T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİD İLE OLUŞTURULAN İNFLAMATUVAR YANITA SİTİKOLİN VE KOLİNİN ARAŞİDONİK ASİT YOLAK ARACILI ETKİSİ

ELİF BARIŞ
0000-0001-6838-7932

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
Farmakoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR
MART 2022

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2017970147

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİD İLE OLUŞTURULAN İNFLAMATUVAR YANITA SİTİKOLİN VE KOLİNİN ARAŞİDONİK ASİT YOLAK ARACILI ETKİSİ

ELİF BARIŞ

0000-0001-6838-7932

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Farmakoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mualla Aylin ARICI
0000-0003-2221-9356

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2017.KB.SAG.010 sayı ile desteklenmiştir.

İZMİR

MART 2022

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Sıçanlarda Lipopolisakkarid ile Oluşturulan İnflamatuvar Yanıta Sitikolin ve Kolinin Araşidonik Asit Yolak Aracılı Etkisi" başlıklı Doktora tezim kapsamında elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Elif BARIŞ
11/03/2022

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ i
ŞEKİLLER DİZİNİ ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ iii
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
İNGİLİZCE ÖZET vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 Sepsis 3
2.1.1. Sepsis Epidemiyolojik özellikleri 3
2.1.2. Sepsis Patogenezi 4
2.1.3. Sepsis ve İnflamasyon 4
2.1.4. Sepsiste risk faktörleri 5
2.1.5. Sepsiste klinik bulgular 6
2.1.6. Sepsis Tanısı 7
2.1.7. Sepsiste Akut Faz Reaktanları 9
2.1.8. Sepsis Tedavisi 9
2.2 Kolinerjik Antiinflamatuvar Yolak (KAY) 10
2.2.1 Kolin ve Sitikolinin Genel Özellikleri 13
2.2.2 Kolin ve Sitikolin İnflamasyondaki Rolü 15
2.3 Siklooksijenaz (COX) enzimi ve Prostaglandinler 15
3. GEREÇ VE YÖNTEM 20
3.1 Araştırmanın Tipi 20
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı 20
3.3 Çalışma Materyali 20
3.5 Araştırmanın Değişkenleri 21
3.6 Veri Toplama Araçları 21
3.6.1 Kontrol grubu 26
3.6.2 Endotoksemi grubu (LPS) 27
3.6.3 Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu (LPS+Kolin) 27

3.6.4 Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu (LPS+Sitikolin) 27
3.6.5.3 Histomorfolojik analizler 32
3.7 Araştırma Planı ve Takvimi 42
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi 43
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları 43
4. BULGULAR 44
4.1 Endotoksemi gelişimi takip verileri 44
4.1.1 Sağkalım Analizi 44
4.1.2 Ağırlık Ortalamaları ve Ağırlık Değişimi Ortalamaları 44
4.1.3 Sepsis skorlaması 46
4.1.4 Vücut sıcaklığı takibi 48
4.1.5 Histomorfolojik Analiz 48
4.2 COX-2 mRNA düzeylerindeki değişim 50
4.3 COX-2 Protein Ekspresyonu 52
4.4 Prostaglandin Düzeyleri 54
4.4.1 Serum 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ Düzeyleri 54
4.4.2 Serum Prostaglandin E_2 Düzeyleri 55
4.4.3 Serum Tromboksan A_2 Düzeyleri 56
4.5.1. TNFα mRNA Düzeyleri 57
4.5.2. Serum TNFα düzeyleri 58
4.6 Serum ve Beyin Kolin Düzeyleri 59
5. TARTIŞMA 61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 68
7. KAYNAKLAR 71
8. EKLER 86
9. KATKI 88

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru……..….....9

Tablo 2. Siklooksijenaz izoformları ve ifadelendiği dokular…….....19

Tablo 3. Kullanılan cihazlar.....22

Tablo 4. Kullanılan sarf malzemeleri.....23

Tablo 5. Sepsis Skoru Tablosu.....31

Tablo 6. Serum ve Dokularda Gerçekleştirilen ELISA ve total kolin analizleri…….....35

Tablo 7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için ilgili genlerin forward ve reverse sekansları.....38

Tablo 8. Deney gruplarında protokol süresince sağkalım takibi sonuçlarının yüzdesel gösterimi ……...……...……..……..45

Tablo 9. Deney gruplarında protokol süresince ölçülen ağırlıklar ve değişimi…….....……...……....46

Tablo 10. Deney gruplarında protokol süresince belirlenen sepsis skorları…….....48

Tablo 11. Deney gruplarında protokol süresince vücut sıcaklık değişimi…….....49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Lipopolisakkaridyapısı…….…….....5
Şekil 2. Sepsis Bulguları…….. …….....7
Şekil 3. Kolinerjik Antiinflamatuvar Yolak (KAY).....13
Şekil 4. Kolinin kimyasal yapısı…….....15
Şekil 5. Sitikolinin kimyasal yapısı.....….15
Şekil 6. Kennedy Yolağı…….....15
Şekil 7. Araşidonik Asit Yolağı….....18
Şekil 8. Deney grupları ve Protokol Akış Şeması….....27
Şekil 9. Beyin Dokusunun Kostatom Yardımı ile Total Eksizyonu.....30
Şekil 10. Total eksizyonu gerçekleştirilen Beyin Dokusunun Görüntüsü 30
Şekil 11. Endotoksemi grubuna ait bir sıçan…….....32
Şekil 12. Araştırma takvimi…….....43
Şekil 13. Deney gruplarında ağırlık değişimi……..…….....46
Şekil 14. Deney gruplarında histomorfolojik skorlama…….....50
Şekil 15. Deney gruplarında histomorfolojik inceleme…….....51
Şekil 16. Deney gruplarında COX-2 mRNA ekspresyon düzeyleri.....52
Şekil 17. Deney gruplarında COX-2 protein ekspresyon düzeyleri.....53
Şekil 18. Deney gruplarında serum 6-keto $PGF_{1\alpha}$ düzeyleri.....55
Şekil 19. Deney gruplarında serum PGE_2 düzeyleri ……..……..….....56
Şekil 20. Deney gruplarında serum Tromboksan A_2 düzeyleri…….....57
Şekil 21. Deney gruplarında TNFα mRNA ekspresyon düzeyleri.....58
Şekil 22. Deney gruplarında serum TNFα düzeyleri ……..…….…….....60
Şekil 23. Deney gruplarında total kolin düzeyleri ……..…….....61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	Asetilkolin
ACTB	Beta aktin
α7nAChR	Alfa 7 nikotinik asetilkolin reseptörleri
APS	Amonyum persülfat
β-aktin	Beta aktin
CDP-kolin	Sitikolin (Sitidin 5'-Difosfokolin)
CLR	C tipi lektin reseptörleri
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
Cq	Eşik Değeri Döngüsü
COX	Siklooksijenaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DEÜTF	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
dNTP	Dinükleotittrifosfat
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent testi
ECL	Gelişmiş kemilüminesans
ESH	Eritrosit sedimantasyon hızı
GM-CSF	Granülosit-Monosit-Koloni-Stimülan Faktörler
HADYEK	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HRP	Yabanturpu peroksidazı
i.p.	İntraperitoneal
i.v.	İntravenöz
IL	İnterlökin
KAY	Kolinerjik Antiinflamatuvar Yolak
KCl	Postasyum klorür
kDA	Kilodalton
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
LPS	Lipopolisakkarit
mA	Miliamper
MAPK	Mitojenlerin Aktive Ettiği Protein Kinaz
NaH_2PO_4	Sodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
NLR	NOD benzeri reseptörler
PAF	Trombositleri Aktive Eden Faktör
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
OAB	Ortalama Arteriyel Kan Basıncı
FK	Fosfatidilkolin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PG	Prostaglandin
PLA_2	Fosfolipaz A_2
PRR	Patern Tanıyan Reseptör
PVDF	Poliviniliden florür
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
RLR	Retinoik Asit İle İndüklenebilir Gen-I-Benzeri Reseptörler
RNA	Ribonükleik asit
RT	Ters Transkriptaz

RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTase	Reverse Transkriptaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOFA	Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru
TBS	Tris tamponlu salin
TBST	Tris-Tamponlu Salin-Tween 20
TEMED	N,N,N,N′-Tetrametil etilendiamin
TLR	Toll benzeri reseptörler
TNFα	Tümör nekroz faktör-alfa
V	Volt

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve yürütülmesi aşamalarında katkılarından ötürü tez danışmanım Doç. Dr. M. Aylin ARICI'ya, Tez çalışmalarım süresince bana yol gösteren Prof.Dr. Ayşe GELAL'a, Doç. Dr. Emre HAMURTEKİN'e, Prof.Dr. Metiner TOSUN'a, ve Prof. Dr. İsmail Hakkı ULUS'a, Hayvan modellemesi ve takibi konusunda desteklerinden ötürü Dr. Aslı ÇELİK ve Uzm. Efsun KOLATAN'a, Moleküler, histolojik ve istatiksel analizler kısımlarında desteklerinden ötürü Prof Dr. Belgin ÜNAL'a, Doç. Dr. Zeynep YÜCE'ye, Doç.Dr.Seda ÖZBAL'a, Dr. Şeyma ÖNCÜ'ye, Hande EFE'ye ve Oğuzhan ŞİMŞEK'e, Doktora süresince akademik gelişimime katkıda bulunan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, Doktora eğitimin süresince akademik gelişimime olan katkıları ve üniversite altyapı desteklerini esirgemeyen İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı Prof.Dr. Hakan ABACIOĞLU'na, tez projemi destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİD İLE OLUŞTURULAN İNFLAMATUVAR YANITA SİTİKOLİN VE KOLİNİN ARAŞİDONİK ASİT YOLAK ARACILI ETKİSİ
Doktora Tezi

Elif BARIŞ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Farmakoloji Anabilim Dalı

ÖZET

İnflamasyon ve sistemik inflamatuvar yanıt kontrolünde kolinerjik anti-inflamatuvar yolak önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmamızda, lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen *in vivo* endotoksemi modelinde Sitidin 5'-Difosfokolin (CDP-kolin, sitikolin) ve kolinin siklooksijenaz yolu aracılı etkileri araştırılmıştır.

Wistar türü erkek sıçanlar; 1.Kontrol, 2.LPS (10 mg/kg), 3.LPS+Sitikolin (375 mg/kg) ve 4.LPS+Kolin (90 mg/kg) olmak üzere 4 gruba randomize edilmiş ve 24 saat gözlenmiştir. Sağkalım analizi, vücut ağırlıklarındaki değişim, dalak dokusu histomorfolojik değişimi ve sepsis skorları takip edilmiştir. Serum örneklerinden 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, Prostaglandin E_2, Tromboksan A_2, TNFα düzeyleri ile serum ve beyin dokusunda total kolin/asetilkolin miktarları ölçülmüştür. Karaciğer ve beyin dokularında siklooksijenaz-2 (COX-2) mRNA ekspresyonu gerçek zamanlı PCR ve protein ekspresyonları western blot analizleri ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizde, tek yönlü ANOVA ve Kruskal-Wallis; sağkalım analizi ise log-rank (Mantel-Cox) testleri ile analiz edilmiştir. $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

LPS grubunda ağırlık kaybı, mortalite oranı, dalak dokusu histomorfolojik hasarı ve sepsis skorları kontrol grubuna göre anlamlı oranda fazladır. LPS grubunda karaciğer ve beyin COX-2 mRNA ve protein ekspresyonu artmış; sitikolin ve kolin uygulanan gruplarda ise COX-2 ekspresyonu karaciğerde anlamlı olarak azalmıştır. Serum Tromboksan A_2 ve Prostaglandin E_2, LPS grubunda kontrole göre anlamlı oranda yüksek saptanmıştır. PGE_2 düzeyi kolin grubunda, TXA_2, PGE_2, 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$ düzeyi ise sitikolin grubunda LPS grubuna oranla anlamlı oranda azalmıştır. TNFα mRNA ve protein düzeyleri LPS grubunda artmış, tedavi gruplarında azalmıştır. Kolin ve sitikolin gruplarında, total kolin/asetilkolin düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır.

Bulgularımız LPS ile indüklenen endotoksemi modelinde, sitikolin ve kolinin, dolaşımdaki kolin konsantrasyonunu artırdığını, kolinerjik antiinflamatuvar yolağı aktive ederek, LPS ile indüklenen COX-2 enzim ekspresyonu aracılığı artan prostaglandin düzeylerini azaltarak antiinflamatuvar etki oluşturduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Sitikolin, Kolin, Endotoksemi, Siklooksijenaz-2, Prostaglandin
Tezin Sayfa Adedi: 89
Danışman: Doç. Dr. M. Aylin ARICI

THE EFFECT OF CITICHOLINE AND CHOLINE ON ARACHIDONIC ACID PATHWAY IN LIPOPOLISACCHARIDE INDUCED INFLAMMATORY RESPONSE IN RATS

Doctoral Thesis
Elif BARIŞ

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
Department of Pharmacology

ABSTRACT

The cholinergic anti-inflammatory pathway plays an important role in the control of the inflammation and systemic inflammatory response. This study investigated the effects of Cytidine-5′-diphosphocholine (CDP-choline, Citicoline) and choline on the cyclooxygenase pathway were in lipopolysaccharide (LPS)-induced in-vivo endotoxemia model.

Wistar male rats were randomized into four groups: 1.Control, 2. LPS (10 mg/kg), 3. LPS+Citicoline (375 mg/kg), 4. LPS+Choline (90 mg/kg) and observed for 24 hours. Survival analysis, changes in body weights, histomorphological changes of spleen tissue and sepsis scores were investigated. 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, Prostaglandin E_2, Thromboxan A_2, TNFα levels in serum and total choline/acetylcholine levels in serum and brain tissue were measured. Cyclooxygenase 2 (COX-2) mRNA expression in liver and brain tissues evaluated by RT-qPCR and protein expressions were measured by western blot analyzes. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests and log-rank (Mantel-Cox) test (for survival analyses) were employed for statistical analysis. $p<0.05$ was considered significant.

Weight loss, mortality rate, histomorphological damage of spleen tissue and sepsis scores were significantly higher in the LPS group compared to the control group. Liver and brain COX-2 mRNA and protein expressions were increased in LPS group whereas significantly decreased in liver tissues of citicoline and choline-treated groups. Serum Thromboxane A_2 and Prostaglandin E_2 were significantly higher in the LPS group compared to control. PGE_2 level was significantly decreased in the choline group while TXA_2, PGE_2, 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$ levels were significantly decreased in the citicoline group compared to the LPS group. TNFα mRNA and protein levels increased in the LPS group and decreased in the treatment groups. Total choline/acetylcholine levels were significantly increased in the choline and citicoline groups compared to the control group.

Our findings support the antiinflammatory effects of cholinergic anti-inflammatory pathway acting agents, citicoline and choline, by decreasing LPS-induced COX-2 enzyme expression and prostaglandin levels via increasing the circulating choline concentration.

Keywords: Citicoline, Choline, Endotoxemia, Cyclooxygenase 2, Prostaglandins
Page Number: 89
Advisor: Assoc. Prof. M. Aylin ARICI

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis, enfeksiyona karşı verilen sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Sepsiste sistemik inflamasyon mikroorganizmaların antijenik yapıları ve toksinleri ile tetiklenmektedir. Lipopolisakkarit (LPS) yapısındaki gram negatif bakteri endotoksinleri sepsise neden olan en fazla bilinen toksinlerdendir. Sepsis patogenezinde, inflamatuvar yanıtta dengesizlik, mitokondriyal hasar, immun disfonksiyon gibi farklı patofizyolojik süreçler bulunmaktadır. Sepsis, şiddeti ve tedavi durumuna göre, çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanabilmektedir (1).

Sepsiste, LPS ile aktive olan hücrelerden büyük miktarlarda sentezlenerek salıverilen sitokinler, lokal enfeksiyona karşı savaşarak sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna neden olmaktadır (1). Vücut, gelişen bu sistemik inflamatuvar yanıta karşı dengeyi sağlayan çeşitli mekanizmalar ile yanıt vermektedir. Bu mekanizmalardan biri olan kolinerjik antiinflamatuvar yolak (KAY), vagus siniri ve kolinerjik reseptörler aracılığıyla proinflamatuvar sitokin salınımını inhibe eden nöral bir mekanizmadır (2). Kolinerjik sinirler ile immün sistem arasındaki iletişim, mononükleer fagositik hücrelerdeki kolinerjik nikotinik reseptörler olan alfa 7 nikotinik asetilkolin reseptörleri (α7nAChR) aracılığı ile sağlanmaktadır. KAY aktivasyonunun, inflamasyonu baskılayarak sepsis tedavisinde yeni bir alternatif olabileceği ve bu yolağı aktive eden çeşitli ilaçların sepsis tedavisinde kullanımını destekleyen araştırmalar bulunmaktadır. Kolin ve bir kolin donörü olan sitikolin bu konuda umut vadeden ajanlardır (3).

Kolin, vücutta asetilkolin (Ach) sentezinde öncü madde olarak yer alır ve yüksek dozlarda Ach reseptörlerine bağlanarak kolinerjik nörotransmisyonu uyarır. Sitikolin (CDP-kolin, Sitidin 5'-difosfat kolin) ise hücre membran fosfolipidlerinin biyosentezinde bir ara madde olarak açığa çıkan endojen bir moleküldür. Dışarıdan verilen sitikolinin hücre zarında bulunan fosfodiesterazlar yardımıyla hızlıca kolin ve sitidine dönüşerek kolinerjik ve nöroprotektif etkilere neden olduğu gösterilmiştir (4).

Membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A_2 (PLA_2) aracılı açığa çıkan araşidonik asidden, siklooksijenaz (COX)-2 enzimi aracılığı ile prostaglandinler sentezlenir. COX enziminin COX-1 izoformu daha çok homeostaz ile ilişkilendirilirken; COX-2

izoformu uyarılabilen bir enzimdir ve sitokinler, doku hasarı, tümör promoterları tarafından artarak inflamasyon ve kanser patogenezine önemli katkıda bulunur. Sitokinler ile ekspresyonu artan COX-2 enzimi inflamasyonlu dokularda artış gösterir (5).

Sitikolin ve kolinin endotoksemik hayvanlarda sağkalım oranlarını artırdığını, doku hasarı ve çoklu organ yetmezliği üzerinde olumlu etkileri olduğunu gösteren pek çok çalışma vardır (6–9). Kolin ve sitikolinin koruyucu etkilerinde, KAY aktivasyonu sonucunda endotoksine bağlı mononükleer hücrelerden inflamatuvar medyatörlerin salımında azalmanın rolü olduğu düşünülmektedir (10).

Bu çalışmada, LPS ile oluşturulan endotoksemi modelinde, KAY'ı aktive eden kolin ve sitikolinin oluşan inflamatuvar yanıt ve COX-2 yolağı aracılı etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla Wistar albino erkek sıçanlarda, endotoksemi modeli 10 mg/kg LPS ile oluşturulmuştur. Kolin ve sitikolinin endotoksemi modelinde koruyucu etkileri 24 saatlik protokolde değerlendirilmiştir. LPS ile endotoksemi oluşturulan grupta; ağırlık kaybı, mortalite oranı, dalak histomorfolojik hasar ve sepsis skorları kontrol grubuna göre anlamlı oranda artmıştır. LPS grubunda inflamasyonu destekler şekilde karaciğer ve beyin mRNA ve protein COX-2 ekspresyonu artmış; tedavi gruplarında (sitikolin ve kolin uygulanan gruplar) ise COX-2 ekspresyonu karaciğerde anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgularla uyumlu olarak serum Tromboksan A_2 ve Prostoglandin E_2 düzeyleri, TNFα mRNA ve protein düzeyleri de LPS grubunda kontrole göre anlamlı oranda yüksek saptanmıştır. PGE_2 düzeyi kolin grubunda, TXA_2, PGE_2, stabil prostasiklin metaboliti 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$ düzeyi ise sitikolin grubunda LPS grubuna oranla anlamlı olarak azalmıştır. TNFα mRNA ve protein düzeyleri, tedavi gruplarında LPS grubuna göre azalmıştır. Kolin ve sitikolin gruplarında, total kolin/asetilkolin düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır.

