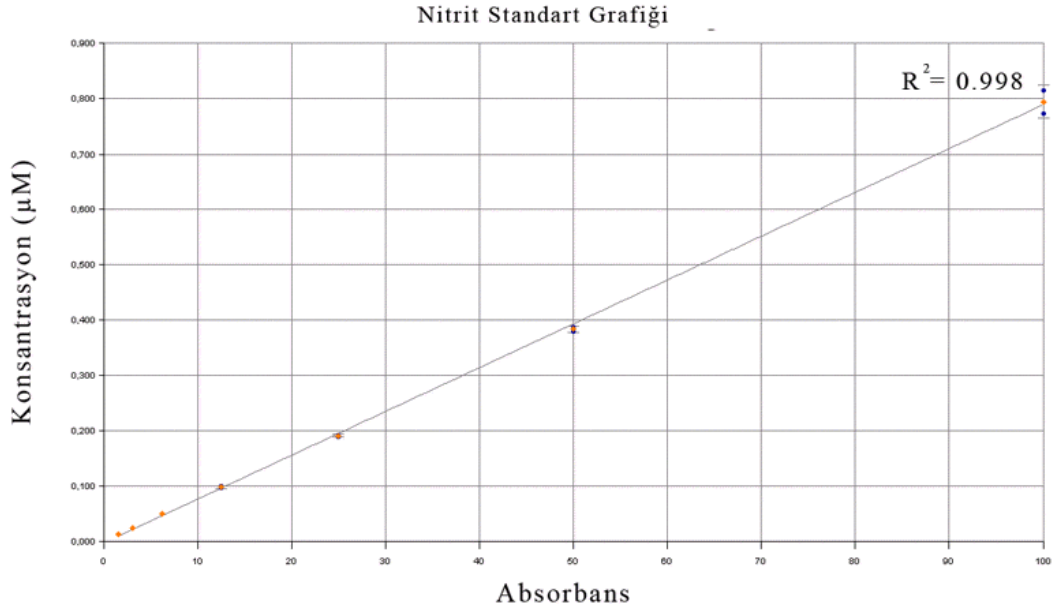
Mikroplak kuyucuklarına 100 µl numune pipetlendi. Tüm kuyucuklara 100 µl  $VaCl_3$  konuldu. Hemen arkasından da 100 µl griess ayıracı pipetlendi. 30 dakika  $37^{\circ}C$ ' de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu. Nitrat standart grafiğinden yararlanarak sonuçlar hesaplandı.



**Grafik 2.** Nitrat Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Standart Grafiği

### 3.2.5.1.2 Nitrit Analizinin Yapılışı

Mikroplak kuyucuklarına 100 µl numune pipetlendi. Hemen arkasından da 100 µl griess ayıracı pipetlendi. 30 dakika 37 °C'de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu. Nitrit standart grafiğinden yararlanarak sonuçlar hesaplandı.



**Grafik 3.** Nitrit Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Standart Grafiği

### 3.2.6 İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS Windows 10.0 paket programı ile yapıldı. Gruplar arası (150µg/kg uygulanan Grup I ile 300µg/kg uygulanan Grup II) önemliliğın belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA), alt grupların (0.,1.,2. ve 3. saatler) karşılaştırılmasında ise Duncan testi uygulandı. Tüm veriler ortalama± standart hata ( $\bar{x} \pm S_x$ ) olarak gösterildi.  $p < 0.05$  olasılık değeri istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

## 4 BULGULAR

### 4.1 Plazma TNF- $\alpha$ Düzeyleri

Grup I'deki tavşanlara damar içi yolla 150 $\mu$ g/kg LPS kaynağı verildikten 1 saat sonra plazma TNF- $\alpha$  değerleri önemli derecede artış ( $p<0.001$ ) gösterdi. 2.saatte de yine yüksek düzeyde seyrettikten sonra 3.saatte tekrar kontrol grubunun düzeyine indi.

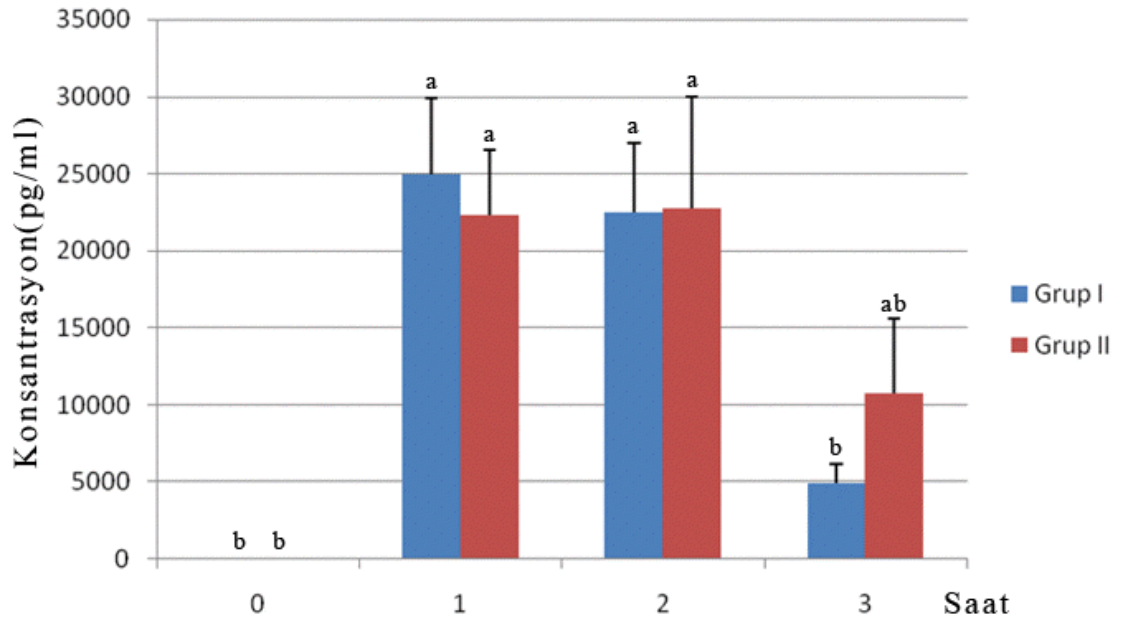
Grup II'deki tavşanlara damar içi yolla 300 $\mu$ g/kg LPS kaynağı verildikten 1 saat sonra plazma TNF- $\alpha$  değerleri anlamlı derecede yüksek ( $p<0.001$ ) bulundu. 2.saatte de yine yüksek düzeyde seyretti. 3.saatte ise Grup I'deki kadar bir azalma görülmedi. 1.,2.,3. saatlerde kontrol grubuna göre artış ( $p<0.001$ ) tespit edildi.