Bu bulgular eşliğinde, LPS ile oluşturulmuş endotoksemi modelinde, sitikolin ve kolin, total kolin/asetilkolin düzeyin arttırarak, KAY aktivasyonu ile COX-2 aracılığı ile oluşan inflamatuvar medyatörleri düşürerek koruyucu etki göstermiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sepsis

Sepsis, enfeksiyonun neden olduğu fizyolojik, biyokimyasal ve patolojik bozuklukların eşlik ettiği klinik bir durumdur. Aslında, Hipokrat zamanından (MÖ 460-370) beri antik Yunanlılar tarafından bilinen sepsis vücudun çürümesine neden olan bir durum olarak tanımlanmıştır (11). İlk kez 1914 yılında Hugo Schottmüller tarafından sepsis gelişimi için, enfeksiyon etkeninin varlığının temel gereklilik olduğu gösterilmiştir. Bunun ardından sepsis, şüpheli veya kanıtlanmış bir enfeksiyöz bölge ve bu duruma eşlik eden en az iki sistemik inflamatuvar yanıt sendromu kriterinin eşlik ettiği durum olarak tanımlanmıştır. Bu tanımda sepsis, enfeksiyona karşı vücutta gelişen normal bir inflamatuvar reaksiyon olarak nitelendirilmektedir. Ancak ileri çalışmalar, sepsiste erken dönemde gelişen immünsupresyonun ve organ disfonksiyonunun sepsis patogenezinde önemli bir yeri olduğunu düşündürmüş ve mevcut tanımda vurgulanan inflamatuvar yanıtın yanı sıra tüm sistemlerde konak yanıtında bozulmanın önemine vurgu yapılmıştır (12). Güncel tanımında ise sepsis, kişinin enfeksiyon karşısında kontrolsüz tepkisi ve eşlik eden çoklu organ yetmezliği olarak tanımlanmaktadır. Organ disfonksiyonu, Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru (Sequential Organ Failure Assessment Score: SOFA) temel alınarak belirlenmektedir (13).

2.1.1. Sepsis Epidemiyolojik özellikleri

Sepsis, dünya genelinde yılda yaklaşık 20 milyon olguda bildirilmektedir. Bu olgular arasında ise 5 milyondan fazla sepsis bağlantılı ölüm olduğu tahmin edilmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda sepsis insidansı, %11.8 ile %16.6 arasında değişmektedir (14). Bu veriler, genellikle yüksek gelirli ülkelerin verileri baz alınarak derlendiğinden, düşük ve orta gelirli ülkelerden gelen veriler de gözönünde bulundurulduğunda, sepsis insidans ve ölüm oranının önemli ölçüde yüksek ve küresel rakamların iki katından fazla olabileceği tahmin edilmektedir (15).

2.1.2. Sepsis Patogenezi

Sepsis patogenezi, inflamatuvar yanıtta dengesizlik, mitokondriyal hasar, immun disfonksiyon gibi oldukça karmaşık çeşitli patofizyolojik süreçleri içerir ve sonuçta çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanır. Sepsiste, yaygın inflamasyon, koagülasyon bozukluğu ve bozulmuş fibrinoliz tipiktir (16,17).

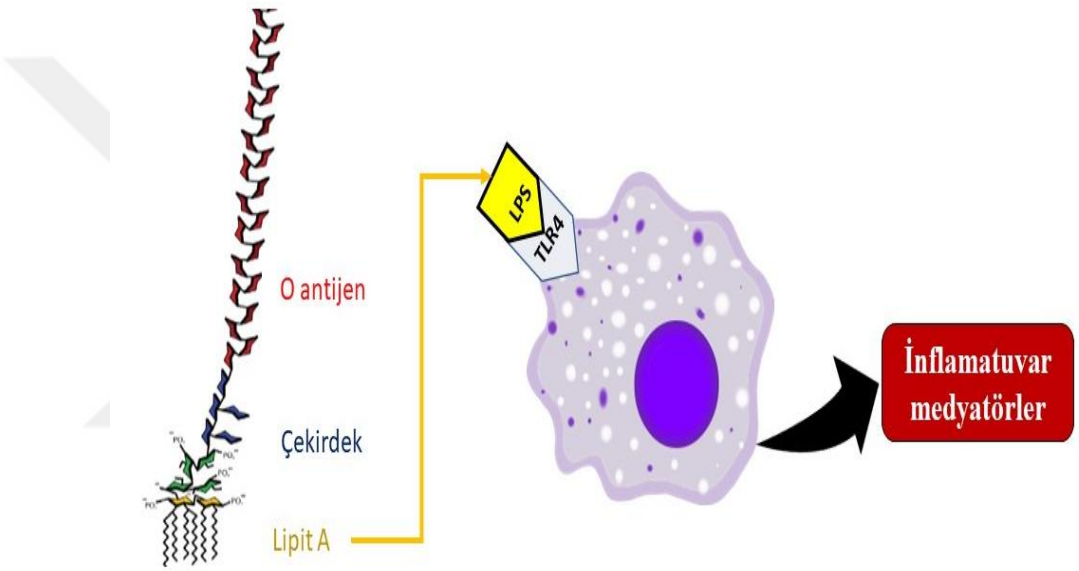
2.1.3. Sepsis ve İnflamasyon

Sepsis patogenezinde inflamasyon gelişimi temel mekanizmalardandır. Sepsiste, sistemik inflamasyona neden olan enfeksiyon etkenlerinden olan; bakteri, mantar, parazit ve virüslerin bazı antijenik yapıları ve toksinleri patogeneze katkıda bulunurlar. Bunlar arasında en iyi bilinen ve sepsise neden olduğu gösterilen toksin lipopolisakkarid (LPS) yapısındaki gram negatif bakteri endotoksinleridir (Şekil 1). Bakteri lizisi sonucunda dolaşıma katılan endotoksinler nedeniyle kanda LPS varlığı ise endotoksemi olarak tanımlanmaktadır(18).

Sepsiste, gelişen toksisiteden sorumlu olan Endotoksinin lipid A bölümü, patern tanıyan reseptörler (PRR) ailesinden toll benzeri reseptörlere (TLR), C tipi lektin reseptörlerine (CLR), RIG-I benzeri reseptörlere (RLR) ve NOD benzeri reseptörlere (NLR) bağlanarak immün yanıtı başlatırlar (19) (Şekil 2). Bunlar arasında sepsiste gelişen inflamasyonda; TLR'ler yaygın olarak incelenmiştir ve sepsiste TLR4 ve TLR2 ifadelenmesinin belirgin olarak artış gösterdiği bildirilmiştir (20).

TLR uyarımı ile aktive olan hücrelerde mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz (MAPK) ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) gibi hücre içi sinyal kaskadları aracılığı ile uyarım nükleusa ulaşır. Hücrelerden tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin 1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve trombositleri aktive eden faktor (PAF) gibi proinflamatuvar sitokinler salıverilir. IL-1 ve IL-6, T hücrelerini aktive ederek interferon, IL-2, IL-4, granülosit-monosit-koloni-stimülan faktörler (GM-CSF) gibi sitokinlerin salgılanmasını sağlar. Bu sitokinler, lokal enfeksiyona karşı savaşırlar. Ancak endotoksemi sırasında yüksek miktarlarda sentezlenerek dolaşıma karışmaları, yaygın endotel hasarı gelişmesine neden olur. TNF, lökosit yüzeyindeki adezyon moleküllerini aktive ederek nötrofillerin endotel hücrelerine yapışmasına neden olur. Aktive olmuş nötrofillerin degranülasyonu sonucu açığa çıkan proteazlar ve reaktif oksijen radikalleri (ROS) ise

endotel hücresinin zedelenmesini kolaylaştırır. Ayrıca endotoksinin direkt etkisi veya sitokinlerin uyarımı ile tromboksan, prostaglandin ve lökotrienler gibi araşidonik asit metabolitlerinin salıverilmesi, kapiller permeabilite artışına neden olur. Kapiler permeabilite artışı, inflamasyon kaynaklı hemodinamik değişikliklere ve çoklu organ yetmezliği gelişimine neden olabilmektedir (21). Ayrıca, sepsiste gelişen mitokondriyal hasar da, oksidatif stres ve hücresel apoptoz gelişimi aracılığı ile bozulmuş immün yanıt ve çoklu organ yetmezliğine katkıda bulunabilmektedir (22).



Şekil 1. Lipopolisakkarid yapısı (23)

LPS: Lipopolisakkarid, TLR: Toll benzeri reseptör

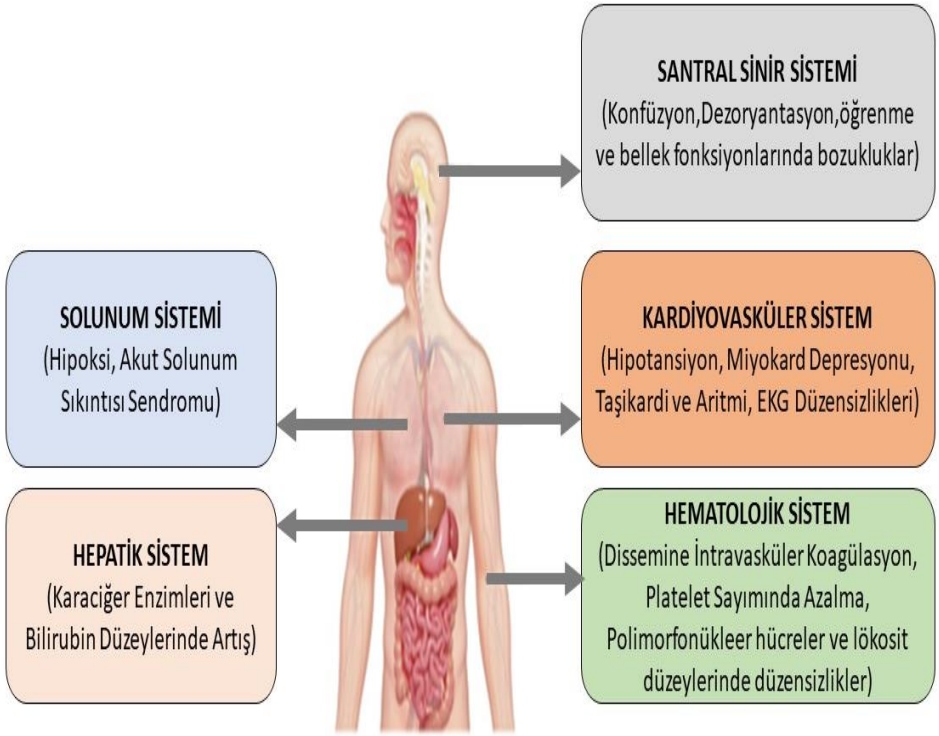
2.1.4. Sepsiste risk faktörleri

Sepsis gelişimini kolaylaştıran kişiye ait bazı bazı risk faktörleri bulunmaktadır. Bunlar arasında, ileri yaş (65 yaş ve üstü) veya 1 yaşından küçük olmak, akciğer hastalığı, kalp yetmezliği, siroz, diyabet, kanser veya böbrek hastalığı gibi eşlik eden kronik durumlar ve immünsupresyon varlığı başta gelmektedir. Ayrıca kadınlarda

sepsis sıklığının östrojenin kardiyovasküler sistem ve immun cevap üzerine olumlu etkileri nedeni ile erkeklere göre daha düşük olduğu bildirilmektedir. Sepsisin daha sıklıkla havanın soğuk olduğu kış aylarında gözlendiği ve sepsise neden olan enfeksiyon kaynağının sıklıkla akciğer ve abdominal dokular olduğu bildirilmektedir (14,24).

2.1.5. Sepsiste klinik bulgular

Sepsiste, bulgular hastaya göre değişken olmakla birlikte, hipertermi veya hipotermi, hipotansiyon, taşikardi, takipne sıklıkla gözlenmektedir. Hastalık seyrinde septik şok gelişmesi durumunda klinik tabloya soğuk cilt ve siyanoz gibi şok belirtileri ile oligüri, akut böbrek hasarı, akut solunum sıkıntısı, değişken mental durum gibi farklı organ disfonksiyonlarını işaret eden bulgular da eklenmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Sepsis Bulguları (25)

Sepsiste Laboratuvar Bulguları

Sepsiste tanıyı koyabilmek ve prognozu belirleyebilmek için kullanılan çeşitli biyobelirteçler vardır. Ancak bunların hiçbiri sepsis tanısında, sepsisi diğer hastalıklardan ayırmada ve prognozu belirlemede yeterli özgüllüğe sahip değildir (14).

Laboratuvar bulguları sepsise neden olan mikrobiyal etken veya organ disfonksiyonları ile ilişkili olarak değişkenlik göstermektedir. Lökositoz veya lökopeni, akut faz reaktanlarında artış, hipoksemi, akut oligüri, kreatinin düzeylerinde artış, koagülasyon anomalileri, trombositopeni, hiperbilirubinemi, hiponatremi, hiperkalemi, hiperlaktatemi sepsisli hastalarda sık karşılaşılan laboratuvar bozukluklarıdır. Pnömoni varlığında, posteroanterior akciğer grafisi gibi bölgesel enfeksiyonla ilişkili radyolojik testler haricinde sepsisin tanısına özgü radyolojik bir test bulunmamaktadır (24,26).

2.1.6. Sepsis Tanısı

Sepsiste organ disfonksiyonları, hastanın klinik ve biyokimyasal bulguları ile terapötik müdahaleleri temel alan farklı skorlama sistemleri ile değerlendirilmektedir. Skorlama sistemlerinden Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru (Sequential Organ Failure Assessment Score: SOFA) ve Çoklu Organ Yetmezliği Skoru (Multiple Organ Dysfunction Score: MODS) en sık kullanılanlardır(24,27). SOFA skorlamasında solunum (oksijen/karbondioksit parsiyel basınç oranı), koagülasyon (trombosit Sayımı), karaciğer fonksiyonları, kardiyovasküler ve renal parametreleri ile bilinç durumu değerlendirilmektedir.

Sepsiste tanı kriterleri, yoğun bakım ünitesinde tedavi gerektiren ve yoğun bakım dışı takip edilen hastalar için farklılık göstermektedir. Enfeksiyon şüphesi ile yoğun bakım ünitesinde tedavi gerektiren hastalar, SOFA skoru 2 puan olduğunda sepsis tanısı almaktadır (Tablo 1). Yoğun bakım dışında takip edilen hastalar için quickSOFA (qSOFA) skorunda farklı parametreler değerlendirilerek (sistolik kan basıncı 100 mm Hg'den düşük olması, solunum hızı 22/dk'dan fazla olması, bilinç değişikliği, vb.) sepsis tanısı konmaktaır (26,28). SOFA skoru, organ disfonksiyonu ve hayati tehlikesi olan kişileri belirlemek için kullanılmaktadır. SOFA toplam puanı

sepsisten ölüm riskini ve tedavinin aciliyetini göstermektedir. SOFA skorundaki 2 puan ve üzeri bir artış, %10 oranında mortalite artışı ile ilişkilendirilmiştir (29).

Tablo 1. Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru (SOFA) (30)

Skor	0	1	2	3	4
Solunum PaO_2/FiO_2* mmHg (kPa)	≥400	<400	<300	<200	<100
Koagülasyon Trombosit Sayısı× $10^3/\mu L$	≥150	<150	<100	<50	<20
Karaciğer Bilirubin	<1,2 (mg/dL)	1,2-1,9 (mg/dL)	2,0-5,9 (mg/dL)	6,0-11,9 (mg/dL)	>12 (mg/dL)
Kardiyovasküler (OAB)**	OAB ≥70 mm Hg	OAB <70 mm Hg	Dopa***<5 (µg/kg/min) veya Dobu***	Dopa 5,1-15, E*** ≤0,1, NE*** ≤0,1 (µg/kg/min)	Dopa> 15 E> 0,1, NE> 0,1 (µg/kg/min)
Santral Glaskow Koma Skoru	15	14-13	12-10	9-6	<6
Renal Kreatinin ve idrar çıkışı	<1,2 (mg/dL)	1,2-1,9 (mg/dL)	2,0-3,4 (mg/dL)	3,5-4,9 (mg/dL) <500 (ml/gün)	>5 (mg/dL) <200 (ml/gün)

* arteriyel kanda, oksijen (PaO_2)/inspriyum havasındaki fraksiyone oksijen (FiO_2) oranı

**OAB: Ortalama Arteriyel kan basıncı

***Dopa: Dopamin, E: Epinefrin, NE: Norepinefrin

2.1.7. Sepsiste Akut Faz Reaktanları

İnflamasyona yanıt olarak artış veya azalma gösteren plazma proteinleri, Akut faz reaktanları (AFR) olarak adlandırılmaktadır. İnflamatuvar sitokin, interlökinler, TNFα, interferon gibi, düzeylerindeki artışın karaciğerde AFR üretimine aracılık ettiği bilinmektedir. AFR'lar arasında eritrosit sedimantasyon hızı (ESH), C-reaktif proteini (CRP), prokalsitonin (PCT), serum amiloid A proteini, fibrinojen, ferritin, alfa-1 antitripsin, haptoglobin, alfa-1 asit glikoprotein, seruloplazmin ve kompleman proteinleri C3 ve C4 bulunmaktadır. AFR'ları arasında ESH ve CRP en iyi bilinen ve klinikte en sık kullanılanlardır. Bakteriyel enfeksiyon biyobelirteci olarak, prokalsitonin düzeyleri de son yıllarda klinik kullanımda yaygın olarak ölçülen AFR'ler arasındadır (31).

ESH, inflamasyonun başlangıcından sonra 24-48 saat içinde yükselmekte ve inflamasyonun tedavi edilmesi ile yavaş yavaş düşmektedir. ESR, inflamasyon spesifik bir AFR olmamakla birlikte inflamatuvar koşulların yanı sıra yaş, anemi varlığı, gebelik, ilaçlar ve obezite durumlarında artmaktadır (32). CRP'nin ESH'na göre enfeksiyona daha spesifik bir AFR olduğu belirtilmektedir. CRP temel olarak, inflamasyon varlığında IL-6 artışına yanıt olarak karaciğerde üretimi indüklenen bir AFR'dır ve inflamatuvar yanıtın şiddeti ile orantılı olarak artmaktadır. Hafif, orta şiddetteki inflamatuvar koşullarda ilk 6 saat içerisinde artığı bildirilmiştir (33). PCT düzeyi takibinin bakteriyel kökenli inflamatuvar yanıtta ESH ve CRP'ye kıyasla daha duyarlı ve özgül olabileceği belirtilmiştir (34). PCT düzeyleri diğer parametrelere kıyasla inflamatuvar yanıtta daha erken dönemde, ilk 4 saat içerisinde, artış göstermektedir. Bu nedenle, PCT düzey takibinin klinik açıdan önemi vurgulanmaktadır (31,35).

2.1.8. Sepsis Tedavisi

2021 Sepsis Tedavi Kılavuzuna (Surviving Sepsis Campaign 2021)'nda Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru (Sequential Organ Failure Assessment Score: SOFA)'na göre sepsis tanısı almış ve septik şoklu hastalarda, perfüzyonun hızla

düzeltilmesi ve antibiyotik tedavisine erken başlanması gerektiği bildirilmektedir (36,37). Septik şok durumunda perfüzyonun hızla düzeltilmesi için, resüsitasyonun ilk 3 saatinde; intravenöz sıvı desteği için genellikle dengeli kristaloidler (ringer laktat, %5'lik dekstroz, hetastarch, vb.) veya normal salin (30 mL/kg) kullanılmaktadır. İntravenöz sıvı desteğine rağmen kan basıncının düşük seyretmesi durumunda (OAB<65mmHg) vazopressör tedavisine başlanmaktadır (38–40). Septik şokta birinci basamak vazopressör ajan olarak norepinefrin (5-15 mcg/dk başlangıç dozunu takiben 2-80 mcg/dk) kullanımını destekleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır (41,42).

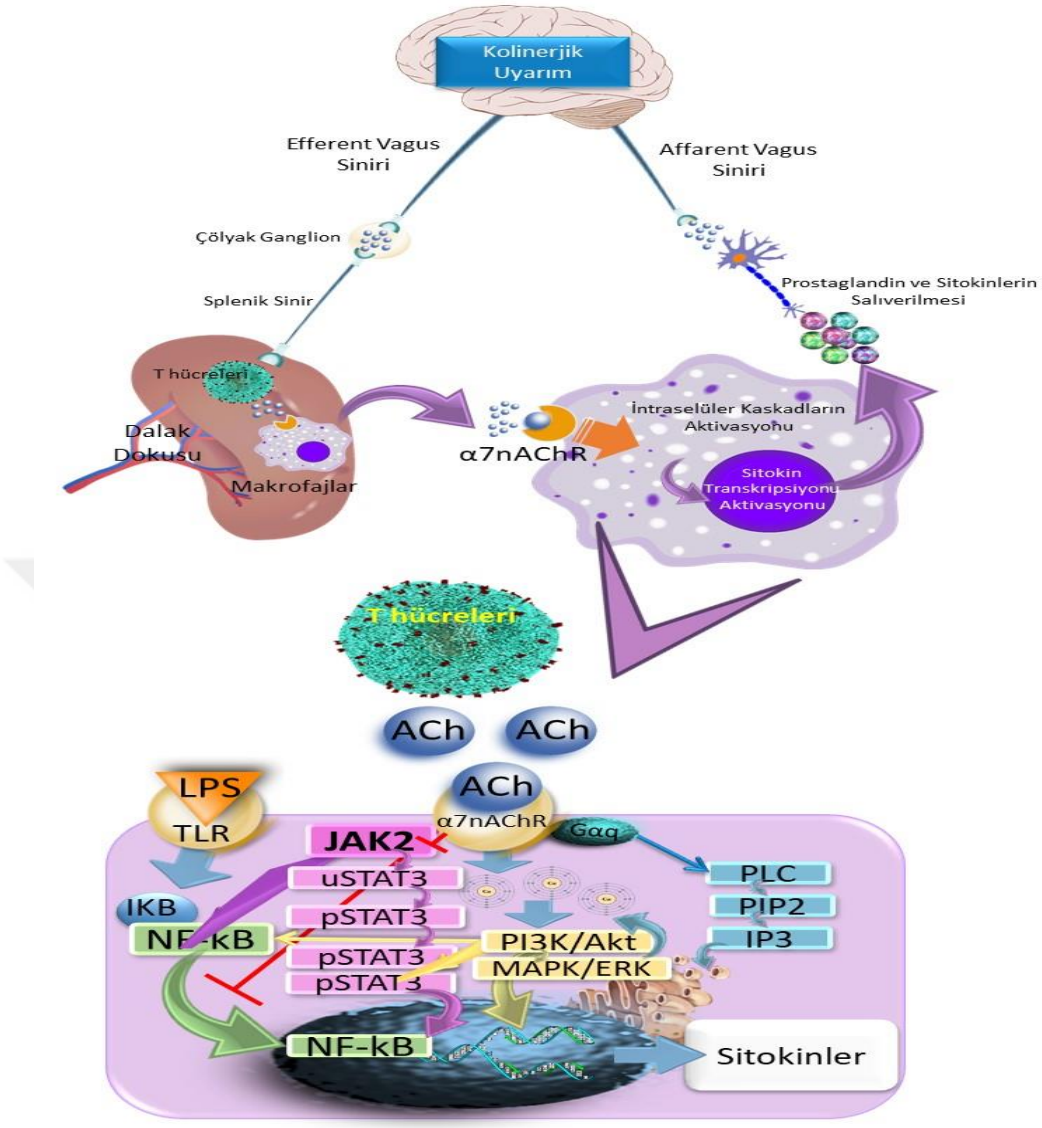
Sepsise neden olan enfeksiyon etkeninin tedavisi için de resüsitasyonun ilk üç saatinde ampirik antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Antibiyotik tedavi protokolünde, bir veya birden fazla antibiyotik kullanılarak, olası patojenleri kapsayacak şekilde geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı kabul görmektedir (43). Belirlenen antimikrobial spektrumun gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yanı sıra nadiren mantarları (Candida spp.) ve virüsleri (influenza) de kapsaması önerilmektedir. Ampirik antimikrobiyal ajan seçiminde, etki spektrumunda sepsise neden olan en yaygın organizmalar olan *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae* ve *Streptococcus pneumoniae'*yı kapsayan antibiyotikler seçilmektedir. Bunun ardından tedaviye, mikrobiyolojik kültürde izole edilen mikroorganizma ve antibiyotik duyarlılığı testlerinde belirlenen uygun antimikrobiyal ajan ile devam edilmektedir (44). Patojen belirlenip duyarlılığı gösterildiğinde ve/veya klinik düzelme sağlandığında ise antimikrobiyal tedavide etkenin duyarlı olduğu dar spektrumlu antimikrobiyal ajanlara geçilmesi önerilmektedir (36).

2.2 Kolinerjik Antiinflamatuvar Yolak (KAY)

Proinflamatuvar sitokinlerin sınırsız salımı, vücutta inflamasyona yanıtta önemli olan kolinerjik sistem tarafından düzenlenen sistemik inflamasyonu başlatır. Parasempatik sistem yoluyla vücutta inflamasyona yanıtın kontrolü, kolinerjik Antiinflamatuvar yolak (KAY) aracılığı ile sağlanır. KAY, vagus siniri ve reseptörleri aracılığıyla pro-inflamatuvar sitokin salınımını inhibe eden nöral bir mekanizmadır. Kolinerjik sinirler ile immün sistem arasındaki iletişim için makrofaj başta olmak üzere diğer immün hücrelerde eksprese edilen kolinerjik nikotinik reseptörler olan alfa 7 nikotinik

asetilkolin reseptörleri (α7nAChR) anahtar bir role sahiptir (45). Ach ve α7nAChR agonistleri aracılı makrofaj α7nAChR aktivasyonu hem TNFα hem de interlökin (IL)-1, IL-6 ve IL-8 serbestlenmesini inhibe ederek inflamasyonu baskılar (Şekil 3).

Endotoksemik hayvanlarda, KAY'ın uyarıldığı, bunun sonucunda Ach salıverilmesinin arttığı, TNFα seviyesinin düştüğü (46) ve proinflamatuvar yanıtın azaldığı bildirilmiştir (47–49). Çekal ligasyon ile oluşturulan septik şok modelinde α7nAChR agonisti GTS-21, inflamatuvar durumlarda artan sitokin düzeyini azaltmış ve hayatta kalma oranlarını artırmıştır (50–52). Kolinerjik antiinflamatuvar yanıtın oluşmasında, makrofajlar başta olmak üzere inflamatuvar hücrelerde eksprese edilen α7nAChR'lerinin önemli rolünün olduğu düşünülmektedir (2). Dolayısıyla bu reseptörler üzerinden etki gösteren maddelerin inflamasyonu baskılayarak sepsiste yeni bir tedavi alternatifi olma durumları söz konusu olabilir. Kolin ve bir kolin donörü olan sitikolin bu konuda umut vericidir.



Şekil 3. Kolinerjik Antiinflamatuvar Yolak (45)

LPS:Lipopolisakkarit, TLR: Toll benzeri reseptörler, NF-kB: nükleer faktör kappa B, IkB: İnhibitör kappa B, ACh: Asetilkolin, α7nAChR: Alfa 7 nikotinik Asetilkolin Reseptörleri, JAK: Janus Kinaz, STAT: Transkripsiyonun Sinyal İleticileri ve Aktivatörleri, uSTAT3: Fosforile Olmayan STAT3, pSTAT3: Fosforile STAT3, Ca: Kalsiyum iyonu, PI3K: Fosfoinositid-3 Kinaz, Akt: Protein Kinaz B, MAPK: Mitojen Aktif Protein Kinaz, ERK: Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz, Gαq: α altbirimini içeren G-proteini ile eşleşmiş reseptör, PLC: fosfolipaz C, PIP2: fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat, IP3: İnozitol 1,4,5 trifosfat

2.2.1 Kolin ve Sitikolinin Genel Özellikleri

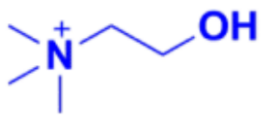
Kolin ilk kez 1966 yılında sentez edilmiş, 1998 yılında yaşam için 'esansiyel' olarak değerlendirilmiştir. Kuaterner amin yapıya sahip olan kolin, vücutta nörotransmitter asetilkolinin sentezinde prekürsördür. Yüksek dozlarda ise Ach reseptörlerine bağlanarak kolinerjik nörotransmisyonu uyarır. (Şekil 3). Ayrıca hücre mebranında bulunan bazı temel fosfolipidlerin (fosfotidil kolin ve sifingomyelin gibi) sentezinde de öncül madde olarak görev alır. Bununla bağlantılı olarak hücre membranı zarındaki fosfolipidlerden kaynaklanan bazı ikinci habercilerin (lizofosfotidilkolin, platelet aktive edici faktör (PAF) vb.) yapısında da yer alır. Vücutta metil verici molekül olarak da görev görür (53).

Sitikolin (CDP-kolin, Sitidin 5'-difosfat kolin) ise hücre membran fosfolipidlerinin biyosentezinde endojen bir ara madde olarak açığa çıkan nükleotid yapıdaki karmaşık bir organik moleküldür (Şekil 4). Kolin ve sitikolinin ana kaynağını hücre membranında bulunan fosfatidil kolin oluşturmaktadır. Fosfatidil kolinden kolin ve sitikolin sentezi oluşumunda Kennedy Yolağı en büyük katkıyı sunmaktadır (Şekil 5). Bu yolak aracılı üretim başta karaciğer ve böbrek olmak üzere beyinde de meydana gelmektedir (54,55). Sitikolin, kolin ve sitidin kaynağı olarak kabul edilmektedir. Sitikolin sodyum tuzu, enjekte edilebilir veya oral formülasyonlar gibi çeşitli farmasötik formulasyonlarda besin takviyesi olarak kullanılabilir (56).

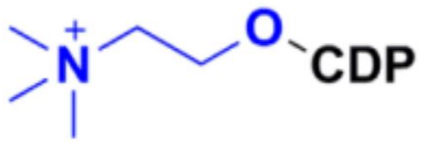
Eksojen olarak verilen sitikolin ile yapılan deneysel çalışmalar ve klinik araştırmalar ile sitikolinin kolinerjik ve nöroprotektif etkilerine dair kanıtlar elde edilmiştir. Ekzojen sitikolin, hücre zarında bulunan fosfodiesterazlar yardımıyla hızlıca kolin ve sitidine dönüşür (4). Dolaşımdaki ve beyindeki kolin düzeyi artar (57,58). Sistemik yollarla uygulanan kolin ve sitikolinin biyoyararlanımı %90'ın üzerindedir.

Kolin, Ach sentezini ve sinaptik aralığa salıverilmesini artırır (59,60). Böylece sitikolin aracılı artan kolinerjik sistem aktivitesine bağlı birçok farmakolojik ve fizyolojik etki oluşur. Ayrıca besin takviyesi olarak verilen sitikolinin, nöron membranı zarı yapısal bütünlüğünün ve işlevselliğinin sağlanmasında faydalı etkileri de vardır. Sitikolin, klinikte serebral iskemi, hipoksi, kafa travmaları, öğrenme ve

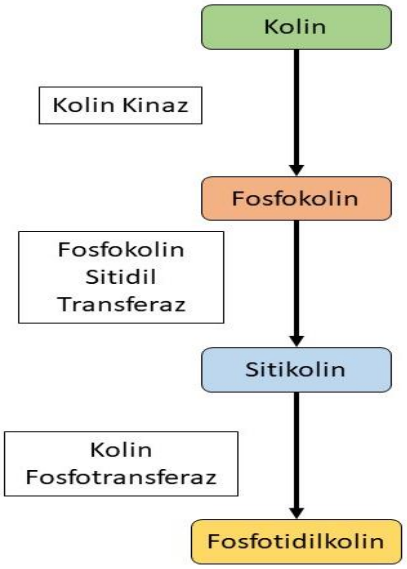
hafıza gelişimi, Alzheimer, bilişsel bozukluklar ve Parkinson hastalığı tedavisinde yardımcı beslenme desteği olarak önerilmektedir (61–66).



Şekil 4. Kolinin kimyasal yapısı (55)



Şekil 5. Sitikolinin kimyasal yapısı (55)



Şekil 6. Kennedy yolağı (54)

2.2.2 Kolin ve Sitikolin İnflamasyondaki Rolü

Kolin ve bir kolin donörü olan sitikolinin kolinerjik sistem aktivitesini artırıcı ve α7nAChR'ne agonistik etkisi (67–70) dolayısıyla sepsisteki rolü popüler araştırma konularındandır. Sitikolin ve kolinin endotoksemik hayvanlarda sağkalım oranlarını artırdığını, doku hasarı ve çoklu organ yetmezliği üzerinde olumlu etkileri olduğunu gösteren pek çok çalışma vardır (6,7,9,71). LPS ile indüklenen septik şok modelinde, sitikolin ve kolinin sekonder hemostatik ve fibrinolitik sistemleri, dissemine intravasküler koagülasyon gelişimini, artan koagülasyon faktörlerinin tüketimini ve antikoagülan etkilerini engellediği gösterilmiştir (72). Sitikolinin, kardiyovasküler sistem üzerine olumlu etkileri de çeşitli deneysel septik şok modellerinde gösterilmiştir (7,73). Sitikolinin mikrovasküler permeabiliteyi azalttığı, hemodinamik, inflamatuvar parametreleri düzenlediği ve septik şoka bağlı oluşan hipotansiyonu da düzelttiği gösterilmiştir (74). Kolin, endotoksin ile artış gösteren serum proteinlerini ve lipidlerini azaltmıştır. Vital organlar üzerindeki bu koruyucu etkinin KAY aktivasyonu sonucunda endotoksin ile indüklenen mononükleer hücrelerden inflamatuvar medyatörlerin salıverilmesinin azalması ile olduğu düşünülmektedir (10). İntraperitoneal uygulanan kolinin endotoksemik farelerde, makrofaj hücre kültüründe TNFα seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. α7nAChR'ni ifade etmeyen farelerde ise bu artışın engellenemediği ve kolinin antiinflamatuvar etkisinin α7nAChR aracılı olduğu desteklenmiştir (9,75).

2.3 Siklooksijenaz (COX) enzimi ve Prostaglandinler

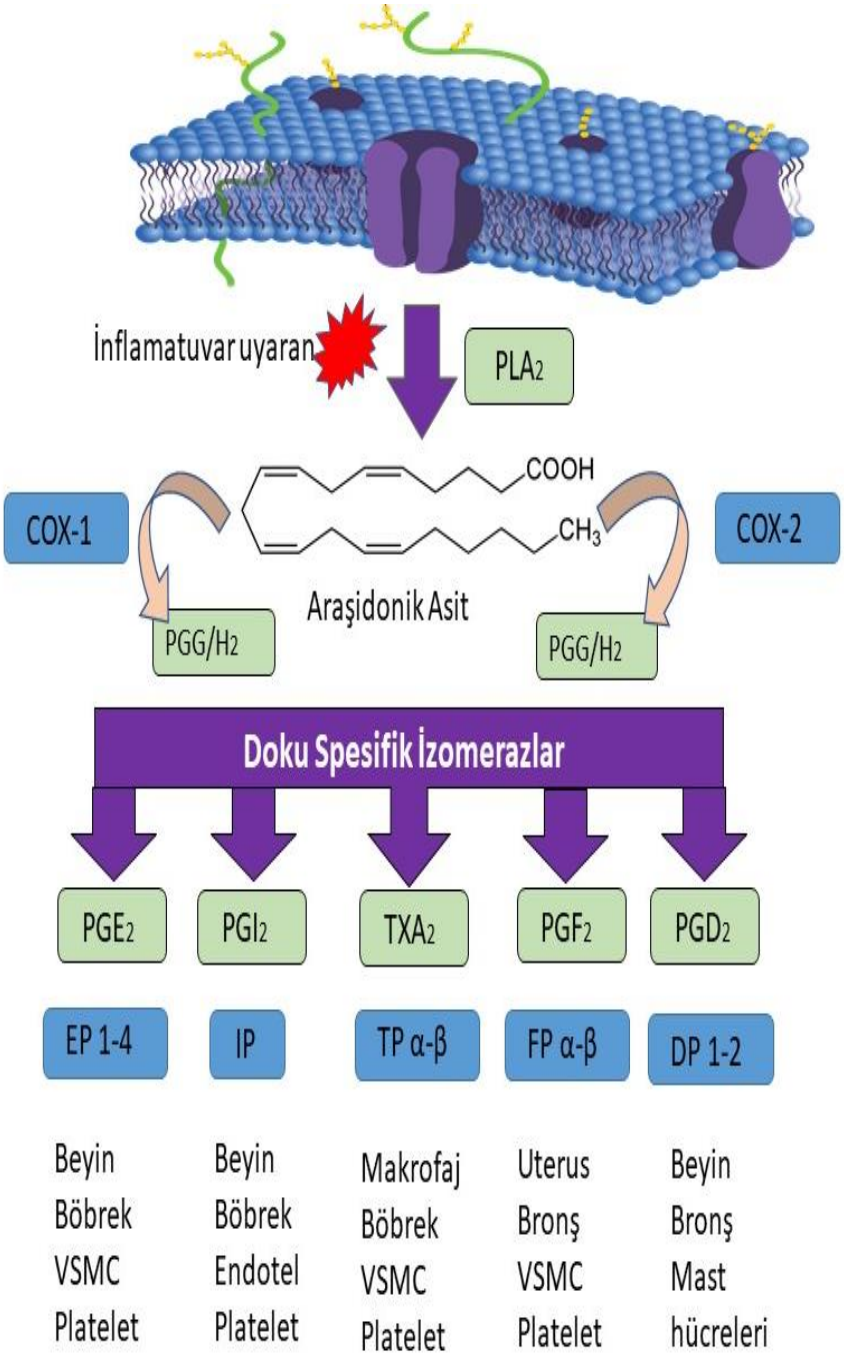
Prostaglandinler, inflamasyonda artış gösteren proinflamatuvar sitokin ailesi üyelerindendir. Faklı izoformları bulunan Siklooksijenaz (COX) enziminin COX-1 izoformu daha çok homeostaz ile ilişkilendirilirken; COX-2 izoformu uyarılabilen bir enzim olarak sitokinler, doku hasarı, tümör promoterları tarafından indüklenerek inflamasyon ve kanserde önemli bir role sahiptir (5). Sitokinler ile ekspresyonu artan COX-2 enzimi inflamatuvar uyaran ile indüklenebilen bir enzim olarak inflame dokularda artış gösterir. Membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A_2 (PLA_2) aracılı açığa çıkan araşidonik asidden, COX-2 enzimi aracılığı ile Prostaglandin (PG)G_2/H_2 sentezlenir. Prostaglandin I_2 (PGI_2) sentaz ve mikrozomal prostaglandin E sentaz; PGG_2/H_2'den PGI_2 ve PGE_2 oluşumunu sağlar (76,77) (Şekil 7). PGI_2 ve PGE_2 aynı

zamanda inflamasyonun temel belirtilerinden olan vasküler değişimleri ve piretik yanıtın oluşumuna da katkı sağlar (5,78).

Karagenin ile oluşturulan akut inflamasyon modelinde prostaglandin oluşumunun büyük ölçüde COX-2'ye bağlı oluştuğu tespit edilmiştir (77). İnflamatuvar koşullarda PGE_2 ve PGI_2, vazodilatasyona neden olarak kanlanmayı arttırır, lökosit infiltrasyonu ise ağrı ve ödem gelişimine neden olur (5,79,80). PGI_2 depolanmaz ve hızla aktif olmayan metaboliti 6-keto-$PGF_{1\alpha}$'ya dönüştürülür ve *in vivo* ölçümlerde metaboliti tayin edilir (81). Farelerde artrit ve periton içi akut inflamasyon modellerinde PGI_2 en fazla oluşan prostaglandinlerdendir (82).

Kolinerjik sistem ve siklooksijenaz etkileşimini konu alan çalışmalar incelendiğinde, oral uygulanan sitikolinin beyindeki nekrotik dokuda PLA_2 enzim aktivasyonunu durdurduğu gözlemlenmiştir (83). Karşıt sonuçlar elde edilen *in vitro* bir çalışmada ise; mikroglial hücrelerde spesifik agonist nikotin uygulanarak aktive edilen α7nAChR'nin COX-2 ekspresyonunu ve PGE_2 sentezini artırdığı gösterilmiştir (84). Başka bir çalışmada, farelerde karagenin ve LPS ile indüklenen akut inflamasyon modelinde kolin ve aspirinin kombine kullanılması sinerjik bir antiinflamatuvar etkiye neden olmuştur. Çalışmada, kolinin inflamasyon ile indüklenen PGE_2, PGI_2, TXA_2 ve diğer inflamatuvar sitokinlerin düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü görülmüştür. Prostaglandin ve sitokin düzeylerindeki bu düşüşün α7nAChR aktivasyonu aracılı olduğu ve sepsis, artrit gibi inflamatuvar hastalıklarda umut verici bir tedavi yaklaşımı olabileceği vurgulanmıştır (6). Sonuç olarak; sitikolin ve kolinin LPS ile indüklenen sepsis modelinde bazı patolojik olayları düzeltebildiğine işaret eden veriler mevcuttur.

Bu çalışmada, sepsiste umut verici kolin ve sitikolinin LPS ile oluşturulan *in vivo* sepsis modelinde inflamasyon üzerine COX-2 aracılı etkileri araştırılmıştır.