0,1,2,3. saatlerin gruplar arası karşılaştırmaları (Grup I ve Grup II) yapıldığında ise istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilemedi.

**Tablo 5.** LPS kaynağı verilen tavşanlarda plazma TNF- $\alpha$  değerleri

Gruplar	Kontrol	1.saat	2.saat	3.saat	P değerleri
Grup I (n=7)	5.4 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	24919 $\pm$ 4939 <sup>a</sup>	22525 $\pm$ 4437 <sup>a</sup>	4898 $\pm$ 1307 <sup>b</sup>	<0.001
Grup II (n=8)	5.4 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	22275 $\pm$ 4276 <sup>a</sup>	22734 $\pm$ 7228 <sup>a</sup>	10741 $\pm$ 4859 <sup>ab</sup>	<0.001

(a,b:  $p<0.001$  değeri olup, gruplar arasındaki farklılığı gösterir.)



**Grafik 4.** Damar içi yolla LPS kaynağı verilen tavşanlarda plazma TNF- $\alpha$  değerleri

#### 4.2 Plazma NO Düzeyleri

Grup I'deki tavşanlara damar içi yolla 150 $\mu$ g/kg LPS kaynağı verildikten 1 saat sonra plazma NO değerlerinde önemli derecede artış ( $p < 0.05$ ) gösterdi. 2. ve 3. saatlerde de yine yüksek düzeylerde seyretti.

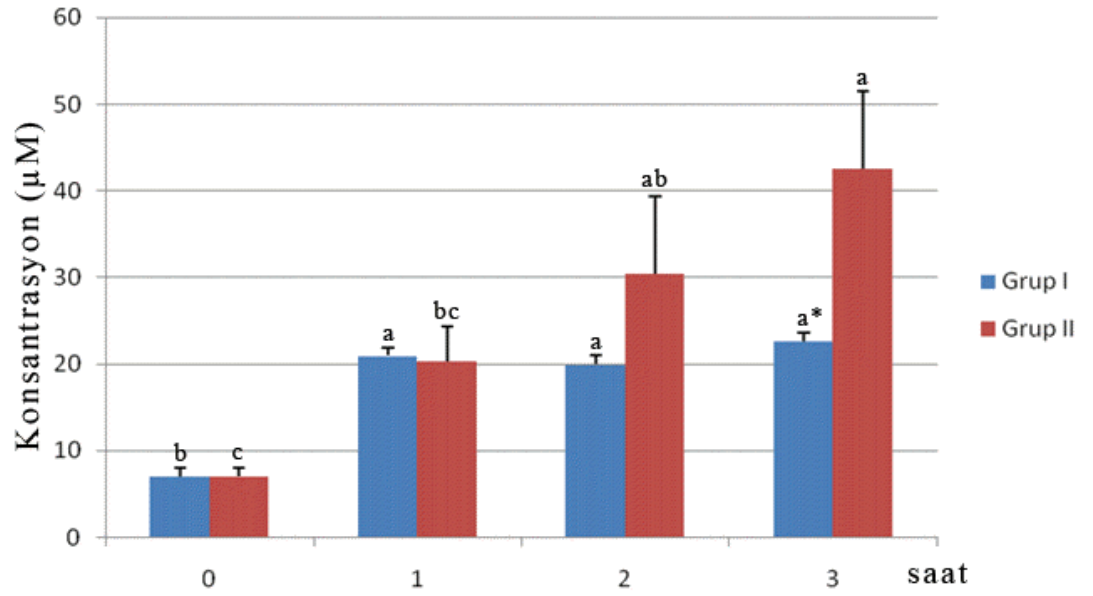
Grup II'deki tavşanlara damar içi yolla 300 $\mu$ g/kg LPS kaynağı verildikten 1 saat sonra plazma NO değerleri önemli derecede artış ( $p < 0.01$ ) gösterdi. 2. ve 3. saatlerde de bu artış devam etti.

Gruplar arası karşılaştırmalar (Grup I ve Grup II) yapıldığında 0., 1. ve 2. saatlerde gruplar arasında istatistiksel olarak fark görülmezken, 3. saatte gruplar arasında  $p < 0.05$  düzeyinde fark tespit edildi.

**Tablo 6.** LPS kaynağı verilen tavşanlarda plazma NO değerleri

Gruplar	Kontrol	1.saat	2.saat	3.saat	P değerleri
<b>Grup I (n=7)</b>	7.01±0.07 <sup>b</sup>	20.96±3.25 <sup>a</sup>	19.96±4.63 <sup>a</sup>	22.61±4.23 <sup>a*</sup>	<0.05
<b>Grup II (n=8)</b>	7.01±0.07 <sup>c</sup>	20.37±4.01 <sup>bc</sup>	30.39±8.97 <sup>ab</sup>	42.48±8.97 <sup>a</sup>	<0.01

(Grup I için a,b: p<0.05 değeri, Grup II için p<0.01 değeri olup aynı satırda yer alan değerler arasındaki farklılığı gösterir. \* : p<0.05 olup, aynı sütundaki farklılığı gösterir.)

**Grafik 5.** Damar içi yolla LPS kaynağı verilen tavşanlarda plazma NO değerleri

## 5 TARTIŞMA ve SONUÇ

Lipopolisakkarit, gram negatif sepsis sırasında immun sistemde meydana gelen cevapla ilgili olarak TNF- $\alpha$  gibi birçok molekülün salınımına sebep olur. TNF- $\alpha$ , endotoksik şok, kaşeksi gibi gram negatif bakteriyel enfeksiyonlardaki endotoksinin sebep olduğu biyolojik aktivitelerin en önemli mediyatörüdür. Hem hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak direkt, hem de IL-1, IL-6 gibi diğer sitokinlerin uyarılmasıyla dolaylı yoldan etkilerini gösterirler. LPS ile endotoksik şok oluşturulan tavşanlarda bir mediyatör olarak TNF- $\alpha$ 'nın rolü incelenmiştir (61). Diğer deney hayvanlarında (10, 13, 43, 53, 55, 61, 64, 105) TNF- $\alpha$ 'nın rolü incelenmiş ve LPS'nin TNF- $\alpha$  ile diğer sitokinler üzerine etkileri farklı doz ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır.