Şekil 7. Araşidonik Asit Yolağı (85)

PLA_2: Fosfolipaz A_2, COX: Siklooksijenaz, PG: Prostaglandin, PGE_2: Prostaglandin E_2, PGI_2: Prostaglandin I_2 (Prostasiklin), TXA_2: Tromboksan A_2, PGF_2: Prostaglandin F2, PGD_2: Prostaglandin D2, EP: Prostaglandin E2 reseptörü, IP: Prostaglandin I2 reseptörü, TP: Tromboksan A_2 reseptörü, FP: Prostaglandin F2 reseptörü, DP: Prostaglandin D2 reseptörü, VSMC: Vasküler düz kas hücreleri

Tablo 2. Siklooksijenaz (COX) izoformları ve ifadelendiği dokular (86)

COX İzoformu	İfade Edilen Doku	Lokalizasyon/Hücre Tipi
COX-1	Santral Sinir Sistemi	Endotel, Astrositler
	Periferik Sinir Sistemi	Periferik sinir tabakaları, sustentaküler hücreler
	Karaciğer	Kupffer hücreleri, inflamatuvar hücreler
	Kardiyovasküler sistem	Endokardiyum, Fibroblastlar, Kan damarları (endotel ve düz kas hücreleri)
	Böbrek	Toplayıcı kanallar endoteli, afferent arterioller, Bowman kapsülü
	Akciğer	Bronş ve bronşiyollerin düz kası, nöroendokrin hücreler, endotel hücreleri, inflamatuvar hücreler
	Diğer	Glandular epitel hücreleri (mide), Langerhans adacıkları (pankreas), Kırmızı ve beyaz pulpa (dalak), Endometrium (uterus)
COX-2	Karaciğer	Fagositler/granülositler, hepatositler, intrahepatik safra kanalı epitel hücreleri

	Kardiyovasküler sistem	Kardiyomiyositler, fibroblastlar
	Santral Sinir Sstemi	Nöronlar
	Periferik Sinir Sistemi	Gangliyon hücreleri
	Böbrek	Böbrek korteksi tubülleri, proksimal glomerüller hücreler, Bowman kapsülü
	Akciğer	Bronş ve bronşiyollerin düz kası ve nöroendokrin hücreler, endotel hücreleri, inflamatuvar hücreler
	Diğer	Glandular epitel hücreleri (mide), Langerhans adacıkları (pankreas), Kırmızı ve beyaz pulpa (dalak), Endometrium (uterus)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma, randomize kontrollü deneysel bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmada sıçanlarda endotoksemi modelinin oluşturulması için gerçekleştirilen hayvan deneyleri çalışmaları; Mart 2019-Temmuz 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Laboratuvar Hayvan Bilimleri Anabilim Dalı'na ait konvansiyonel hayvan laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri çalışmalarından elde edilen doku ve kan örneklerinden yapılan moleküler ve histolojik incelemeler; Ağustos 2019- Aralık 2019 tarihleri arasında İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı, DEÜTF Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Çalışma Materyali

Araştırmada, ağırlıkları 180-200 g arasında değişen 48 erkek Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, DEÜTF Laboratuvar Hayvan Bilimleri Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Sıçanlar, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda, 22±2 derecede, laboratuvar koşullarında barındırılmıştır. Sıçanlar, pleksiglas sıçan kafeslerine, bir kafeste en fazla iki sıçan olacak şekilde yerleştirilmiştir. Çalışma boyunca, sıçanların yem ve su erişimleri serbest bırakılmıştır. Deney süresince, hayvan hakları ile ilgili olarak "National Institute of Health (NIH)'in belirlediği kriterler (Principles of Laboratory Animal Care) esas alınmıştır.

Deneysel protokolün sonunda, sıçanlardan kan, dalak, karaciğer ve beyin dokuları alınmıştır. Alınan kan örnekleri, 4°C'de 10.000 g'de santrifüjlenerek serumları ayrılmış ve elde edilen serumlar DEÜTF Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda -80°C'de, saklanmıştır. Sıçanlardan alınan dalak dokuları; histolomorfolojik analizler için formaldehit içerisinde DEÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na iletilmiş; karaciğer ve beyin dokuları ise moleküler analizler için hızlı bir şekilde fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisinde

temizlenerek DEÜTF Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda -80°C'de saklanmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız Değişkenler: Kolin (90 mg/kg) ve Sitikolin (375 mg/kg) tedavileri

Bağımlı Değişkenler: Lipopolisakkarit enjeksiyonu (10 mg/kg) ile oluşan endotoksemi (histomorfolojik değerlendirmeler), sepsis skoru, sağ kalım analizi, COX-2 ve TNFα mRNA ekspresyonu, COX-2 protein ekspresyonu, TNFα, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, PGE_2, PGI_2, TXA_2 , kolin düzeyleri

3.6 Veri Toplama Araçları

Araştırma içerisinde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri aşağıdaki tablolarda yer almaktadır (Tablo 3 ve 4).

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Kod	Kullanım Amacı
Orbital Çalkalayıcı	Biosan/MR-1	ELISA ve Western blot inkübasyonlarının yapılması
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı	Biorad/CFXConnect	qRT-PCR deneylerinin yürütülmesi
Dikey Jel Elektroforez Sistemi	Biorad/Mini-Protean Tetra Gel	Western blot deneylerinin yürütülmesi
Spektrofotometre	Thermo Fischer/Multiskan	Kolorimetrik reaksiyonların (ELISA ve RNA konsantrasyonu ölçümü) absorbanslarının ölçümü
Western Blot Görüntüleme Sistemi	Vilber/Fusion FX	Western blot membranlarının görüntülenmesi

PCR Cihazı	Applied Biosystems/Veriti 9902	
Santrifüj	Sigma/3K30	Kan ve dokulardan örnek hazırlanması, RNA izolasyonu
Rotary Mikrotom	RM 2255, Leica,	Histomorfolojik inceleme kesitlerinin eldesi
Işık Mikroskobu	Olympus BX-51	Histomorfolojik inceleme kesitlerinin görüntülenmesi
Yüksek Çözünürlüklü Mikroskop Kamerası	Olympus DP-71, Japan	Histomorfolojik inceleme kesitlerinin dijital görüntülerinin eldesi

Tablo 4. Kullanılan sarf malzemeleri

Malzeme Adı	**Markası/Kod**	**Kullanım Amacı**
Lipopolisakkarit	Sigma Aldrich (L2880)	Endotoksemi modelinin oluşturulması
Kolin klorür	Sigma Aldrich (C7017)	Endotoksemi tedavisi
Sitikolin (Cytidine 5′-diphosphocholine sodium salt dihydrate)	Sigma Aldrich (C0256)	Endotoksemi tedavisi
Serum 6-keto-PGF$_{1\alpha}$ ELISA Kiti	Abnova KA0295	Serum PGI_2 metaboliti 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ seviyelerinin analizi
Serum PGE_2 ELISA Kiti	Cusabio CSB-E07967r	Serum PGE_2 seviyelerinin analizi
Serum TXA_2 ELISA Kiti	Elabscience E-EL-0057	Serum TXA_2 seviyelerinin analizi

Total Kolin/ACh Kiti	Biovision K615-100	Serumda ve beyin dokusunda total kolin düzey analizi
Serum TNFα ELISA Kiti	Invitrogen, BMS622	Serum TNFα düzey analizi
Protein tayin kiti	Thermo Fischer, 23225	Örneklerdeki protein miktarının belirlenmesi
RNA İzolasyon Kiti	Thermo Fischer/K0732	qRT-PCR analizleri için RNA eldesi
cDNA Sentez Kiti	ABM/G236	qRT-PCR analizleri için cDNA eldesi
PCR MasterMix	ABM/Mastermix-S	qRT-PCR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi
PVDF Membran	Thermo Fischer/88585	Western Blot analizlerinde proteinlerin transferi
Yağsız Süt Tozu	BioShop Canada/ SKI400.500	Western blot analizlerinde membranların bloklanması
Blotlama Kağıdı	Thermo Fischer/88605	Western Blot analizlerinde proteinlerin transferi
Kemilüminesans substrat	ThermoScientific 32132	Membran üzerindeki protein bantlarının görüntülenmesi
Anti-COX-2 Antikoru	Biossusa, bs-0732R,	Western Blot COX-2 protein analizi
Anti-beta aktin Antikoru	Biossusa, bs-0061R	Western Blot referans protein

Anti-Rabbit HRP Bağlı Sekonder Antikor	Jackson Immuno Research/111-035-045	Membrana bağlanan primer antikorların görüntülenmesi
Hematoksilen	01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire	Histomorfolojik inceleme
Eozin	01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire	Histomorfolojik inceleme
Entellan	UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany	Histomorfolojik inceleme

Araştırmada, Wistar türü erkek sıçanlarda, endotoksemi modeli subletal dozda (10 mg/kg) lipopolisakkarid (LPS, Escherichia coli O55:B5) enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. Endotoksemi oluşturulması için, LPS %0.9 sodyum klorür (%0,9 NaCl) (1mL) içinde çözünmüş ve model intraperitoneal (i.p) yolla tek uygulama ile oluşturulmuştur (87,88). Bu çalışmada, endotoksemi modelinde, kolin ve sitikolinin tedavi edici etkileri, 24 saatlik deneysel protokolde araştırılmıştır (72,89). Model oluşumunun doğrulanması için, sıçanların vücut ağırlıklarında bazale göre değişim (90), sepsis skoru (91) ve dalak dokusunun histomorfolojik görünümü (92) değerlendirilmiştir.

Çalışmada, sıçanlar dört gruba randomize edilmiştir:

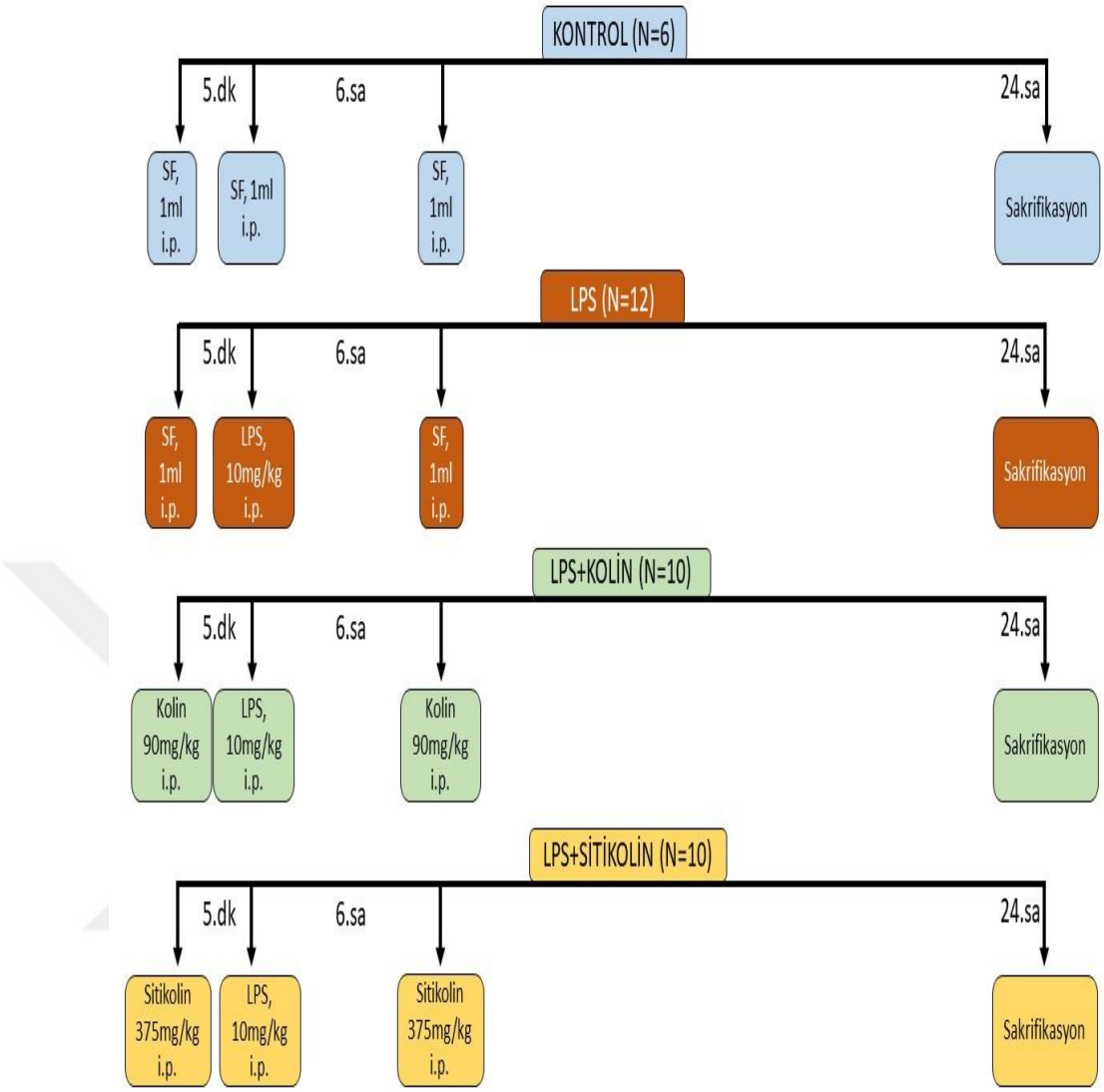
1. Kontrol grubu (K) (n=6)
2. Endotoksemi grubu (LPS) (n=12)
3. Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu (LPS+Kolin) (n=10)
4. Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu (LPS+Sitikolin) (n=10)

K ve LPS gruplarında; deney başlangıcında uygulanan %0,9 NaCl enjeksiyonlarından 5 dakika sonra sırasıyla; %0,9 NaCl ve 1 mg/kg LPS enjeksiyonları uygulanmıştır. Altıncı saatte ise her iki gruptaki sıçanlara %0,9 NaCl enjeksiyonları tekrarlanmıştır (Şekil 8).

LPS+ Kolin ve LPS+Sitikolin gruplarında deney başlangıcında sırasıyla 90 mg/kg kolin ve 375 mg/kg sitikolin enjeksiyonlarından 5 dakika sonra 1 mg/kg LPS enjeksiyonları uygulanmıştır. Altıncı saatte ise sırasıyla 90 mg/kg kolin ve 375 mg/kg sitikolin enjeksiyonları tekrarlanmıştır (Şekil 8).

Çalışmadan dışlama kriterleri

Deney başlangıcında tüm sıçanların sağlık durumları Deney Hayvanları birim yetkilisi tarafından kontrol edilmiştir. Tüm deney gruplarında, sıçanların vücut ağırlıklarında bazale göre değişim kaydedilmiştir. Kontrol grubundaki sıçanlarda, enfeksiyon gelişimi, kilo kaybı varlığı gibi sıçanın sağlık durumunda bozulmalar olanlar ve sepsis grubundaki sıçanlarda da sepsis skorlamasına göre sepsis gelişmeyen sıçanlar çalışmaya dahil edilmemiştir.



Şekil 8. Deney grupları ve Protokol Akış Şeması

SF: Serum Fizyolojik (%0.9 NaCl), i.p.: intraperitoneal, LPS: Lipopolisakkarit

3.6.1 Kontrol grubu

Sıçanlara %0,9 NaCl (1ml) enjeksiyonundan 5 dakika sonra 1 mL %0,9 NaCl uygulanmıştır. Altıncı saatte ikinci kez %0,9 NaCl (1 ml) uygulanmıştır. Dekapitasyon yöntemi 24. saatte sakrifiye edilen sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınmıştır.

Sıçanlara %0,9 NaCl (1 ml; i.p) enjeksiyonundan 5 dakika sonra 1 mL %0,9 NaCl uygulanmıştır. Altıncı saatte ikinci kez %0,9 NaCl (1 ml) uygulanmıştır.

Dekapitasyon yöntemi ile 24. saatte sakrifiye edilen sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınarak analize dek -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.6.2 Endotoksemi grubu (LPS)

Sıçanlara %0,9 NaCl (1 ml/kg; i.p) enjeksiyonundan 5 dakika sonra LPS enjeksiyonu (10 mg/kg) uygulanmıştır. Altıncı saatte ikinci kez %0,9 NaCl enjeksiyonu uygulanmıştır. Dekapitasyon yöntemi 24. saatte sakrifiye edilen sıçanlardan kan ve doku örnekleri alınmıştır.

3.6.3 Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu (LPS+Kolin)

Sıçanlara 90 mg/kg kolin enjeksiyonundan 5 dakika sonra LPS enjeksiyonu (10 mg/kg) uygulanmıştır. LPS' ten sonra 6.saatte ikinci doz kolin enjeksiyonu uygulanan sıçanlar 24. saatte dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek daha sonra yapılacak ölçümler için kan ve doku örnekleri alınmıştır.

3.6.4 Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu (LPS+Sitikolin)

Sıçanlara 375 mg/kg sitikolin enjeksiyonundan 5 dakika sonra LPS enjeksiyonu (10 mg/kg) uygulanmıştır. LPS'den sonra 6.saatte ikinci doz sitikolin enjeksiyonu uygulanan sıçanlar 24. saatte dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek daha sonra yapılacak ölçümler için kan ve doku örnekleri alınmıştır.

Tüm gruplarda,

- Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal (i.p.) olarak 1 mL hacim içerisinde uygulanmıştır.
- LPS, kolin ve sitikolin %0,9 NaCl içerisinde çözülmüştür.
- Deney başlangıcında ve 24. saat sonunda sakrifikasyon öncesi sıçanların vücut ağırlıkları ölçülmüştür.
- Sepsis varlığını doğrulamak için, deney başlangıcında, 6. ve 24. saatlerde tüm sıçanların genel durumları, iki araştırmacı tarafından kör olarak skorlanarak

sepsis skoru ortalaması alınmıştır. Aynı zaman dilimlerinde sıçanların rektal vücut sıcaklıkları da ölçülmüştür.

- Sağkalım analizi için, sıçanların ölüm saatleri ilk 6 saat içerisinde ve 6-24 saat arasında olmak üzere kaydedilmiştir.

- Dekapitasyon (sıçan boynunun giyotin yardımı ile aniden kesilmesi) yöntemi ile sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen kan örnekleri 4°C'de 10.000 g'de santrifüjlenerek serum elde edilmiş ve analize dek -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

- Sakrifiye edilen sıçanlardan, karaciğer, beyin ve dalak dokuları alınmıştır. Kafatası içerisinden kostatom yardımı ile bir bütün olarak elde edilen beyin dokusu öncelikle ön beyin, orta beyin ve arka beyin olarak 3 parçaya ayrılmıştır. Ardından orta beyin içerisinden steril bistüri yardımı ile hipotalamusu barındıran beyin dokusu eksize edilmiştir (93) (Şekil 9, 10).

- Karaciğer ve beyin dokuları; fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS (1 ml) (NaCl 8,0 g/l; KCl 0,2 g/l; Na_2HPO_4 1,4 g/l and KH_2PO_4 0,2 g/l; pH 7.4)) içerisinde temizlendikten sonra yine PBS (1 ml) içerisinde ultrasonik homojenizatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası hücre debrisi santrifüj ile ayrıştırılmış ardından analize dek -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.
- Dalak dokusu PBS içerisinde temizlenerek histomorfolojik değerlendirmeler için formalin (%10) içerisine alınmıştır.



Şekil 9. Beyin dokusunun kosatatom yardımı ile total eksizyonu



Şekil 10. Total Eksizyonu Gerçekleştirilen Beyin Dokusunun Görüntüsü

3.6.5.1. Endotoksemide vücut ağırlığında değişim

Kontrol, endotoksemi ve tedavi gruplarındaki vücut ağırlığındaki değişimin hesaplanması için; hassas terazi ile deney başlamadan önce (bazal) alınan ölçüm değerleri ve 24. saatte sakrifikasyon öncesi alınan ölçüm değerleri arasındaki fark hesaplanmıştır. Ölçümler sonucunda ağırlık kaybı gram olarak gösterilmiştir (Δg).

3.6.5.2. Sıçanlarda sepsis skorlaması ve vücut sıcaklığı ölçümü

Sepsis skorlaması; sıçanların dış görünümü, bilinç düzeyi, hareketi, ağrılı uyarana yanıtı, gözlerin açıklığı, solunum hızı ve solunum şekli olacak şekilde 7 farklı parametrenin 4 üzerinden puanlanması ile gerçekleştirilmiştir. İki farklı araştırmacı tarafından kör olarak yapılan skorlama ortalamalarına göre protokol sonundaki (24. saatte) toplam değerin 20-25 arasında olması sepsis gelişiminin göstergesi olarak kabul edilmiştir (91) (Tablo 5, Şekil 11).