Gupta ve ark. (31, 32) yaptıkları çalışmalarda intravitreal yolla LPS verilmek suretiyle uveitis oluşturulan tavşanların göz sıvısı numunesinde ölçülen TNF- $\alpha$  düzeylerinin artış gösterdiği bildirilmiştir. Her iki çalışmada da bir çok bitki ekstraktı ile yapılan tedavilerde LPS ile arttırılan TNF- $\alpha$  düzeylerinin düşürüldüğü ileri sürülmüştür.

Yapılan bir çalışmada farelere LPS enjeksiyonu ile birlikte Genotropin (insan büyüme hormonu) verilerek TNF- $\alpha$  düzeylerinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Başlangıçta belirlenemeyecek kadar düşük olan TNF- $\alpha$  düzeyi, LPS enjeksiyonundan sonra belirgin şekilde artış göstermiştir. LPS ve Genotropin birlikte verildiğinde ise artışın, sadece LPS enjekte edilen farelerdeki TNF- $\alpha$  düzeyindeki artışa göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (53).

Başka bir çalışmada ise farelere periton içi LPS verilerek oluşturulan endotoksik şok sırasında TNF- $\alpha$  düzeyindeki artış gösterilirken, LPS ile birlikte flavonoidlerden biri olan naringinin farklı dozlarda verilmesiyle TNF- $\alpha$  üretiminin baskılandığı ve buna bağlı olarak TNF- $\alpha$  düzeyinin düştüğü gösterilmiştir (43).

Tavşanlara damar içi LPS verilmesi, doza bağlı olarak (0.5–10 µg/kg) hem vücut ısısı artışı hem de plazma TNF-α seviyelerindeki artışla birlikte seyreden glutamat ve hidroksil radikallerinin hipotalamik seviyelerindeki artışlara sebep olur (88).

Susam yağı veya normal ticari tavşan yemi ile beslenen tavşanlara göre, kolesterolden zengin diyet ile beslenen tavşanlara aynı zamanda LPS'nin damar içi verilmesinin TNF-α seviyelerini daha fazla ve daha hızlı şekilde arttırdığı tespit edilmiş, deneysel olarak hiperkolesterolemi oluşturulan tavşanlarda TNF-α düzeyleriyle gram negatif şok ve ölüm arasında direk bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Bu bulgulardan yola çıkarak beslenme tarzının immun sistemi etkilediğini ileri sürmüşlerdir. 3-20 mikrogram damar içi LPS verilmesi TNF-α seviyesinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır. Aynı çalışmada 50µg ve 100µg LPS verildiğinde TNF seviyelerinde herhangi bir fark tespit edilememiş ve bu bulgunun sebebi açıklanamamıştır (10). Yapılan bu çalışmada da tavşanlara damar içi yolla 150µg/ kg ve 300 µg/ kg dozunda LPS verilmesinin TNF salınımı yönünden bir farka sebep olmadığı bulundu.

Fare makrofaj hücre kültüründe yapılan bir çalışmada LPS verildikten 4 saat sonra TNF seviyelerinin belirlenebilir düzeye çıktığı, 6 saat sonra ise pik yaptığı bildirilmiştir (55).

Farelerle yapılan bir çalışmada periton içi LPS enjeksiyonundan sonra 0,5., 1., 2. ve 4. saatlerde alınan plazma örneklerinde TNF-α seviyesinde artış olduğu ve bu artışın 1. saatte pik yaptığı gösterilmiştir (13).

Güvercin ve farelerle yapılan bir çalışmada 20mg/kg LPS enjeksiyonundan sonra hem güvercin hem de fare serumlarında TNF-α seviyelerinde hızlı bir artış olduğu, 1.saatte pik yaptığı, 6.saatte ise tekrar bazal seviyeye indiği gösterilmiştir (105).

Wista albino türü erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada, intraperitoneal olarak tek doz (500 µg/kg ) LPS verilerek sepsis oluşturulan sıçanlarda TNF-α düzeyinde anlamlı bir artış olduğu belirtilmiştir (102).



Yapılan başka bir çalışmada damar içi yolla tavşanlara 10µg/kg Salmonella Minnesota Re595 kaynaklı LPS verilmesinin ardından 45-100. dakikalarda TNF-α düzeyinin maksimum değere ulaştığı bildirilmiştir (61).

Farelerle yapılan bir çalışmada damar içi olarak verilen 100µg LPS ile oluşturulan endotoksik şok ve gram negatif enfeksiyonda TNF-α'nın 2 saat içinde ölçülebilir düzeye geldiği ve IFN-γ ile sinerjik bir etki gösterdiği belirtilmiştir (36). Benzer bir çalışmada da tavşanlara LPS enjeksiyonundan 2 saat sonra ölçülen TNF-α ve IL-1 düzeylerinde de sinerjik bir etki olduğu gösterilmiştir (64). Brito ve ark. (10) ise damar içi yolla tavşanlara 100 µg LPS verdikten sonra serum TNF düzeyinin 1 ve 2. saatlerde pik yaptığını belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da damar içi yolla tavşanlara 150 µg/kg LPS verdikten sonra plazma TNF düzeyinin 1. ve 2. saatlerde pik yaptığı, 3. saatte ise tekrar düşüşe geçtiği tespit edildi. 300 µg/kg LPS verilen grupta ise 3. saatte belirgin bir düşüş görüldü.

Bir çok çalışmada hastalığın patofizyolojisinde rol oynayan NO, iNOS, eNOS ve nNOS olmak üzere üç izoformu bulunan NOS tarafından üretilen önemli bir sinyal molekülüdür. Birçok çalışmada LPS ile oluşturulan septik şok gelişiminde NO'nun aşırı üretiminin önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (11, 39, 67, 70, 80, 82, 90).

Deney hayvanları (11, 39, 46, 52, 67, 70, 80, 82, 90) ve hücre kültürü (1, 35, 57, 37, 69) kullanılarak yapılan birçok çalışmalarda LPS'nin NO üretimi ile ilgisi araştırılmıştır.

Normal şartlarda NO nötrofil göçünü ve sitokin üretimini inhibe ederek faydalı bir rol oynamasına rağmen, akut ciğer hasarı gibi hastalıklarda aşırı üretilmesi direkt peroksinitrit oluşumu ve doku hasarına sebep olarak zararlı etkiler göstermektedir. LPS'nin iNOS sentezine sebep olduğu ve böylece aşırı NO üretimini sağladığı bildirilmiştir (67).