Tablo 5. Sepsis skorlaması

Görünüm	Puan
Değişiklik yok	0
Tüyleri kısmen dikleşmiş	1
Tüylerin çoğunluğu dikleşmiş	2
Tüylerde dikleşme tam olarak belirgin değil; tüyler kabarık	3
Tüylerde dikleşme tam olarak belirgin değil; hayvan zayıflamış görünüyor	4
Bilinç Düzeyi	
Aktif	0
Aktif ancak ayakları üzerinde durmuyor	1
Aktivite yavaşlamış ancak hala hareket edebilir durumda	2
Aktivite yavaşlamış, yalnızca uyaran ile hareket ediyor ve hareketlerinde titreme var	3
Aktivite ciddi oranda yavaşlamış, uyaran olsa da sabit kalıyor ve hareketlerinde titreme olabilir	4
Hareket	
Normal düzeyde; beslenme, tırmanış vb hareketler normal	0
Hareketlerde çok az düzeyde azalma var; kafes içinde hareket edebiliyor	1
Azalmış aktivite; yalnızca ara sıra kafes içinde arama/araştırma hareketleri	2
Hareketsiz; sabit	3
Hareketsiz; özellikle alt ayak kısmında titreme	4
Uyarana yanıt	
Dokunma ve sesli uyarana anında yanıt ve kaçma	0
Sesli uyarana yavaş yanıt veya yanıt vermeme; dokunmaya ise güçlü yanıt ve kaçmaya çalışma	1

Sesli uyarana yavaş yanıt vermeme; dokunmaya ise orta düzeyde yanıt ve yalnızca birkaç adım uzaklaşma	2
Sesli uyarana yavaş yanıt vermeme; dokunmaya ise düşük düzeyde yanıt vererek hareketsiz kalma	3
Sesli uyarana ve dokunmaya yanıt vermeme; düşürüldüğünde ayağa kalkamama	4
Gözler	
Açık	0
Olası sekresyona bağlı olarak gözlerin tam açık olmaması	1
Olası sekresyona bağlı olarak gözlerin yarı kapalı olması	2
Olası sekresyona bağlı olarak gözlerin yarıdan fazla kapalı olması	3
Gözlerin sekresyon ile beraber kapalı olması	4
Solunum hızı	
Normal hızlı	0
Gözle sayılamayacak şekilde ancak düşük düzeyde azalmış respirasyon hızı	1
Gözle sayılabilen orta düzeyde azalmış respirasyon hızı	2
Kolaylıkla sayılabilen ciddi düzeyde azalmış respirasyon hızı (0.5 saniye aralıklarla)	3
Aşırı düzeyde azalmış respirasyon hızı (1 saniyeden uzun aralıklarla)	4
Solunum şekli	
Normal	0
Kısa ve zorlanmış şekilde solunum	1
Zorlanmış şekilde ama nefes nefese değil	2
Aralıklı nefes nefese kalarak ve zorlanarak	3
Nefes nefese	4



Şekil 11. Endotoksemi grubuna ait bir sıçan

Vücut sıcaklığı takibinde ise, deney başlangıcında (bazal), 6. ve 24. saatlerde dijital termometre (Weewell, WTD105) ile rektal yoldan alınan ölçümler kaydedilmiştir.

3.6.5.3 Histomorfolojik analizler

Dalak dokusundan alınan kesitlerde histomorfolojik inceleme gerçekleştirilmiştir.

Histomorfolojik değerlendirme

Tüm deney gruplarına ait dalak dokuları %10' luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 3 gün süreyle tespit edilerek doku takibi başlatılmıştır. Tespit maddesinin uzaklaştırılması için 1 gece akarsu altında yıkama gerçekleştirilmiştir. Ardından artan etil alkol (%70-%96) muameleri 60˚C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem 4 kez aseton muamelesi için tekrar edilmiş ardından 2 kez ksilol muamelesi 60˚C'de 30 dakika şeffaflandırma amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından 60°C'de 1 saat parafin immersiyonu toplamda 2 kez gerçekleştirilerek doku parafin bloklar içerisine gömülmüştür. Parafin bloklar içerisinden 5 µm'lik doku kesitleri rotary mikrotom (RM 2255, Leica, Germany) ile alınmıştır.

Kesitler iki saat süresince 60˚C etüvde deparafinizasyon işlemi için bırakılmıştır. Daha sonra aynı sıcaklıkta toplamda 40 dakika süren üç farklı ksilene muamelesine tabii tutulmuştur. Rehidratasyon için ise 2 kez absolüt alkol ve azalan alkol serilerinden (%96-%70) geçirilmiştir. Kesitlerin distile su ile yıkanmasının ardından 10 dakika süresince Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyanmıştır. Sürenin sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması için kesitler 10 dakika yıkanmış ardından 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyanmıştır. Boyamadan sonra alkol serilerinden (%70-%99) geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla ksilene maruz bırakılmış ardından entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır.

Kesitlerden elde edilen görüntüler bilgisayarlı video kamera esaslı sistem ile elde edilmiştir (UTHSC Image software). Tüm kesitlerin analizinde yalnızca boyamaya bağlı belirgin artefaktları olan kesitler değerlendirmeye alınmamıştır. Boyama

sonrasında kesitler ışık mikroskobunda (Olympus BX-51 Tokyo, Japan) incelenerek, görüntüler yüksek çözünürlüğe sahip kamera ile (Olympus DP-71, Japan) dijital olarak fotoğraflanmıştır.

Deney gruplarına ait dalak dokularından alınan kesitlerde ışık mikroskobu ile inflamasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve hemorajik değişimler dikkate alınarak skorlama yapılmıştır. Değerlendirmeler kör olarak iki farklı histolog tarafından yapılmıştır. Belirlenen skorlama değerleri ortalama ve standart hata olarak gösterilmiştir (92).

Skorlama

(0) Normal
(1) Hafif düzeyde hasar
(2) Orta düzeyde hasar
(3) Ciddi düzeyde hasar

3.6.5.4. Biyokimyasal ve moleküler analizler

Biyokimyasal ve moleküler analizler, alınan kandan ayrılan serum ve doku homojenatlarından gerçekleştirilmiştir.

3.6.5.5. Serum 6-keto-PGF$_{1\alpha}$, Prostaglandin E$_2$, Tromboksan A$_2$, TNFα ve kolin analizleri

Serum 6-keto-PGF1α (Abnova KA0295), Prostaglandin E_2 (Cusabio CSB-E07967r), Tromboksan A_2 (Elabscience E-EL-0057), TNFα (Invitrogen, BMS622) ile serum ve beyin kolin (Biovision K615-100) düzey ölçümleri ilgili kitlerin içindeki talimatlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Alınan örneklerden yapılan ölçüm parametrelerinin dağılımı

Parametre	**Analizin yapıldığı doku ve bölgeler**
6-keto-$PGF_{1\alpha}$ ELISA	Serum, karaciğer ve orta beyin
Prostaglandin E_2 ELISA	Serum, karaciğer ve orta beyin
Tromboksan A_2 ELISA	Serum, karaciğer ve orta beyin
TNFα ELISA	Serum
Total kolin düzeyleri	Serum ve orta beyin
COX-2 mRNA düzeyleri	Karaciğer ve orta beyin
COX-2 protein düzeyleri	Karaciğer ve orta beyin

3.6.5.5.1. 6-keto-PGF1α analizi

6-keto-$PGF_{1\alpha}$ analizi için, antikor kaplı 96 kuyucuklu plaklar üzerine seyreltilmiş örnekler ve kit standartları 100 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Ardından kuyucuklara 50 µl konjugat ve 50 µl antikor eklenmiştir. Plakların üzeri kapatılarak 2 saat boyunca oda sıcaklığında 500 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı dökülerek 400 µl yıkama tamponu ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 200 µl substrat solüsyonu eklenerek üstü kapalı olarak 45 dakika oda sıcaklığında çalkalama olmaksızın inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonrasında 50 µl stop solüsyonu 405 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3.6.5.5.2. Prostaglandin E_2 analizi

Prostaglandin E_2 analizi için, antikor kaplı 96 kuyucuklu plaklar üzerine seyreltilmiş örnekler ve kit standartları 50 µl uygulanmıştır. Ardından kuyucuklara 50 µl konjugat ve 50 µl antikor eklenmiştir. Plakların üzeri kapatılarak 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı dökülerek 200 µl yıkama tamponu ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 50 µl substrat A ve B solüsyonları eklenerek üstü kapalı olarak 37°C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe

edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 50 µl stop solüsyonu 450 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3.6.5.5.3. Tromboksan A_2 analizi

Tromboksan A_2 analizi için, antikor kaplı 96 kuyucuklu plaklar üzerine seyreltilmiş örnekler ve kit standartları 50 µl uygulanmıştır. Ardından kuyucuklara 50 µl antikor eklenmiştir. Plakların üzeri kapatılarak 45 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı dökülerek 350 µl yıkama tamponu ile 3 kere yıkanmıştır. Ardından kuyucuklara 100 µl yaban turpu peroksidazı (HRP)-konjugatı eklenerek 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı dökülerek 350 µl yıkama tamponu ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 90 µl substrat eklenerek üstü kapalı olarak 37°C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonrasında 50 µl stop solüsyonu eklenerek 450 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3.6.5.5.4. TNFα analizi

TNFα analizi için antikor kaplı 96 kuyucuklu plaklar üzerine seyreltilmiş örnekler ve kit standartları 100 µl uygulanmıştır. Ardından kuyucuklara 50 µl biotin-konjugat eklenmiştir. Plakların üzeri kapatılarak 2 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı dökülerek 400 µl yıkama tamponu ile 3 kere yıkanmıştır. Ardından kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı dökülerek 400 µl yıkama tamponu ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 100 µl substrat eklenerek üstü kapalı olarak oda ısısında 10 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonrasında 100 µl stop solüsyonu ile 450 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3.6.5.6. TNFα ve COX-2 genlerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Karaciğer ve beyin dokularından total RNA izolasyonu ticari kit ile gerçekleştirilmiştir (Thermo Scientific, K0731). 30 mg doku tartılarak 1 ml soğuk PBS ile buzda 30 saniye boyunca homojenizatör yardımıyla dokular parçalanmıştır. Üzerine 600 µl Proteinaz K eklenerek vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dakika

inkübe edilmiştir. 12.000 g'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra çökelti atılmış; süpernatant ise yeni DNAaz RNAaz içermeyen steril tüplere aktarılmıştır. Süpernatantlara 450 µl absolut etanol eklenmiştir. Ardından örnekler 700 µl olacak şekilde kolonlara aktarılarak yüksek hızda (12.000 g) 1 dakika santrifüjlenmiş ve kolonun alt kısmına geçen sıvı uzaklaştırılmıştır. Ardından kolonlar üzerine 700 µl yıkama tamponu-1 eklenerek yüksek hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Kolonun alt kısmına geçen sıvı atıldıktan sonra kolonlara 600 µl yıkama tamponu-2 eklenerek yüksek hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Aynı işlem kolona 250 µl yıkama tamponu-2 eklenerek tekrar edilmiş ve yüksek hızda 2 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından kolonlar 1.5 mL'lik steril tüplere aktarılmıştır. Kolonların ortasında bulunan filtre kısmına 100 µl DNAaz RNAaz içermeyen steril su eklenip yüksek hızda 1 dakika santrifüjlenmiş ve kolona bağlanan RNA elde edilmiştir. RNA miktarı (µg/µL) ve izolasyon verimi spektrofotometrik ölçüm yöntemi ile A260/A280/A230 absorbans oranları ile hesaplanarak belirlenmiştir. Elde edilen RNA -80ºC'de saklanmıştır.

Tüm örneklerdeki 1 µg RNA miktarı hesaplanarak total RNA miktarları eşitlenmiş ve cDNA sentezi için kullanılmıştır (ABM, G236). Kit içeriğinde bulunan 4 µl reverse transkripsiyon (RT) Tamponu, 1 µl dNTP, 1 µl Oligo(dT), 1 µl OneScript Plus RTase ve 1 µg RNA karıştırılarak DNAaz RNAaz içermeyen steril su ile toplam reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım pipet yardımı ile karıştırılarak termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. cDNA reaksiyonu 55ºC'de 15 dakika ve 85ºC'de 5 dakika olacak şekilde tamamlanmıştır. Elde edilen örnekler buzda soğutularak -20ºC'de saklanmıştır.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için, 96 kuyulu PCR plakasına 10 µl 2X MasterMix (ABM, MasterMix-S), 1µl cDNA, 1.5 µl ilgili genin Forward-Reverse primer karışımı eklenerek reaksiyon hacmi steril su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. 96 kuyucuklu PCR plakasının üstü yapıştırma filmi ile kapatılarak cihaza yerleştirilmiştir. COX-2 ve TNFα genine uygun ileri ve geri primerler ile ilgili gen bölgesi RT-PCR cihazı (Biorad CFXconnect) kullanılarak amplifiye edilmiştir. COX-2, TNFα ve beta-aktin (β-aktin) forward ve reverse primer dizileri ilgili tabloda yer almaktadır (Tablo 7).

Tablo 7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için ilgili genlerin forward ve reverse sekansları

Hedef Gen	Forward Sekans (5'→3')	Reverse Sekans (5'→3')
COX-2	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
TNFα	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
β-aktin	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA

Reaksiyon basamakları; 95ºC'de 10 dakika polimeraz aktivasyon/denatürasyonu ardından 95ºC'de 15 saniye; amplifikasyon aşamasında ise COX-2 ve β-aktin için 55ºC'de 60 saniye, TNFα için 56ºC'de 60 saniye (40 döngü); dissosiyasyon aşamasında 65ºC'den başlayarak 95ºC'ye 5 saniyede 0.5ºC'lik artıştır. Genin normalizasyonu için pozitif kontrol olarak β-aktin kullanılmış ve C_q değerleri ile gen ifadelenmesinin değişimi $-2^{\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanmıştır (94).

3.6.5.7. Western Blot Yöntemi ile COX-2 protein analizi

Karaciğer ve beyin dokuları (30 mg) 1 mL soğuk PBS içerisinde homojenize edilmiş ardından yüksek hızda santrifüjlenerek debris ayrıştırılmıştır. Üst faz (süpernatant) ise steril bir tüpe alınarak üzerine 1:1 oranında proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren ripa solüsyonu eklenmiştir. Ardından -80ºC derin dondurucu kullanılarak dondur-çöz işlemine tabi tutulmuşlardır. Çözünmesi takibinde 15 saniye boyunca yüksek hızda vortekslenmiş ve buzda tutulmuşlardır. Bu işlem toplamda 5 döngü olacak şekilde tekrar edilmiştir. Örnekler 10.000 g'de 30 dakika +4ºC'de santrifüjlenmiş ve supernatant protein tayini için kullanılmıştır.

Protein tayini ticari kit (Thermo Fischer, 23225) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler ve standartlar iki tekrarlı çalışılmıştır. Kit içerisinde temin edilen ve protokole uygun seyreltilen standartlar sığır serum albümini içermektedir (2 mg/mL). Hazırlanan karaciğer ve beyin örnekleri 20 kat seyreltilerek 96 kuyuculuklu plakalara 25 µl pipetlenmiştir. Tüm standartlar ve örnekler üzerine Reaktif A ve Reaktif B karışımı (50:1 oranında) ile hazırlanan çalışma reaktifi 200 µl eklenmiştir. 96 kuyucuklu plaka

kapağı kapatılarak 37ºC'de 30 dakika inkübe edilmiş ardından spektrofotometre cihazı ile 562 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Standartların absorbans değerlerinden oluşturulan standart grafikten örneklerdeki protein miktarları belirlenmiştir. Tüm örneklerden elde edilen 40 µg protein ile 4X yükleme tamponu (1:3 oranında) ve beta merkaptoetanol (%2.5 oranında) karıştırılmış ve 95ºC'de 10 dakika ısıtılarak Western blot analizinde kullanılacak protein lizatları hazırlanmıştır.

Western blot analizinde kullanılacak tamponların tamamı konsantre (10X) olarak hazırlanmış ve 1X olacak şekilde distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

- **10X Yürütme Tamponu:** 30 gram Tris base, 144 gram glisin, 10 gram sodyum dodesil sülfat (SDS) tartılarak 1L distile suda çözülmüş ve oda ısısında saklanmıştır.
- **10X Transfer Tamponu:** 30.3 gram Tris base, 144.2 gram glisin tartılarak 1 L distile suda çözülmüştür. 1X kosantrasyona seyreltilmesi için 80 mL 10X transfer tamponu, 200 mL metanol ve 720 mL distile su ile karıştırılmış (pH: 8,3) ve 4ºC'de saklanmıştır.
- **10X Tris-Tamponlu Salin (TBS):** 30 gram Tris ve 88 gram NaCl tartılarak 1 L distile suda çözünmüş (pH: 7.6) ve oda ısısında saklanmıştır. Bloklama ve yıkama tamponu hazırlamak için kullanılmıştır.
- **1X Tris-Tamponlu Salin-Tween 20 (TBST):** 100 mL 10X tris-tamponlu salin, 900 mL distile su 1X konsantrasyon olacak şekilde seyreltilmiş ve karışıma 1 mL Tween 20 eklenmiştir. Bloklama tamponu hazırlamak için ve yıkama tamponu olarak kullanılmıştır.
- **Yağsız Süt Tozu (%5):** 5 gram yağsız süt tozu tartılarak 100 mL TBST ile çözülmüştür. Karışım antikor hazırlanması ve bloklama tamponu olarak kullanılmıştır.
- **Sodyum dodesil sülfat (SDS, %20):** 10 gram SDS 50 mL distile suda çözülmüş ve poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
- **Amonyum persülfat (APS, %10):** 1 gram APS 5 mL distile suda çözülmüş ve -20ºC'de saklanmıştır. Poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

- **1 M Tris Tamponu (pH: 6.8):** 6 gram Tris 80 mL distile suda çözülmüş ve poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılmıştır
- **1.5 M Tris Tamponu (pH: 8.8):** 18 gram Tris 80 mL distile suda çözülmüş ve poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılmıştır

Araştırılan proteinlerin moleküler ağırlıklarına (COX-2: 70 kDa ve referans protein β-aktin: 55 kDa) uygun olacak şekilde ayrım (seperating) jelinin yüzdesi %12.5; paketleme (stacking) jeli yüzdesi ise %5 olarak seçilmiştir.

Poliakrilamid jeller 1.0 mm cam plakalar ve 10 kuyucuklu taraklar kullanılarak hazırlanmıştır. Standa yerleştirilen 1.0 mm cam plakaların düzgün yerleşimi ve sızdırmazlığı distile su ile kontrol edilmiştir. Kontrol sonrasında ilk olarak ayrım jeli hazırlanmıştır. Ayrım jeli için; 6.27 mL distile su, 4.68 mL %40'lık akrilamid/bisakrilamid, 3.75 mL 1.5 M Tris Tamponu, 150 µl SDS manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ardından bu karışıma jelleşmenin sağlanması amacıyla 150 µl APS ve 15 µl N,N,N,N′-Tetrametil etilendiamin (TEMED) eklenmiştir. Bu karışım hızla yerleştirilen 1.0 mm'lik camlar arasına 5 mL'lik serolojik pipet yardımı ile dökülmüş ve üzerine camlar üzerini tamamen dolduracak kadar izopropanol eklenmiştir. Jelleşme tamamlandıktan sonra izopropanol peçete ile uzaklaştırılmıştır. Ardından ayrım jeli üzerine dökülmek üzere paketleme jeli hazırlanmıştır. Paketleme jeli için; 4.38 mL distile su, 4.38 ml %40'lık akrilamid/bisakrilamid, 750 µl 1 M Tris Tamponu, 60 µl SDS manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ardından jelleşmenin sağlanması için karışıma 60 µl %10'luk APS ve 6 µl TEMED eklenmiştir. Bu karışım hızla camlar arasına 5 mL'lik serolojik pipet yardımı ile dökülmüş ve üzerine 10 kuyucuklu taraklar yerleştirilmiştir. Jelleşme tamalanıncaya kadar camlar stand içerisinde tutulmuştur. Jelleşme tamamlandığında camlar stanttan alınarak yürütme tankına yerleştirilmiştir.

Jellerin tanka alınmasının ardından yürütme tankı yürütme tamponu (1X) ile doldurulmuştur. Protein miktarları eşit olacak şekilde (40 µg) hazırlanan Western blot protein lizatları tüm kuyulara yüklenmiştir.

Western Blot Protokolü

Jellerin tanka alınmasının ardından yürütme tankı yürütme tamponu (1X) ile tank üzerinde belirtilen çizgiye kadar doldurulmuştur. Protein miktarları eşit olacak şekilde (40 µg) hazırlanan Western blot protein lizatları tüm kuyulara yüklenmiştir. Molekül ağırlıkları bilinen ve görsel takibi sağlayan protein belirteci ilk kuyuya 5 µL hacminde yüklenmiştir. Yürütme aşaması sabit voltajda 15 dakika 70 Volt (V) ardından 90 dakika 110 V olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Protein belirteci bu aşamada takip edilerek protein ayrışması gerçekleştiğinde sistem durdurulmuştur. Protein ayrışması gerçekleşen jeller tanktan çıkarılarak buzdolabında soğutulmuş transfer tamponu (1X) içeren derin bir kap içerisine alınmıştır.

Jelde yürütülen proteinlerin poliviniliden florür (PVDF) membrana transferi ıslak transfer yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Transfer öncesinde PVDF membran 5 dakika metanol ile aktive edilmiş ardından transfer tamponu içeren derin kaba alınmıştır. Jeller tranfer tamponu içerisinde camlar arasından çıkarılmıştır. Blotlama kağıtları ve süngerler transfer tamponu içeren aynı kap içerisinde ıslatılmıştır. Transfer paketi sırasıyla sünger-blotlama kağıdı-jel-membran-blotlama kağıdı-sünger olacak şekilde hazırlanmış ve kaset içerisine yerleştirilmiştir. Kasetler buzdolabında soğutulmuş transfer tamponu (1X) ile doldurulan tank içerisine alınmış ve tanka buz aküsü yerleştirilmiştir. Transfer sabit akımda 250 mA'de 90 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Protein transferi gerçekleşen membranlar 1X TBST ile 5 dakika yıkanmıştır. Ardından membranlar yağsız süt tozu (%5) ile 1 saat süresince orbital çalkalayıcıda bloklanmıştır. Bloklama sonrasında süt tozu atılarak membranlar üzerine ilgili primer antikoru içeren süt tozu çözeltisi eklenmiş ve gece boyu orbital çalkalayıcıda 4ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. Primer antikor muamelesinin ardından membranlar toplamda 3 kez TBST (1X) ile 5 dakika orbital çalkalayıcıda yıkanmıştır. Yıkama sonrasında membranlar HRP-bağlı sekonder antikoru içeren süt tozu çözeltisi ile muamele edilmiş ve orbital çalkalayıcıda 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Sekonder antikor muamelesinin ardından membranlar toplamda 3 kez TBST (1X) ile 5 dakika orbital çalkalayıcıda yıkanmış ve görüntüleme aşamasına kadar TBST (1X) içerisinde tutulmuştur. Görüntüleme, 1:1 oranında iki reaktifin karıştırılması ile

kullanılan kemilüminesans substrat (ECL) kiti ile gerçekleştirilmiştir (ThermoScientific 32132). ECL kit reaktif karışımı membranlara 1 mL olarak uygulanmış ve uygulama sonrasında 5 dakika inkübe edilmiştir. Blot görüntüleme cihazında ilgili bantların görüntüleri alınarak bant yoğunluğu analiz edilmiştir (Image J, National Institutes of Health).

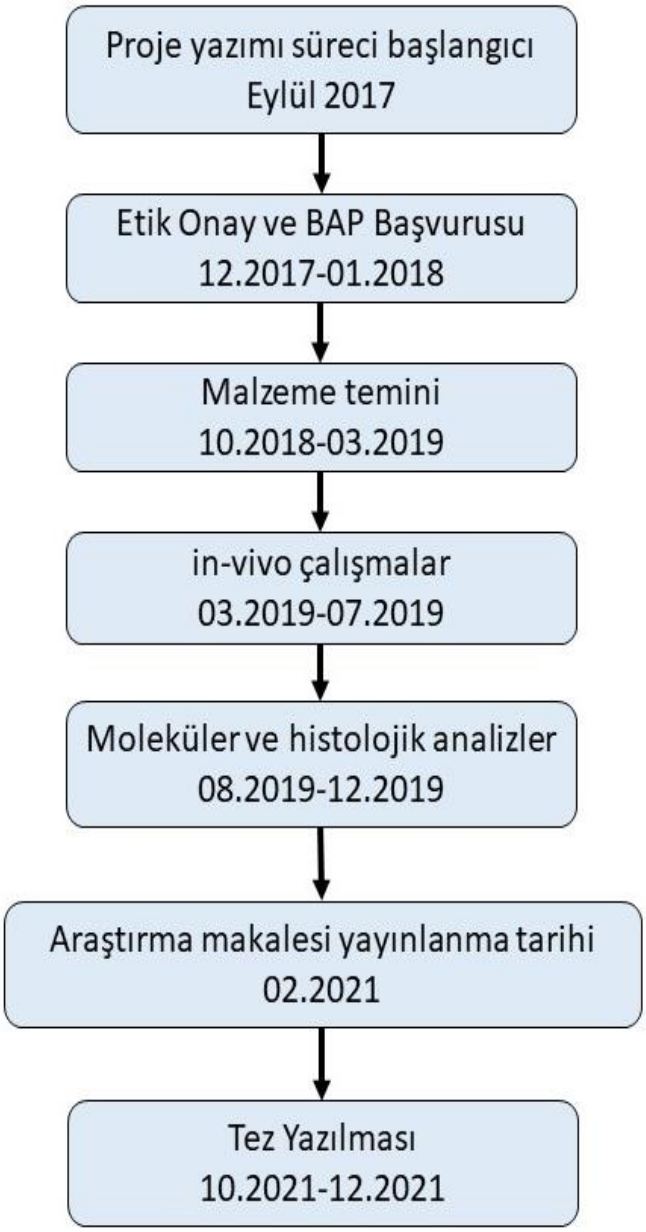
3.6.5.8. Kolin analizi

Kolin analizi için, 96 kuyucuklu plak üzerine seyreltilmiş örnekler ve kit standartları 50 µl uygulanmıştır. Ardından kuyucuklara 50 µl reaksiyon karışımı (içeriğinde; kolin kit çözeltisi, enzim karışımı, kolin probu) eklenerek üstü kapalı olarak oda ısısında 30 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonrasında 570 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Tüm kitlerde standartlara ait absorbans değerlerinden standart grafiği çizilmiş ve örneklerde bulunan ilgili protein miktarı hesaplanmıştır. Hesaplamada dilüsyon faktörü de çarpıma eklenmiştir.

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırma takvimi akış şeması şeklinde aşağıda gösterilmektedir (Şekil 12).



Şekil 12. Araştırma takvimi

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizde; vücut ağırlığı, parametrik koşulların sağlanması durumunda gruplar arası karşılaştırmalarda varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak yapılmıştır. Parametrik şartlarda veriler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. Verilerin parametrik şartları sağlamaması durumunda, sepsis skoru, histomorfolojik değerlendirmeler gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis ve Mann Whitney-U, post-hoc test olarak ise Dunn's multiple comparision test kullanılmıştır. Sağkalım log-rank (Mantel-Cox) testi ile analiz edilmiştir. Araştırmada veriler GraphPad (GraphPad Prism 5, La Jolla, USA) istatistik programı ile analiz edilmiştir. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmanın sınırlılıkları;

- Serum prostaglandin düzeyleri analizi yapılmış ancak doku prostaglandin düzeyleri kullanılan ELISA kitlerinin ölçüm sınırları yeterli olmadığı için analiz edilememiştir.
- Kullanılan endotoksemi modelinde subletal doz (10 mg/kg) LPS kullanıldığından kullanılan konsantrasyonda, tedavi uygulanmayan endotoksemi grubunda mortalite oranı oldukça yüksektir. Bu nedenle protokol süresi 24 saat olarak planlanmıştır.
- Kolin ve sitikolinin endotoksemi üzerinde olumlu etkisi gösterilebilmiş ancak bütçe kısıtlılığı nedeni ile bu olumlu etkide kolinerjik reseptörlerin rolü araştırılamamıştır.

3.10 Etik Kurul Onayı

"**Sıçanlarda Lipopolisakkarid ile Oluşturulan İnflamatuvar Yanıta Sitikolin ve Kolinin Araşidonik Asit Yolak Aracılı Etkisi**" isimli araştırmamız için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) 51/2017 protokol numarası ile onay alınmıştır (Ek 1).

4. BULGULAR

Deney başlangıcında tüm sıçanların sağlık durumları Deney Hayvanları birim yetkilisi tarafından kontrol edilmiştir. Tüm sıçanların çalışmada belirlenen dışlama kriterlerine uygun olma durumu araştırmacılar tarafından incelenerek çalışma öncesinde yaralanma bulguları olan 2 sıçan çalışmadan dışlanmıştır.

4.1 Endotoksemi gelişimi takip verileri

4.1.1 Sağkalım Analizi

Tüm gruplarda protokol süresince 6. saat ve 24. saatlerde sağkalım durumu takip edilmiştir. Kontrol grubunda 24 saatlik çalışma protokolü süresi içerisinde ölüm gözlenmemiştir. LPS grubunda (n=12) 6.saatte ve 24. saatte sağkalım yüzdeleri kontrol grubuna (n=6) göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$). LPS ve kontrol gruplarına göre LPS+Sitikolin (n=10) ve LPS+Kolin (n=10) gruplarında sağkalım yüzdesinde farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$, Tablo 8).

Tablo 8. Deney gruplarında protokol süresince sağkalım oranlarının yüzde olarak gösterimi

Zaman	Kontrol (n=6)	LPS (n=12)	LPS+Sitikolin (n=10)	LPS+Kolin (n=10)
6.saat	%100	%41,6*	%80	%80
24.saat	%100	%33,3**	%50	%60

Veriler Ortalama±Standart sapma olarak gösterilmektedir.

(*) $p<0.05$; (**) $p<0.01$ kontrol grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.1.2 Ağırlık Ortalamaları ve Ağırlık Değişimi Ortalamaları

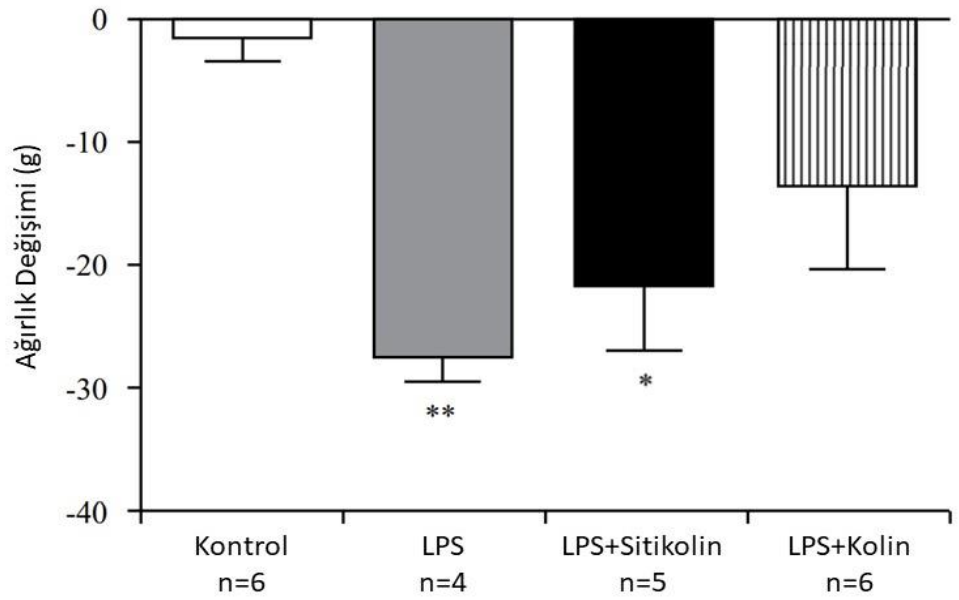
Deney gruplarına randomize edilen sıçanların bazal ağırlık ortalamaları arasında farklılık saptanmamıştır. (Tablo 9). Vücut ağırlığındaki değişim, LPS grubunda 27.4±2,1 g, LPS+Sitikolin grubunda 21,7±5,2 g ve LPS+Kolin grubunda ise -13,6±6,7 g olarak kaydedilmiştir. LPS ve LPS+Sitikolin gruplarında tespit edilen ağırlık kaybı (Δg) kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksektir (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,05$, Şekil

13). LPS+Kolin grubunda tespit edilen ağırlık kaybında (Δg) kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 9. Deney gruplarında protokol süresince ölçülen vücut ağırlıkları ve vücut ağırlıklarındaki değişim ortalamaları

Gruplar	Bazal vücut ağırlığı (g)	24. saat vücut ağırlığı (g)	Vücut ağırlığındaki değişim (Δg)
Kontrol	195,7 ±2,2 (n=6)	194,2 ±2,4 (n=6)	-1,5 ±2,0 (n=6)
LPS	182,1 ±7,3 (n=12)	154,8 ±8,3 (n=5)	-27,4 ±2,1 (n=4)
LPS+Sitikolin	195 ±7,9 (n=10)	173,3 ±4,2 (n=8)	-21,7 ±5,2 (n=5)
LPS+Kolin	187,3 ±6,9 (n=10)	173,7 ±8,9 (n=8)	-13,6 ±6,7 (n=6)

Veriler Ortalama±Standart sapma olarak gösterilmektedir.



Şekil 13. Deney gruplarında Ağırlık Değişimi (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (*) p<0,05; (**) p<0,01 kontrol grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.1.3 Sepsis skorlaması

Deneyin başlangıcında (bazal) tüm gruplarda sepsis skoru sıfır olarak belirlenmiştir. Sepsis skoru deney protokolü süresince, deney başlangıcında (bazal), 6. saat ve 24. saatlerde değerlendirilmiştir.

LPS grubunda, sepsis skoru 6. saatte (14,0±1,1; $p<0,01$) ve 24. saatte (14,0 ± 2,2, $p<0,01$) kontrol (0) grubuna göre anlamlı oranda artmıştır ($p<0,01$). Bu zaman dilimlerinde sepsis skoru hesaplanması için değerlendirilen sıçanların görünümü, bilinç düzeyi, hareket, uyarana yanıt, gözler, solunum hızı, solunum şekli gibi tüm parametrelerde kontrole göre sepsis yönünde değişim gözlenmiştir.

Sepsis skorları; LPS+Sitikolin grubunda, LPS grubuna (14,0 ± 1,1) göre 6. saatte (8,6±2,4, $p>0,05$) ve 24. saatte (3,0 ± 1,1, $p<0,05$) azalmıştır. Benzer şekilde, LPS+Kolin grubunda da sepsis skorları, LPS grubuna (14,0 ± 2,2) göre 6. saatte (8,3±2,5, $p>0,05$) ve 24. saatte (3,0 ± 0,8, $p<0,05$) azalmıştır (Tablo 10).

Parametre özelinde incelendiğinde, 24. saate LPS+Sitikolin grubunda LPS grubuna göre genel görünüm (1 ± 0,0 vs. 2,7 ± 0,7; $p<0,05$), solunum hızı (1,5 ± 0,3 vs. 0,0 ± 0,0; $p<0,05$) ve solunum şekli (0,7 ± 0,2 vs. 0,0 ± 0,0; $p<0.05$) skorlarında LPS grubuna göre azalma saptanırken LPS+, Kolin grubunda bilinç düzeyi (2,3 ± 0,7 vs. 0,2 ± 0,2; $p<0,05$), hareket (1,7 ± 0,2 vs. 0,5 ± 0,2; $p<0,05$), uyarana yanıt (1,7 ± 0,5 vs. 0,0 ± 0,0; $p<0,01$) ve solunum hızı skorları (1,5 ± 0,3 vs. 0,5 ± 0,2; $p<0,05$) LPS grubuna göre azalmıştır (Tablo 10).

Tablo 10. Deney gruplarında protokol süresince belirlenen sepsis skorları ortalaması

Parametre	**Skor (6. saat)**		
	LPS (n=5)	**LPS+Sitikolin (n=8)**	**LPS+Kolin (n=8)**
Görünüm	2 ± 0 **	1,6 ± 0,2	2 ± 0**
Bilinç Düzeyi	2.5 ± 0,3**	2,2 ± 0,6	1,2 ± 0,5
Hareket	2 ± 0 **	1,0 ± 0,3 †	0,8 ± 0,4
Uyarana yanıt	2,3 ± 0,5**	1,6 ± 0,2	0,6 ± 0,4
Gözler	2,0 ± 0,4**	1,0 ± 0,6	1,4 ± 0,5
Solunum hızı	1,5 ± 0,5*	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,4
Solunum Şekli	0,7 ± 0,2*	0,8 ± 0,4	0,5± 0,2
Total skor	14,0 ± 1,1**	8,6 ± 2,4	8,3 ± 2,5
Parametre	**Skor (24. saat)**		
	LPS (n=4)	**LPS+Sitikolin (n=5)**	**LPS+Kolin (n=6)**
Görünüm	2,7 ± 0,7**	1 ± 0,0 †	1,3 ± 0,3
Bilinç Düzeyi	2,3 ± 0,7*	0,8 ± 0,4	0,2 ± 0,2†
Hareket	1,7 ± 0,2**	0,8 ± 0,4	0,5 ± 0,2 †
Uyarana yanıt	1,7 ± 0,5**	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0 ††
Gözler	2,0 ± 0,8*	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,3
Solunum hızı	1,5 ± 0,3**	0,0 ± 0,0 †	0,5 ± 0,2 †
Solunum Şekli	0,7 ± 0,2*	0,0 ± 0,0 †	0,3±0,2
Total skor	14,0 ± 2,2**	3 ± 1,1 †	3 ± 0,8 †

Veriler Ortalama±Standart sapma olarak gösterilmektedir.

Kontrol grubu ortalaması tüm saatlerde 0 ± 0 olarak belirlenmiştir.

(*) p<0,05; (**) p<0,01 kontrol grubuna göre;

(†) p<0,05; (††) p<0,01 LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.1.4 Vücut sıcaklığı takibi

Tüm gruplarda bazal, 6.saat ve 24.saatte rektal vücut sıcaklığı elektronik termometre yardımı ile ölçülmüştür. Vücut sıcaklıklarında gruplar arasında herhangi bir değişim saptanmamıştır (Tablo 11).

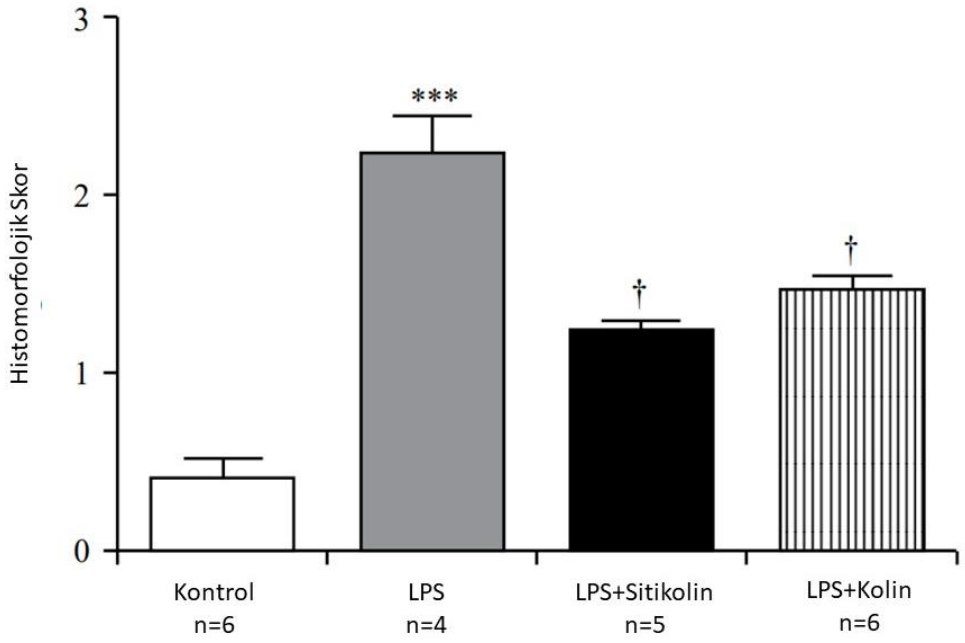
Tablo 11. Deney gruplarında protokol süresince vücut sıcaklık değişimi

Gruplar	Bazal vücut sıcaklığı (°)	6. saat vücut sıcaklığı (°)	24. saat vücut sıcaklığı (°)
Kontrol	38,2 ± 0,1 (n=6)	37,9 ± 0,1 (n=6)	37,6 ± 0,2 (n=6)
LPS	37,7 ± 0,2 (n=12)	37,8 ± 0,6 (n=5)	37,7 ± 0,4 (n=4)
LPS+Sitikolin	37,9 ± 0,2 (n=10)	37,5 ± 0,4 (n=8)	37,5 ± 0,2 (n=5)
LPS+Kolin	37,8 ± 0,2 (n=10)	37,6± 0,2 (n=8)	37,7 ± 0,1 (n=6)

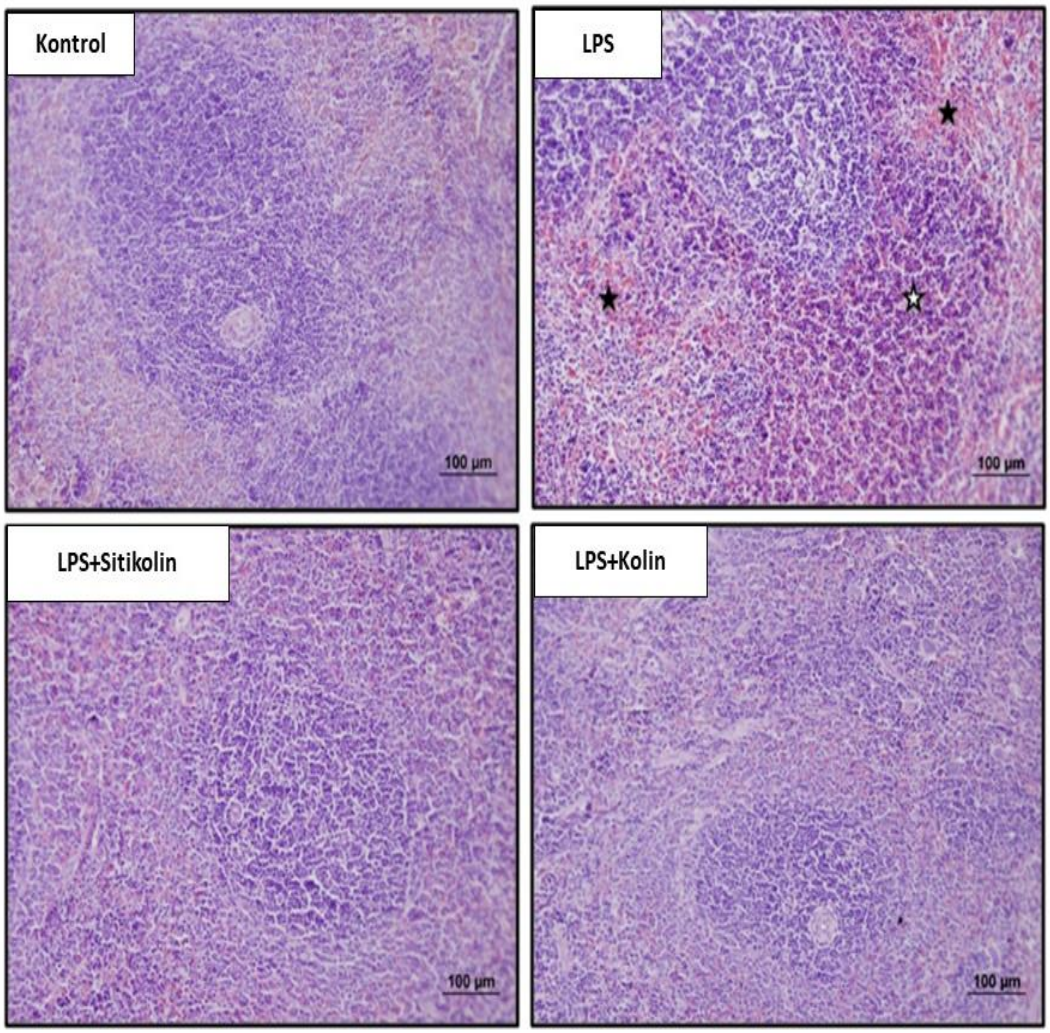
Veriler Ortalama±Standart sapma olarak gösterilmektedir.