Yapılan bir çalışmada Rhododendron cinnabarium bitkisinin başlıca aktif bileşeni olan quercetin hücre kültürü üzerindeki LPS uyarımlı NO ve TNF-α üretimi üzerindeki baskılayıcı etkisi araştırılmıştır. Çalışmada hücre kültüründe LPS ile birlikte NO ve TNF-α'nın aşırı üretimi gösterilmiş ve NO ile TNF-α üretiminin quercetine bağlı olarak azaltıldığı belirtilmiştir (57).

Ratlar ile yapılan bir çalışmada 5 haftalık, 9 haftalık ve yaşlı ratlarda olmak üzere 3 grupta kemik iliği üzerinde yaşa bağlı olarak LPS (10µg ve 20µg) uyarımıyla, iNOS ekspresyonu ve devamında NO üretimindeki değişim araştırılmıştır. NO düzeyi tüm gruplarla birlikte artmasının yanında yaşlı olan ratlardaki artışın 5 ve 9 haftalık ratlara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (70).

Yapılan bir çalışmada yaşa bağlı olarak hücre kültüründe LPS uyarımlı NO seviyelerindeki değişim araştırılmıştır. 1 aylık, 3 aylık, 1 yaşında ve 3 yaşındaki tavşan hücre kültürlerinin tamamında NO düzeyleri artmıştır. 1 ve 3 aylık tavşanlarda NO düzeyindeki artışın 1 ve 3 yaşındaki tavşanlara göre daha çok olduğu gösterilmiştir (39).

LPS verilmesini takiben deneysel kolitis oluşturulan hayvanlarda iNOS aktivitesi ve lipid peroksidasyonu yükselmektedir. LPS verildikten sonra meydana gelen mukozal hasarda NO ile beraber süperoksit anyonu gibi diğer sitotoksik reaktif oksijen metabolitleride meydana gelmektedir. NO ve süperoksit anyonlarının fazla miktarda artması durumunda peroksinitrit anyonu oluşur. Lipid peroksidasyonunu başlattığı bilinen peroksinitrit ise membran hasarına sebep olur (37).

Mikroglia kültüründe yapılan bir çalışmada 1mg/ml LPS ile uyarılan iNOS ile birlikte artan NO seviyesinin zamanla lineer olarak artarken 12. ve 24.saatlerde pik yaptığı, beyinde sentezlenen agmatin metabolitinin ise bu seviyeyi düşüremediği gösterilmiştir (1).

Ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada periton içi 3mg/kg LPS verilmesiyle zamana bağlı olarak (0,5., 1., 2., 4. ve 6.saat) NO seviyesinde ve lipid peroksidasyonunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Tedavi amaçlı verilen aminoguanidinin ise bu etkiyi azalttığı gösterilmiştir (11).

İnsan aort düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada doza bağlı olarak (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) verilen LPS uyarımlı NO seviyelerinde meydana gelen değişim incelenmiştir. Çalışmada doz artışı ile birlikte NO düzeylerinde de artış olduğu gösterilmiştir (35).

Ratların beyin dokusu üzerinde yapılan bir çalışmada 100 µg/kg LPS damar içi yolla LPS verilmesinden hemen sonra NO seviyesinde anlamlı bir artış ve bu artışı takiben ACTH salınımında da benzer bir yükselme olduğu gösterilmiştir (90).

Ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ratlara LPS ve terebentin verilerek meydana gelen NO seviyesindeki değişim araştırılmıştır. Periton içi 50µg/kg LPS verilen ratlarda zamana bağlı olarak (0., 3., 6., 12. ve 24.saatler) NO seviyelerindeki artışa bakıldığında NO seviyesinin 3.saatte en yüksek değere ulaştığı 6., 12. ve 24.saatlerde de yaklaşık olarak bu değerlerde seyrettiği gösterilmiştir. Terebentinin (20-30µl/rat) ise bu seviyelerde bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir (80).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada periton içi LPS enjeksiyonundan sonra zamana ( 0., 1., 2., 4., ve 6.saatlerde) ve doza bağlı olarak (5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg ve 30mg/kg) NO seviyelerindeki değişim araştırılmıştır. Zaman bağlı olarak NO seviyesi incelendiğinde LPS enjeksiyonundan sonra 4. saatte, doza bağlı olarak incelendiğinde ise 10mg/kg verildiğinde en yüksek değere ulaştığı gösterilmiştir (52).

Tavşan düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada LPS uyarımıyla NO seviyelerinin zamana (3., 6., 24., 48.saatlerde) ve doza bağlı olarak (5ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) değişimi gösterilmiştir. Hücre kültüründe 24.saatte NO seviyesi pik yaparken, doza bağlı NO seviyesi ise 10ng/ml dozu ile en yüksek değere ulaşmıştır. İlginç bir şekilde 100ng/ml dozu ile NO seviyesi daha düşük bulunmuştur (69). Tam tersine yapılan bu çalışmada ise doz arttırıldığında plazman NO seviyesinde de bir artış saptandı.

Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ratlarda LPS ile zamana ve doza bağlı olarak (1µg/kg, 3µg/kg, 10µg/kg, 30µg/kg, 100µg/kg, 1mg/kg) uyarılan NO üretimi araştırılmıştır. NO'in başlangıçta ölçülemeyecek düzeyde olduğu yaklaşık 60 dakika sonrasında ölçülebilecek düzeye geldiği, artışın lineer olarak devam edip 3. saatte pik yaparak düşmeye başladığı gösterilmiştir (82).

Keaney ve ark. (46) ise tavşanlara damar içi yolla tek doz olarak 150µg/kg LPS enjeksiyonundan sonra plazma NO düzeyinde lineer olarak artış olduğunu, bu

artışın 6.saate kadar devam ettiğini göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmada da LPS enjeksiyonundan sonra 1.saatte başlayan ve 3. Saatte de devam eden bir artış tespit edildi.

LPS verildikten sonra genellikle oluşan endotoksik şok tablosunun TNF- $\alpha$  üretiminden ziyade aşırı NO üretimiyle ilgili olduğu, dolayısıyla şok tedavilerinde kullanılan doğal ürünlerin NO üretimini azaltarak şoku önleyebileceği ileri sürülmektedir (37, 57).

Kanda yüksek konsantrasyonda bulunan LPS vazodilatayona neden olarak NOS üretimini arttırmakta ve aşırı NO sentezi gerçekleşmektedir (63).

LPS'nin bu toksik etkisi birçok inflamatuvar mediyatörlerin salınımına sebep olan makrofaj aktivasyonu ile çok yakından ilgilidir. Bu mediyatörler arasında TNF- $\alpha$ 'nın LPS toksisitesine karşı koruma sağladığı için çok önemli bir rol oynadığı görülmüştür (5).

Tavşanlara damar içi yolla LPS verildiğinde 1. ve 2.saatlerde hem TNF- $\alpha$  hem de NO düzeylerinde bir artış görüldü. Fakat 3.saatte plazma TNF- $\alpha$  düzeyi bazal seviyeye düşerken, NO salınımı hala devam etmektedir. Dolayısıyla LPS verilen tavşanlarda TNF- $\alpha$ 'nın salınımının daha kısa, NO salınımının ise daha uzun süreli olduğu, NO'in doku hasarı ve peroksinitrit oluşumuna sebep olarak hastalıkların patogeneğinde, sepsis sırasında ve endotoksik şok gelişiminde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

## 6 ÖZET

Lipopolisakkarit, gram-negatif bakterilerinin dış membranının yapısal bütünlüğüne katkıda bulunur. Gram negatif sepsis sırasında immun sistemde meydana gelen cevapla ilgili olarak TNF- $\alpha$  ve iNOS'a bağlı olarak NO üretimine sebep olur.

Materyal olarak ortalama 3-3,5 kg ağırlığında ve 20-24 aylık 15 adet Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanıldı. Başlangıçta hiçbir uygulama yapılmadan önce kulak venalarından kan numuneleri alındı ve 0.dakika (Kontrol grubu) olarak kabul edildi. Daha sonra tavşanlar 2 gruba ayrıldı. Grup I (n=7)'e 150 $\mu$ g/kg Grup II (n=8)'e 300 $\mu$ g/kg LPS intravenöz olmak üzere kulak venalarından enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra 1., 2. ve 3. saatlerde kanlar kulak venalarından heparinli godelere alınarak plazmaları ayrıldı. TNF- $\alpha$  düzeyi ELISA yöntemi ile NO düzeyi Griess reaksiyonu ile kolorimetrik olarak ölçüldü.

Grup I ve Grup II'deki tavşanlarda LPS enjeksiyonundan sonra TNF- $\alpha$  düzeylerinde artış (p<0.001) gözlemlendi. Plazma TNF- $\alpha$  değerleri zamana bağlı incelendiğinde (0,1,2,3. Saatler) istatistiksel olarak fark tespit edildi. (p<0.001).

LPS enjeksiyonundan sonra plazma NO düzeyinde hem Grup I'de (p<0.05) hem de Grup II'de (p<0.01) artış gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırmalar (Grup I ve Grup II) yapıldığında, 3.saatte gruplar arasında fark tespit edildi (p< 0.05).

Tavşanlara damar içi yolla LPS verildiğinde 1. ve 2.saatlerde hem TNF- $\alpha$  hem de NO düzeylerinde bir artış görüldü. Fakat 3.saatte plazma TNF- $\alpha$  düzeyi bazal seviyeye düşerken, NO salınımı hala devam etmektedir. Dolayısıyla LPS verilen tavşanlarda TNF- $\alpha$ 'nın salınımının daha kısa, NO salınımının ise daha uzun süreli olduğu, doku hasarı ve peroksinitrit oluşumuna sebep olarak hastalıkların patogeneğinde, sepsis sırasında ve endotoksik şok gelişiminde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

## 7 ABSTRACT

Lipopolysaccharide contributes the structural integrity of gram-negative bacteria to the external membrane. It causes production of NO subject to TNF- $\alpha$  and iNOS with regard to the reaction in the immune system during gram negative sepsis.

The material used was 15 New Zealand breed rabbits of average weight 3-3,5 kg and age 20-24 months. Blood samples were taken from their ear veins at the beginning prior to starting any process and was recorded as the 0<sup>th</sup> minute (Control Group). Then the rabbits were divided into 2 groups. Group I (n=7) was injected with 150 $\mu$ g/kg and Group II (n=8) was injected with 300 $\mu$ g/kg LPS intravenously from their ear veins. Following injection, bloods were taken from ear veins to heparin containing godets during 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> hours and their plasmas were separated. TNF- $\alpha$  level was measured with the ELISA method and the NO level was measured in colorimetric manner with Griess reaction.

Following injection of LPS, an increase was observed in the TNF- $\alpha$  levels of rabbits in Group I and Group II (p<0.001). When Plasma TNF- $\alpha$  values were analyzed in different times, (0<sup>th</sup>, 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> hours) statistical differences were observed.

Following LPS injection, increases were observed in the NO level both in Group I (p<0.05) and Group II (p<0.01). When comparisons were made between the groups, (Group I and Group II) differences were determined between the groups during the 3<sup>rd</sup> hour (p< 0.05).

When the rabbits were treated with LPS intravenously an increase was observed both in TNF- $\alpha$  and NO levels during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> hours. However while the plasma TNF- $\alpha$  level fell to the basal level in the 3<sup>rd</sup> hour, NO release still continued. Hence, it has been concluded that duration of TNF- $\alpha$  release had been shorter in rabbits and that NO release had been effective for a longer term, hence it has been concluded that NO could play a more effective role during sepsis and development of endotoxic shock.

## 8 KAYNAKLAR

1. Abe, K., Abe, Y., Saito, H.: Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Research.*, 872: 141–148, 2000.
2. Aggarwal, BB., Moffat, B., Harkins, RN.: Human lymphotoxin: Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem.*, 259(1):686-691, 1984.
3. Alluwaimi AM.: The cytokines of bovine mammary gland: Prospects for diagnosis and therapy. *Res Vet Sci.*, 77:211-222, 2004.
4. Barath, P., Fishbein, MC., Cao, J., Berenson, J., Helfant, RH., Forrester, JS.: Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by *in situ* hybridization. *Am J Pathol.*, 137:3, 1990.
5. Berry, MA., Hargadon, B., Shelley, M.: Evidence of a role of tumor necrosis factor-alpha in refractory asthma. *N Engl J Med.*, 354:697-708, 2006.
6. Beutler, B., Mahoneyby, J., Trang, L., Pekala, P., Cerami, A.: Purification of cachectin, a lipoprotein lipase suppressing hormone secreted by endotoxin induced raw 264.7 cells. *J Exp MED.*, Vol:161, 1985.
7. Beutler, B., Cerami, A.: Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature.*, 320 (17):584-588, 1986.
8. Botran, RF.: Soluble cytokine receptors; their role in immunoregulation. *The FASEB J*, 5:2567-2574, 1991.
9. Brett, SJ., Quinlan, GJ., Mitchell, J.: Production of nitric oxide during surgery involving cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med.*, 26:272-278, 1998.
10. Brito, BE., Romano, EL., Grunfel, C.: Increased lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor levels and death in hypercholesterolaemic rabbits. *Clin Exp Immunol.*, 101:357-361, 1995.