4.1.5 Histomorfolojik Analiz

Dalak dokularında gerçekleştirilen histomorfolojik hasar skoru ortalaması LPS grubunda (2,2±0,2) kontrol grubuna (0,4±0,11) göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). LPS+Sitikolin (1,2±0,1) ve LPS+Kolin (1,5±0,1) gruplarında bu skor, LPS grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$; Şekil 14). Histomorfolojik incelemede LPS+Sitikolin ve LPS+Kolin gruplarında, LPS grubuna kıyasla dalak dokularında gözlenen difüz, şiddetli hemoraji ve ılımlı inflamasyon azalmıştır (Şekil 15).



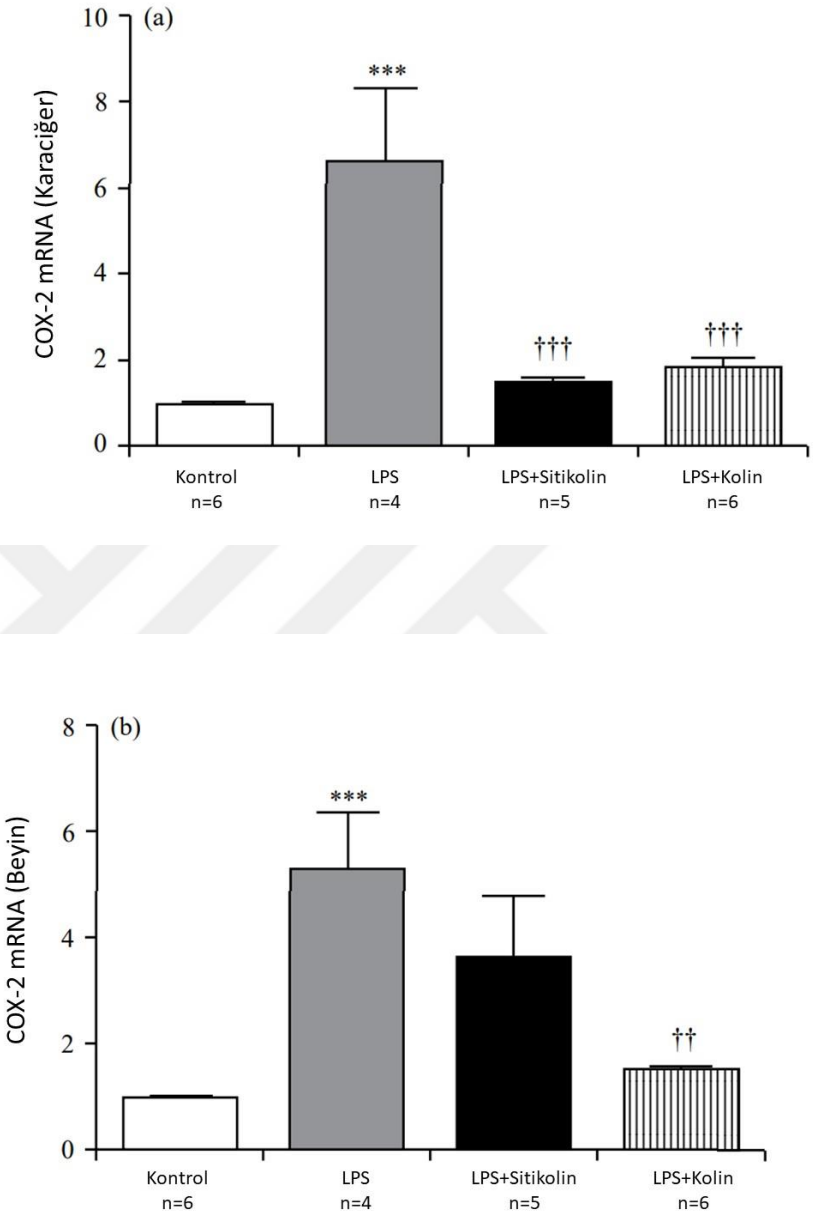
Şekil 14. Deney gruplarında histomorfolojik skor ortalaması (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (***) $p<0,001$ kontrol grubuna göre, (†) $p<0,05$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 15. Deney gruplarında dalak dokusunun histomorfolojik incelemesi (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (☆) mononükleer hücre infiltrasyonunu,(★) hemorajiyi göstermektektedir.

4.2 COX-2 mRNA düzeylerindeki değişim

LPS grubunda, karaciğer dokularında COX-2 mRNA ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). LPS+Sitikolin ve LPS+Kolin gruplarında karaciğer dokularında COX-2 mRNA ekspresyonları anlamlı olarak azalırken (Şekil 16a, $p<0,001$) beyin dokularında yalnızca LPS+Kolin grubunda COX-2 mRNA ekspresyon düzeyleri azalmıştır (Şekil 16b, $p<0,01$).

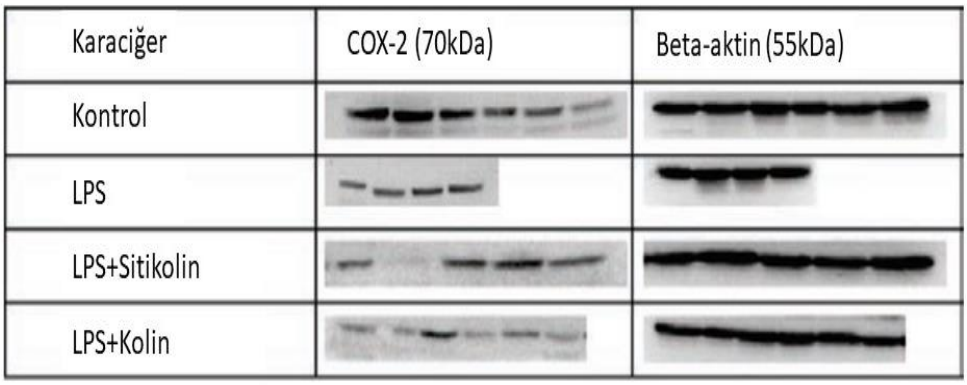


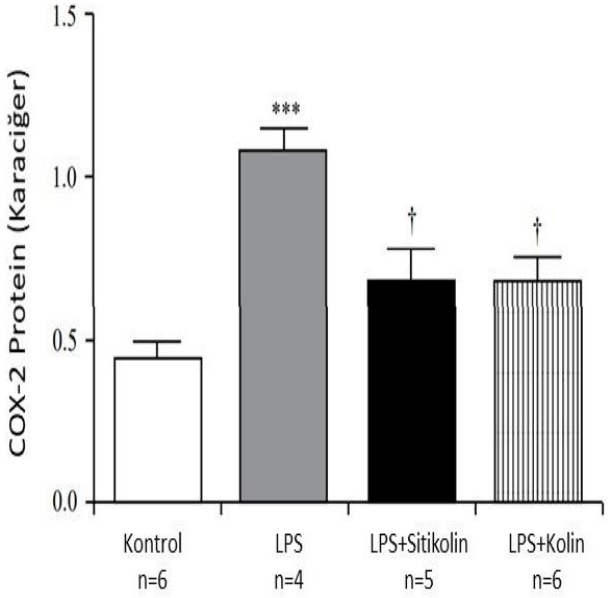
Şekil 16. Deney gruplarında COX-2 mRNA ekspresyon düzeyleri (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (***) $p<0,001$ kontrol grubuna göre; (††) $p<0,01$, (†††) $p<0,001$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.3 COX-2 Protein Ekspresyonu

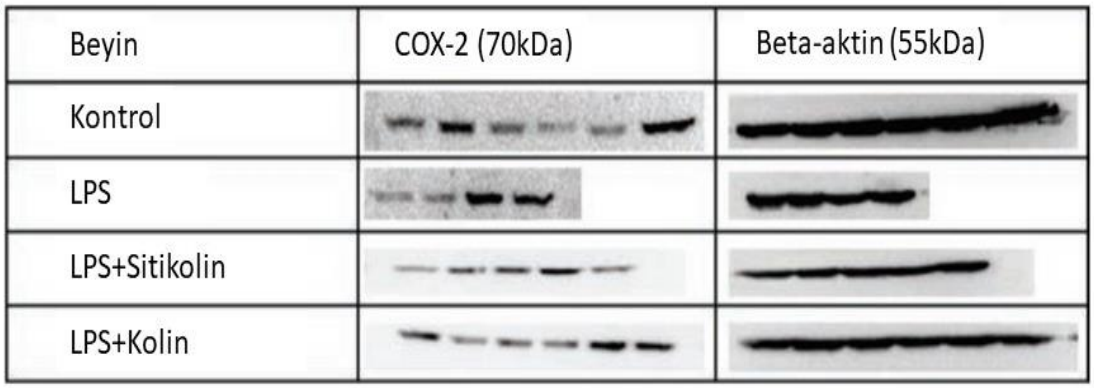
COX-2 protein ekspresyonu, karaciğer ve beyin dokularında LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,05$). LPS+Sitikolin ve LPS+Kolin gruplarında COX-2 protein ekspresyonu karaciğer dokusunda anlamlı olarak azalmış (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,05$, Şekil 17a) ancak beyin dokusunda azalma eğiliminde olsa da istatiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p>0,05$, Şekil 17b).

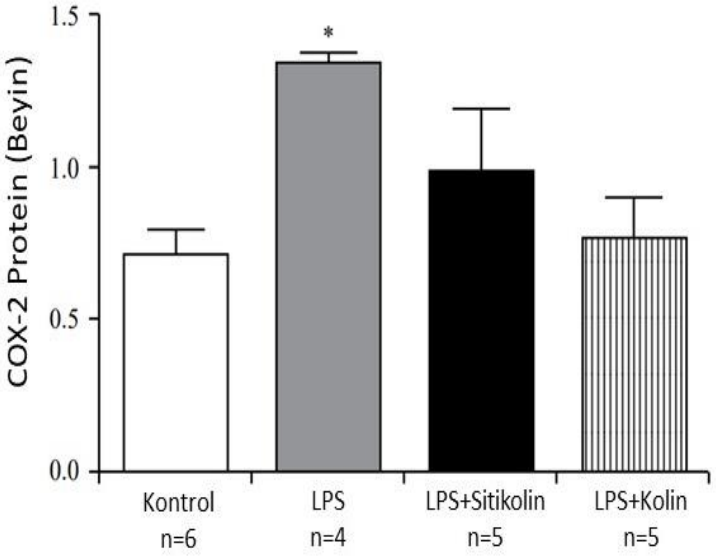
(a)





(b)



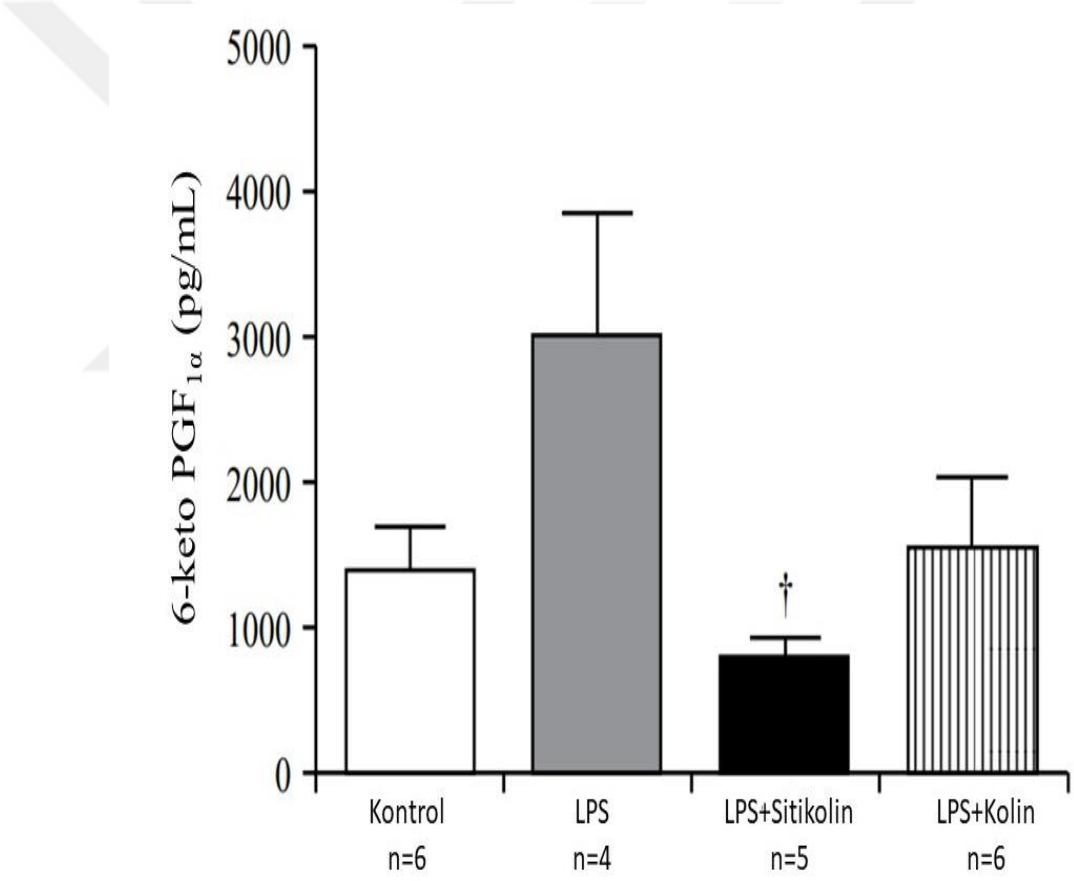


Şekil 17. Karaciğer (a) ve beyin dokularında (b) COX-2 protein ekspresyon değişimi (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (*) $p<0,05$, (***) $p<0,001$ kontrol grubuna göre; (†) $p<0,05$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.4 Prostaglandin Düzeyleri

4.4.1 Serum 6-keto-PGF$_{1\alpha}$ Düzeyleri

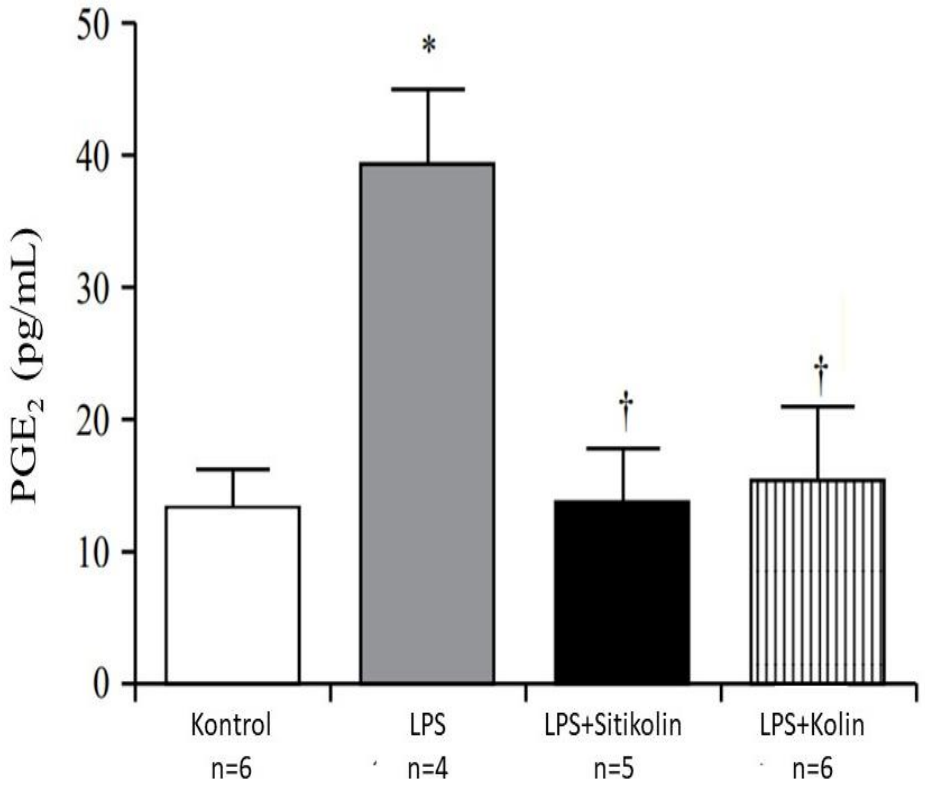
Prostasiklin metaboliti 6-keto prostaglandin F$_{1\alpha}$ (6-keto PGF$_{1\alpha}$) serum düzeyi LPS grubunda (n=4; 2975 ± 869,9 pg/mL) kontrol grubuna (n=6; 1387 ± 296,3 pg/mL) kıyasla artmıştır. LPS+Sitikolin grubunda ise LPS grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (n=5; 779,7±143,5 pg/mL) ($p<0,05$). LPS+Kolin grubunda ise (n=5; 1533±485,4 pg/mL) PGI$_2$ metaboliti düzeyi azalma eğiliminde olsa da istatiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p>0,05$, Şekil 18).