11. Brown, JF., Chafee, KA., Tepperman, BL.: Role of mast cells, neutrophils and nitric oxide in endotoxin-induced damage to the neonatal rat colon. *British Journal of Pharmacology.*, 123: 31-38, 1998.
12. Camussi, G., Albano, E., Tetta, C., Bussolino, F.: The molecular action of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur. J. Biochem.*, 202:3-14, 1991.
13. Car, BD., Eng, VM., Schnyder, B.: Interferon 3, receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.*, 179:1437-1444, 1994.
14. Carswell, EA., Old, LJ., Kassel, RL., Green, S., Fiore, N., Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: (9) 3666-3670, 1975.
15. Cavaillon, JM., Marie, C., Caroff, M., LeDur, A.: Molecular aspect of endotoxins relevant to their biological functions. *Nephrol Dial Transplant.*, 14:853-860, 1998.
16. Chartrain, NA, Geller, DA, Koty, PP.: Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.*, 269: 6765-72, 1994.
17. Coleman, JW.: Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.*, 1(8):1397-1406, 2001.
18. Çelebioğlu, B., Özer, E.: Kardiyopulmoner by-pass ve sistemik inflamatuvar yanıt. *Hacettepe Tıp Derg.*, 35:18-26, 2004.
19. Demirer, S., Marakoğlu, İ., Poyraz, Ö.: Sigara içen ve içmeyen bireylerde başlangıç periodontal tedavinin dişeti oluğu sıvısı TNF- $\alpha$  düzeyleri üzerine etkisi. *SÜ Diş Hek Fak Der.*, 16:7-14, 2007.
20. Dixon, DR., Darveau RP.: Lipopolysaccharide heterogeneity: Innate host responses to bacterial modification of Lipid A structure. *J Dent Res.* 4(7):584-595, 2005.
21. Diker, KS.: İmmünoloji, 1.Baskı, Medisan Yayın Seri No:37, ISBN 975-7774-34-0, Ankara, 1998.



22. Dunlop, R.J., Campbell, C.W.: Cytokines and advanced cancer. *J Pain Symptom Manag*, 20(3): 214-232, 2000.
23. Emral, R.: Adiponektin ve diğer sitokinler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 26:409-420, 2006.
24. Ergönül, S., Aşkar, TK.: Anaplasmosisli sığırlarda Isı şok protein (HSP), Malondialdehit (MDA), Nitrik Oksit (NO) ve İnterlökin (IL-6, IL-10) düzeylerinin araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 15(4): 575-579, 2009.
25. Flores, EA., Bistran, BR., Pomposelli, JJ.: Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. *J. Clin. Invest.*, 83:1614-1622, 1989.
26. Francone, OL., Fielding, CJ., Shiganage, JK., Moser, AH., Grunfeld, C., Feingold, KR.: Endotoxin and TNF lead to reduced plasma LCAT activity and decreased hepatic LCAT mRNA levels in Syrian hamsters. *J Lipid Res.*, 36:1254-1263, 1995.
27. Furchgott, R., Zawadzki, J.: The obligatory role of endothelium cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.*, 288:373-376, 1980.
28. Giroir, BP., Johnson, JH., Brown, T., Allen, GL., Beutler, B.: The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J. Clin. Invest.*, 90:693-698, 1992.
29. Glauser, MP., Zanetti, G., Baumgartner, JD., Cohen, J.: Septic shock: Pathogenesis. *Lancet.*, 338:732-736, 1991.
30. Guc, MO., Iskit, AB., Sungur, A.: The effect of bosentan, aminoguanidine and L-canavanine on mesenteric blood flow, spleen and liver in endotoxaemic mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 379:73-80, 1999.
31. Gupta, SK., Agarwal, R., Srivastava, S., Agarwal, P.: The anti-inflammatory effects of curcuma longa and berberis aristata in endotoxin-induced uveitis in rabbits. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*, 49( 9):4036-4040, 2008.

32. Gupta,SK., Agarwal,R., Srivastava,S., Agarwal, P.: Prevention of endotoxin-induced uveitis in rabbits by Triphala, an Ayurvedic formulation. *Int J Cur Biomed Phar Res.*, 1(2):20-23, 2011.
33. Gündüz, A., Er, H.: Sitokinler ve oftalmolojideki yerleri. *T Klin Oftalmoloji.*, 9:53-58, 2000.
34. Güner, İ., Özmen, D., Bayındır, O.: Sitokinler. *T Klin J Med Sci.*, 1, 1997.
35. Heo, SK., Yun, HJ., Noh, EK., Park, WH.: LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production. *Immunology Letters.*, 120: 57–64, 2008.
36. Heremans, H., Damme, JV., Dillen, C.: Regulation by interferons of the local inflammatory response to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.*,138:4175, 1987.
37. Hikosaka,K., Koyama, Y., Motobu, M., Yamada, M.: Reduced lipopolysaccharide (LPS) induced nitric oxide production in peritoneal macrophages and inhibited LPS induced lethal shock in mice by a sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(12): 2853-2858, 2006.
38. Hopkins, SJ.: The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*, 5:45–57, 2003.
39. Im, G., Shin, SR.: Changes in the production and the effect of nitric oxide with aging in articular cartilage. *Acta Orthop Scand.*, 73(1): 6–10, 2002.
40. Iskit, AB.: Sepsiste Deneysel Modeller. *Yoğun Bakım Dergisi.* 2:133-136, 2005.
41. Iskit, AB., Guc, MO.: The timing of endothelin and nitric oxide inhibition effects survival in a mice model septic shock. *Eur. J. Pharmacol.* 414:281-287, 2001.

42. Kanitz, E., Tuchscherer, M.: Neuroendocrine and immune responses to cute endotoxemia in suckling and weaned piglets. *Biol Neonate.*, 81:203-209, 2002.
43. Kanno, S., Shouji, A., Tomizawa, A.: Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Sciences.*, 78:673 – 681, 2006.
44. Karakuş, N.: İleri evre kanser hastalarında düşük molekül ağırlıklı heparinlerin anjiyogenetik faktörler üzerindeki etkileri. Uzmanlık tezi, Isparta, 2006.
45. Kaur, C., Kapoor, HC.: Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 36:703-725, 2001.
46. Keaney, JF., Puyana, JC., Francis, S., Loscalzo, JF.: Methylene blue reverses endotoxin-induced hypotension. *Circ Res.*, 74: 1121-1125, 1994.
47. Kerimova, M.: Viral enfeksiyon ajanları ile sık hastalanan çocukların sitokin durumunun değerlendirilmesi. *Selçuk Tıp Derg.*, 25(2):78-81, 2009.
48. Kern, PA., Saghizadeh, M., Ong, JM., Bosch, RJ., Deem, R., Simsolo, RB.: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue *J. Clin. Invest.*, 95: 2111-2119, 1995.
49. Kızıldağ, A.: Çocukluk çağı akut lösemilerde serum fas ve fas ligand düzeyleri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, 2008.
50. Kolb, H., Bachofen, V.: Nitric oxide: A pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Tod.*, 13(5):157, 1992.
51. Konukoğlu, D., Turhan, SM.: Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med.*, 36:42-48, 2005.
52. Liang, YC., Liu, HJ., Chen, SH., Chen, CC.: Effect of lipopolysaccharide on diarrhea and gastrointestinal transit in mice: Roles of nitric oxide and prostaglandin E2. *World J Gastroenterol.*, 11(3):357-361, 2005.

53. Liao, W., Rudling, M., Angelin, B.: Contrasting effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on the biological activities of endotoxin in the rat. *Endocrinology*, 138(1): 289-295, 1997.
54. Liebold, A., Keyl, C., Birnbaum, DE.: The heart produces but the lungs consume proinflammatory cytokines following cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*, 15:340-345, 1999.
55. Liu, FQ., Vincent, YL., Lui, CH., Jonathan, R.: Hypoxia modulates lipopolysaccharide induced TNF- $\alpha$  expression in murine macrophages. *Experimental Cell Research*, 314(6):1327-1336, 2008.
56. Lowenstein, CJ., Dinerman, JL., Snyder, SH.: Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120:227-37, 1994.
57. Manjeet, R., Ghosh, B.: Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in murine macrophages. *International Journal of Immunopharmacology*, 21: 435-443, 1999.
58. Marhaug, G., Hackett, B.: Serum amyloid A gene expression in rabbit, mink and mouse. *Clin Exp Immunol*. 107:425-434, 1997.
59. Marsden, PA., Heng, HHQ., Scherer, SW.: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 268(17):478-488, 1993.
60. Martinez, EF., Alvarez, VP., Tsutsumi, V., Shibayama, M., Muriel, P.: Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol*, 58:49-58, 2006.
61. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of Gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest*, 81:1925-37, 1988.
62. Matthys, P., Billiau, P., Billiau, A.: Cytokines and cachexia. *Nutrition*, 13:9, 1997.

63. Merrill, JE., Ignarro, LJ., Sherman, MP.: Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol.* 151(4):2132, 1993.
64. Movat, HZ., Burrowes, CE., Cybulsky, MI., Dinarello, CA.: Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *Am. J. Pathol.*, 129:463, 1987.
65. Miranda, KM., Espey, MG., Wink, DA.: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.*, 5, 62-71, 2001.
66. Moncada, S., Palmer, RM., Higgs, EA.: Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43:109-143, 1991.
67. Mu, E., Ding, R., An, X., Li, X.: Heparin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting nitric oxide synthase and TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *Thrombosis Research.*, 2011.
68. Nawroth, P., Handley, D., Matsueda, G., De Waal, SR., Gerlach, H.: Tumor necrosis factor/cachectin-induced intravascular fibrin formation in meth a fibrosarcomas. *J. Exp. Med.*, 168:637-647, 1988.
69. Oliveira, LCB., Oliveira, CJR., Fries, DM., Stern, A., Monteiro, HP.: Effects of lipopolysaccharide on low- and high-density cultured rabbit vascular smooth muscle cells: Differential modulation of nitric oxide release, ERK1/ERK2 MAP kinase activity, protein tyrosine phosphatase activity, and DNA synthesis. *Braz J Med Biol Res.*, 35(2):181-190, 2002.
70. Ota, K., Kakuta, S., Yagami, K., Ito, D.: Age-related increases in LPS-stimulated nitric oxide production from cultured rat bone marrow cells. *Maturitas* 45: 247-255, 2003.
71. Özoran, K.: Romatoid artrit (RA) ve sitokinler: İnterlökin-1 (İL-1), İnterlökin-6 (İL-6), Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve İnterferon Gama (IFN- $\gamma$ ). *Ankara Üniv Tıp Fak Mecm.*, 47:495-504, 1994.

72. Pidgeon, GP, Harmey JH, Kay E.: The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease. *Br J. Cancer.*, 81(8): 1311–1317, 1999.
73. Portoles, MT, Catala, M.: Hepatic response to the oxidative stress induced by *E. coli* endotoxin: Glutathione as an index of the acute phase during the endotoxic shock. *Mol Cell Biochem.*, 159:115-121, 1996.
74. Reşitoğlu, E.: Tip-2 diyabetes mellitusta serum VEGF düzeyleri ile kan basıncı, albuminüri, sitokinler ve serum kreatinin arasındaki ilişki., Çukurova Üniversitesi, Uzmanlık tezi, 2007.
75. Ruggiero, V., D'Urso CM., Albertoni, C., Campo, S.: LPS-induced serum TNF production and lethality in mice: Effect of L-carnitine and some acyl-derivatives. *Mediators of Inflammation.*, 2:43-50, 1993.
76. Sağnak, N.: Preoperatif oral karbonhidrat solüsyonu kullanımının stres yanıtı etkisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008.
77. Sano, H., Chiba, H., Iwaki, D., Voelker, DR.: Surfactant proteins A and D bind CD14 by different mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 275:22442–22451, 2000.
78. Shimoizato, T., Iwata, M., Tamura, N.: Suppression of tumor necrosis factor alpha production by a human immunoglobulin preparation for intravenous use, *Infect Immun.*, 58(5):1384-1390, 1990.
79. Singh, VK., Yadav, VS.: Role of cytokines and growth factors in radioprotection. *Exp Mol Pathol*, 78:156-169, 2005.
80. Soszynski, D., Krajewska, M.: Time-course of changes in plasma nitric oxide following lipopolysaccharide and turpentine injection in rats. *Journal of Thermal Biology.*, 27: 387–391, 2002.
81. Stewart, I., Schluter, PJ., Shaw, GR.: Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health. *Environ Health Global Access Sci Source.*, 5(7): 1-23, 2006.

- 82.** Stitt, JT., Dubois, AB., Douglas, JS.: Exhalation of gaseous nitric oxide by rats in response to endotoxin and its absorption by the lungs. *J Appl Physio.*, 82:305-316, 1997.
- 83.** Szabo, C.: Role of poly (ADP-ribose) synthase in inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, 350: 1-19, 1998.
- 84.** Şahin, N.: Endotoksemide ADMA, L-arginin, NO seviyeleri ve arginaz aktivitesi ilişkilerinin karaciğer ve böbrekte incelenerek karşılaştırılması. Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Ankara, 2009.
- 85.** Tang, X., Metzger, D., Leeman, S., Amar, S.: LPS-induced TNF- $\alpha$  (LITAF) deficient mice express reduced LPS-induced cytokine: Evidence for LITAF-dependent LPS signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci.*, 103(37):13777–13782, 2006.
- 86.** Tortora, P., Fusi, P., Rescigno, M.: Toll-like receptors as mediators of tumor cell death. *Universita' Degli Studi Di Milano-Bicocca. Thesis.* 2008.
- 87.** Türköz, Y., Özerol, E.: Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center.*, 4(4), 1997.
- 88.** Tsai, CC., Lin, MT., Wang, JJ., Liao, JF.: The antipyretic effects of baicalin in lipopolysaccharide-evoked fever in rabbits. *Neuropharmacology.*, 51:709-717, 2006.
- 89.** Ulaş, T.: Kronik böbrek yetersizlikli hastalarda TNF- $\alpha$ 'nın insülin direncine etkisi. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları, Uzmanlık Tezi, 2008.
- 90.** Uribe, RM., Lee, S., Rivier, C.: Endotoxin stimulates nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus through nitric oxide synthase I: Correlation with hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Endo.*, 140(12): 5971-5981, 1999.
- 91.** Ünal, E.: Serum ve periton sıvısındaki sitokin seviyelerinin endometriozis tanısındaki yeri. Uzmanlık tezi, Adana, 2008.

- 92.** Velez, LM., Costamagna, E., Kimura, ET.: Bacterial lipopolysaccharide stimulates the thyrotropin-dependent thyroglobulin gene expression at the transcriptional level by involving the transcription factors thyroid transcription factor-1. *Endocrinology.*, 147(7): 3260–3275, 2005.
- 93.** Ward, JK., Barnes PJ., Tadjkarimi S.: Evidence for the involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in human trachea. *J. Physiol.*, 483:525-536, 1995.
- 94.** Warne, JP.: Tumour necrosis factor  $\alpha$ : A key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol.*, 177: 351–355, 2003.
- 95.** Werner-Felmayer, G., Werner, ER, Fuchs, D., Hausen, A.: On multiple forms of NO synthase and their occurrence in human cells. *Res Immunol.*, 142:555, 1991.
- 96.** Wu, S., Boyer, CM., Whitaker, RS., Berchuck, A., Wiener, J., Weinberg, JB., Bast, RC.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Cancer Research.*, 53:1939-1944. 1993.
- 97.** [www.abcam.com/proteins/](http://www.abcam.com/proteins/)
- 98.** [www.frontiersin.org/neuroscience/10.3389/neuro.01](http://www.frontiersin.org/neuroscience/10.3389/neuro.01)
- 99.** <http://en.wikipedia.org/wiki/Lipopolysaccharide>
- 100.** Yalçın, AD., Gürsoy, B.: Sepsis immünopatogenezi. *Harran Üniv. Tıp Fak. Derg.*, 5(3):25-29, 2008.
- 101.** Yaman, H., Çaycı, T., Seyrek, M.: Effects of vitamin A and C and melatonin on 3-nitrotyrosine formation in guinea pig heart under lipopolysaccharide-induced stress, *Turk J Med Sci.*, 40 (1), 2010.
- 102.** Yücel MA.: Sıçanlarda oluşturulan deneysel intraabdominal kaynaklı sepsis modelinde met-rantes'in akciğerler üzerine etkisi. EÜ., Uzmanlık tezi, 2006.
- 103.** Zähringer, U., Lindner, B., Rietschel, E., Opal, SM.: Endotoxin in health and disease. *Marcel Dekker.*, 93–114, 1999.



- 104.** Zhao, Y., Joshi-Barve, S., Barve, S.: Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- $\alpha$  expression by preventing NF-kB activation. *J Am Coll Nutr.*, 23(1):71–78, 2004.
- 105.** Zuckerman, SH., Bendele, AM.: Regulation of serum tumor necrosis factor in glucocorticoid sensitive and resistant rodent endotoxin shock models. *Infection and Immunity.*, 57(10):3009-3013, 1989.

## 9 ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Samsun'da doğdu. İlk öğrenimini Sakarya İlkokulu'nda, orta okulu Gelemen Yatılı Ortaokulu'nda, liseyi Samsun 19 Mayıs Lisesi'nde tamamladı. Sakarya Üniversitesi Fen edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2002'de mezun oldu. 2009 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2003'ten bu yana çeşitli özel öğretim kurumlarında çalışmaya devam etmektedir.

## 10 TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca danışmanlığımı yapan ve çalışmalarım süresince benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımı sürekli yönlendiren Doç. Dr. Emine ATAKİŞİ ve çalışmanın her aşamasında bize rehberlik eden, çalışmanın meydana gelişinde çok büyük emeği olan Doç. Dr. Onur ATAKİŞİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans tez çalışmam esnasında deneysel çalışmaların yürütülmesinde katkılarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Ayşe KANICI'ya, Yard. Doç. Dr. Birkan TOPÇU'ya ve yüksek lisansımı tamamladığım Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Ayla ÖZCAN olmak üzere tüm hocalarıma teşekkür ederim. Son olarak bu çalışmaya destek sağlayan KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.