Şekil 18. Deney gruplarında, serum 6-keto PGF$_{1\alpha}$ düzeyleri (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (†) $p<0,05$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.4.2 Serum Prostaglandin E_2 Düzeyleri

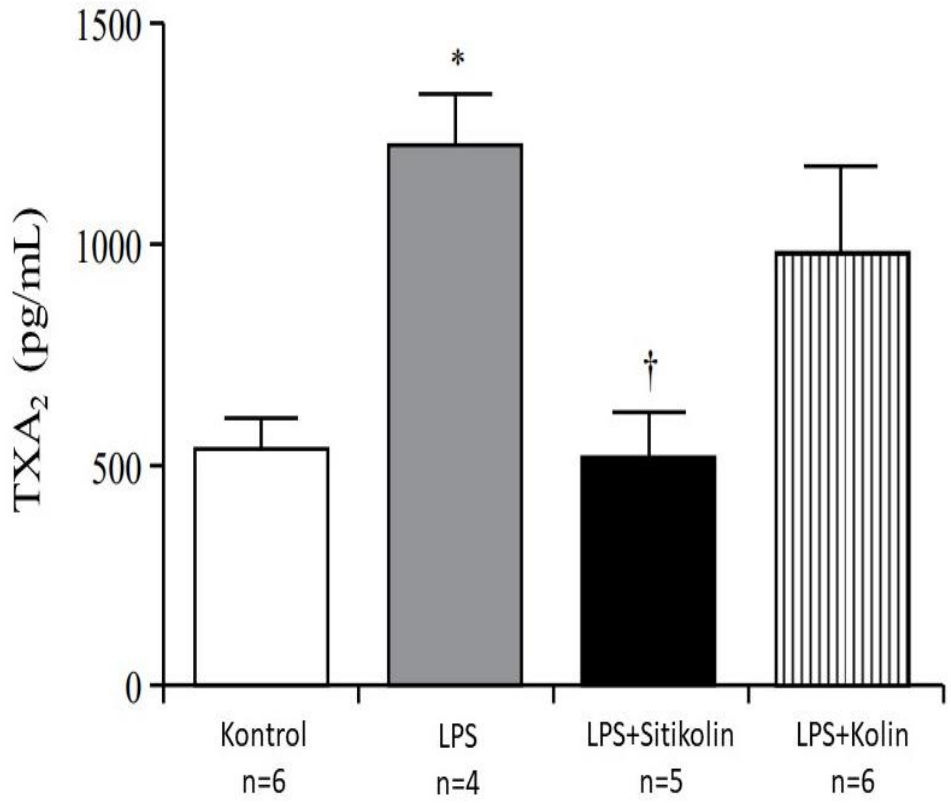
Serum prostaglandin E_2 (PGE_2) düzeyi LPS grubunda (n=4; 39,0±6,0 pg/mL) kontrol grubuna (n=6; 13,3±3,0 pg/mL) kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$). Bu artış LPS+Sitikolin (n=5; 13,7 ±4,1 pg/mL) ve LPS+Kolin gruplarında (n=6; 15,6 ±5,4 pg/mL) ise LPS grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$, Şekil 19).



Şekil 19. Deney gruplarında, serum prostaglandin E_2 düzeyleri (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (*) $p<0,05$ kontrol grubuna göre; (†) $p<0,05$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.4.3 Serum Tromboksan A_2 Düzeyleri

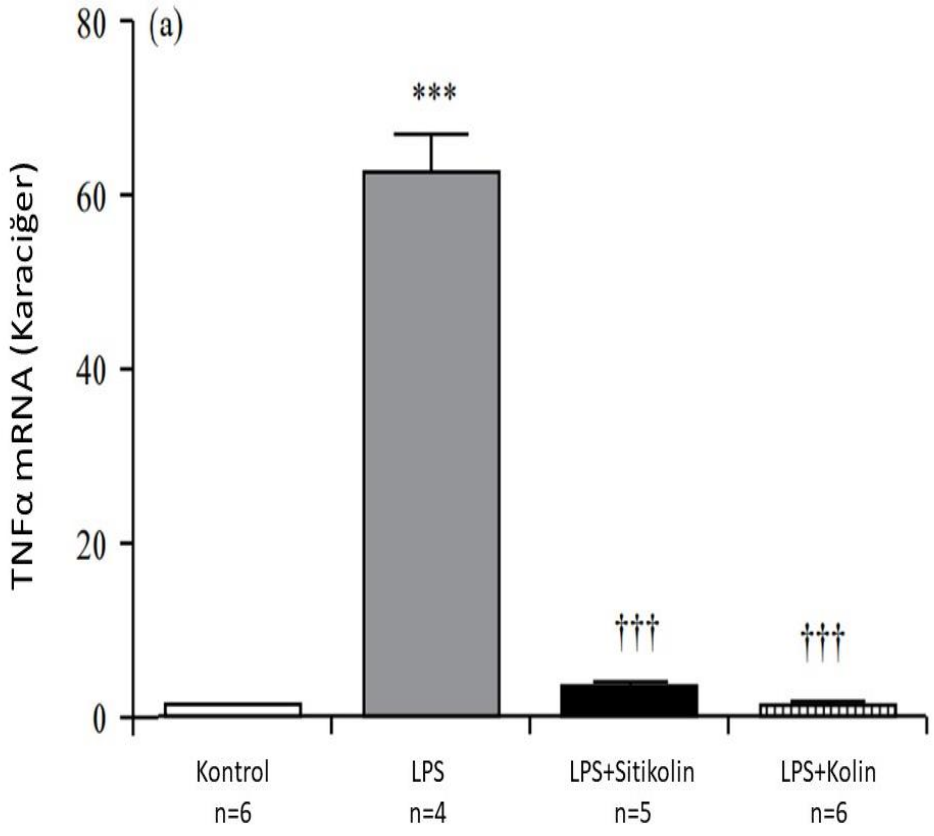
Serum Tromboksan A_2 (TXA_2) düzeyi LPS grubunda (n=3; 1227±121.2 pg/mL) kontrol grubuna (n=6; 539,1±74,4 pg/mL) kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$). Bu artış LPS+Sitikolin uygulanan grupta (n=5; 520,0±105,6 pg/mL) LPS grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). LPS+Kolin grubunda (n=6; 985,6 ± 198,9 pg/mL) serum TXA_2 düzeyi LPS grubuna göre azalma eğiliminde olsa da istatiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p>0,05$, Şekil 20).

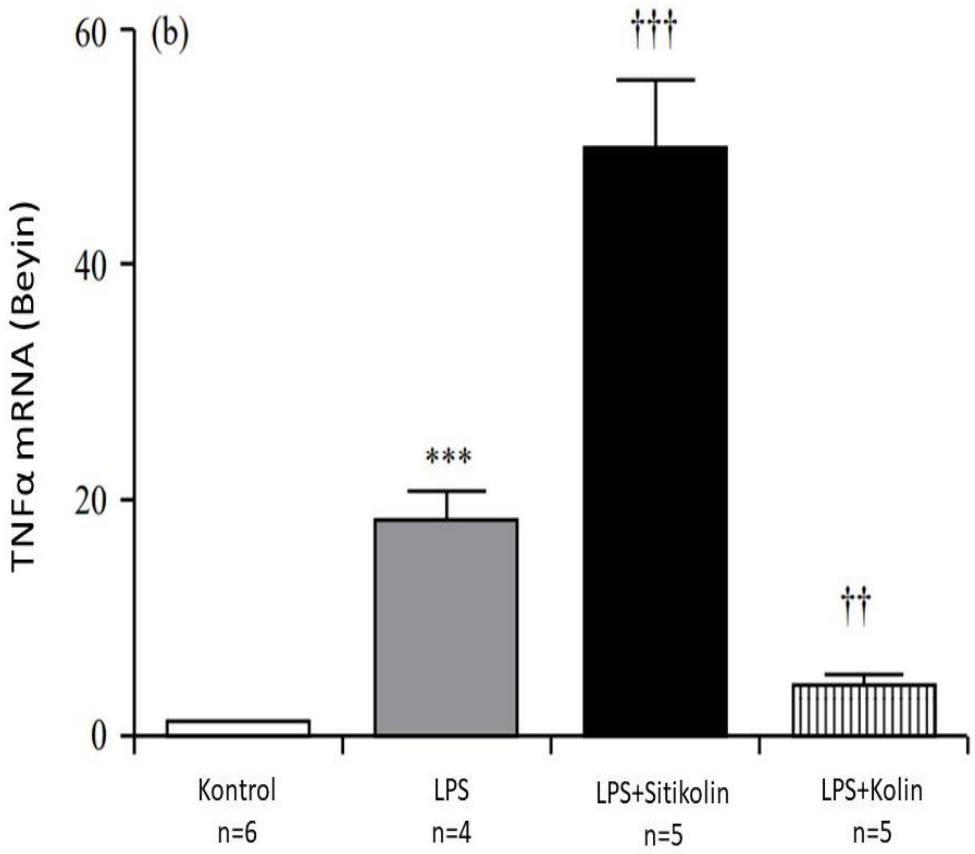


Şekil 20. Deney gruplarında, serum Tromboksan A_2 düzeyleri (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (*) $p<0,05$ kontrol grubuna göre; (†) $p<0,05$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.5.1. TNFα mRNA Düzeyleri

TNFα mRNA düzeyleri LPS grubunda karaciğer ve beyin dokularında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). Bu artış LPS+Sitikolin ve LPS+Kolin gruplarında karaciğer dokusunda anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,001$). Beyin dokusunda ise TNFα mRNA ekspresyon düzeylerinde, LPS+Sitikolin grubunda artış ($p<0,001$), LPS+Kolin grubunda ise azalma tespit edilmiştir ($p<0,01$, Şekil 21).

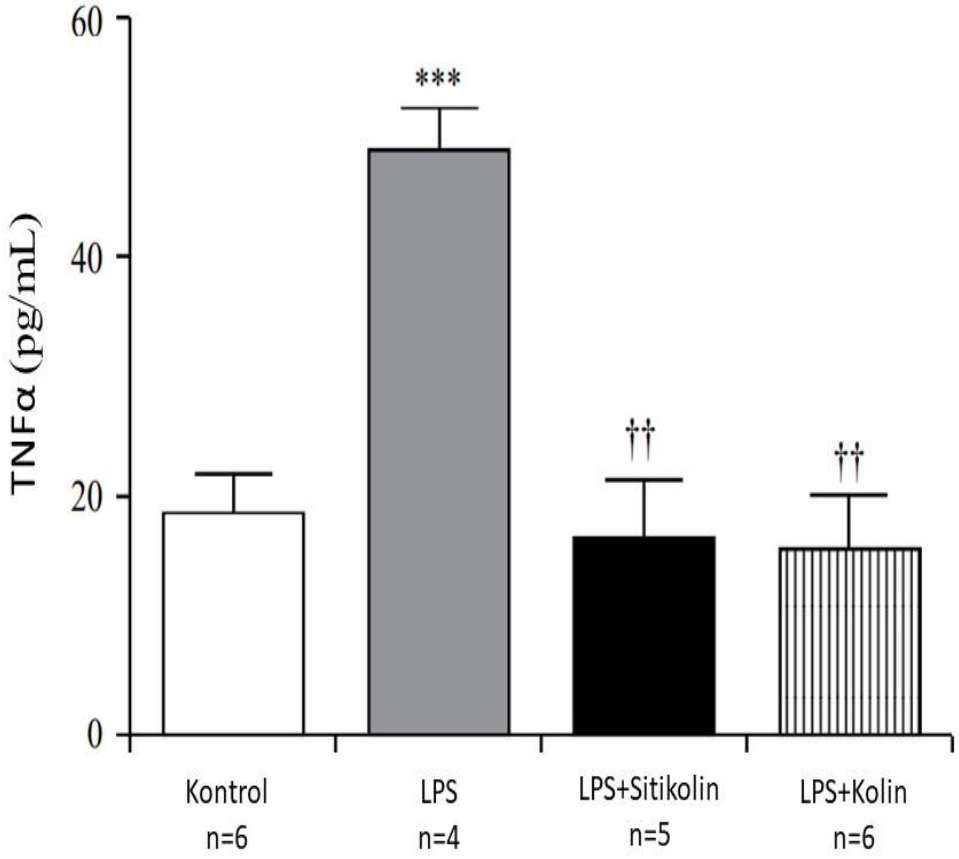




Şekil 21. Deney gruplarında TNFα mRNA ekspresyon düzeyleri (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (***) $p<0,001$ kontrol grubuna göre; (††) $p<0,01$, (†††) $p<0,001$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.5.2. Serum TNFα düzeyleri

Serum TNFα düzeyleri LPS grubunda (n=4; 48,5±3,9 pg/mL) kontrol grubuna kıyasla (18,4±3,4 pg/mL) anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01$). Bu artış LPS+Sitikolin (16,1±5,2 pg/mL) ve LPS+Kolin (15,1±4,9 pg/mL) gruplarında LPS grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,001$, Şekil 22).

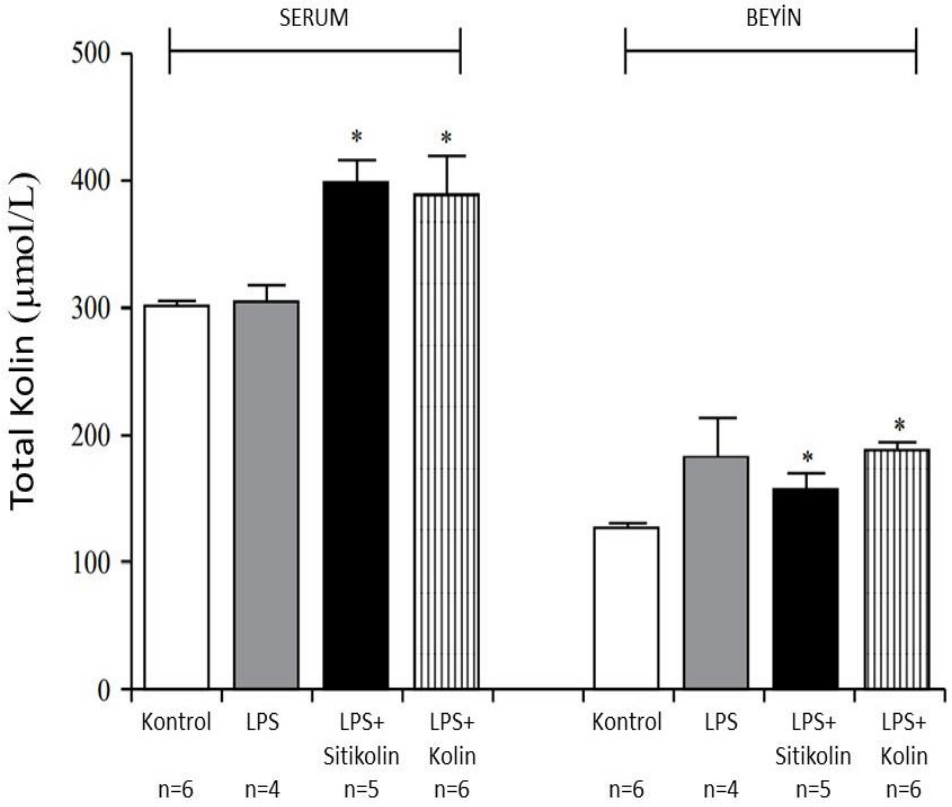


Şekil 22. Deney gruplarında, serum TNFα düzeyleri (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (***) $p<0,001$ kontrol grubuna göre; (††) $p<0,01$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

4.6 Serum ve Beyin Kolin Düzeyleri

Serum total kolin düzeyi incelendiğinde LPS grubu (301,7±15,25 µmol/L) ve kontrol grubu arasında (n=6; 298,8 ± 6,0 µmol/L) anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). LPS+Sitikolin (n=5; 396,3 ± 19,44 µmol/L) ve LPS+Kolin (n=6; 387,1 ± 31,6 µmol/L) uygulanan gruplarda serum total kolin düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

Beyinde ise kontrol grubu (n=6; 124,7±3,8 µmol/L) ve LPS (n=4; 181,4 ±30,9 µmol/L) grubu arasında farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). LPS+Sitikolin (155,5±14,19 µmol/L) ve LPS+Kolin (185,8±7,6 µmol/L) gruplarında total kolin düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$, Şekil 23).



Şekil 23. Deney gruplarında total kolin düzeyleri (LPS: Endotoksemi grubu, LPS+Sitikolin: Sitikolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu, LPS+Kolin: Kolin tedavisi uygulanan endotoksemi grubu) (***) $p<0,001$ kontrol grubuna göre; (††) $p<0,01$ LPS grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan endotoksemi modelinde, sitikolin ve kolinin, dolaşımdaki kolin konsantrasyonunu artırarak periferik bir doku olan karaciğerde LPS ile indüklenen COX-2 enzim ekspresyonunu azaltarak antiinflamatuvar etki oluşturduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak sitikolinin inflamasyona bağlı artış gösteren COX-2 ürünleri olan, prostaglandin E_2, tromboksan A_2 ve prostasiklin metaboliti 6-keto $PGF_{1\alpha}$ seviyelerini anlamlı olarak azalttığı, kolinin ise COX-2 ürünlerinden yalnızca prostaglandin E_2'yi azalttığı sonucuna varılmıştır. Beyin dokusunda ise sitikolin ve kolinin LPS ile indüklenen COX-2 enzim ekspresyonu azaltıcı etkisi bir miktar gözlense de istatiksel anlamlılık elde edilmemiştir. Bu sonuçlar sitikolinin periferik bir doku olan karaciğerde koline göre, COX-2 enzim ekspresyonunu ve ürünleri üzerinde daha belirgin bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca sitikolin ve kolinin endotoksemili sıçanlarda dalak dokusundaki inflamasyonu, sağkalım oranlarını ve sepsis şiddetini de iyileştirdiği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada sıçanlarda endotoksemi modeli, 10 mg/kg LPS uygulaması ile oluşturulmuştur. Literatürde 5 mg/kg LPS ile sepsis modeli oluşturulan pek çok deneysel araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan 10 mg/kg LPS dozu, sıçanlarda subletal doz olarak bildirilmektetir ve literatürde sepsis oluşturmada kullanılan 5 mg/kg'lık dozun üzerindedir. Sıçanlarda endotoksemi modelinin gelişiminin doğrulanması için; sıçanların sağkalım oranları, sepsis skorları, vücut ağırlığı değişiklikleri ve dalak dokusunun histomorfolojik değişiklikleri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda endotoksemi grubundaki sağkalım oranı 24 saatte %20, sepsis skoru 14.0 ± 2.2, ağırlık kaybı 27.4 ±2.1 g ve dalak histomorfolojik hasar skoru ortalaması 2.2±0.2 olarak belirlenmiştir. Bulgularımız ile uyumlu olarak Shrum ve arkadaşları kemirgen endotoksemi modelinde, toplam sepsis skorları 15'in üzerinde olan hayvanların sağkalım oranlarının %20'ye düştüğünü göstermiştir (91). Dolayısı ile bu çalışmada, sepsis skorları 14 olan sıçanlarda, benzer sağkalım oranları gözlenmiştir. Çalışmamızda oluşturulan sıçan endotoksemi modelinde belirlenen

sağkalım oranlarında ve vücut ağırlığındaki azalma ile sepsis ve histomorfolojik hasar skorlarındaki artış önceki çalışmalar ile uyumludur (7,88,95).

Tedavide uygulan sitikolin ve kolin tedavisi ile sıçanlarda sağkalım oranlarında artış tespit edilse de istatiksel anlamlılık elde edilmemiştir. Önceki çalışmalarda, sitikolin ve kolinin endotoksemik hayvanlarda LPS ile indüklenen çoklu organ hasarını azaltarak, dissemine intravasküler koagülasyonu önleyerek, bozulan serum lipid parametrelerini düzenleyerek ve inflamatuvar sitokin yanıtını azaltarak sağkalım oranlarını artırdığı bildirilmiştir (72,89). Bu çalışmada sitikolin ve kolin tedavilerinin endotoksemili sıçanlarda sağkalım oranlarını artırmasına rağmen istatistiksel anlamlılığa ulaşmamasının subletal dozda LPS uygulaması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sepsis modelinin doğrulanmasında her bir sıçanda farklı parametrelerin değerlendirilerek sepsis şiddetinin belirlendiği yeni bir skorlama sistemi kullanılmaktadır (91,96). Bu nedenle bu çalışmada, kemirgen endotoksemi modelinde akut inflamatuvar parametrelerin değerlendirilmesini temel alan güvenilir ve tutarlı sonuçlar sağlayan bu yeni sepsis skorlama sistemi kullanılmıştır (91,96). Çalışmamızda 6. ve 24 saatlerde görünüm, bilinç düzeyi, hareket, uyarana yanıt, gözler, solunum hızı ve şekli olmak üzere sekiz parametreye ek olarak kilo kaybındaki değişim takip edilerek sepsis şiddeti değerlendirilmiştir. Bulgularımız, endotoksemi oluşturulan sıçanlarda, kontrol grubuna göre skorlamada değerlendirilen sekiz parametrenin tek tek ve toplam olarak değerlendirildiği sepsis skorlarının önemli ölçüde bozulduğunu göstermektedir. Sitikolin ve kolin tedavileri ise 24 saat içerisinde toplam sepsis skorlarında ve değerlendirilen parametrelerde önemli ölçüde iyileşmeye neden olnuştur. Solunum parametreleri, endotoksemi grubuna kıyasla her iki tedavi grubunda da belirgin düzeyde iyileşmiştir. Ancak altta yatan mekanizma protokolümüz kapsamında incelenememiştir. Daha önce yapılan araştırmalarda, sitikolin ve kolin uygulaması sonucunda gerçekleşen KAY aktivasyonunun, lökositler ve makrofajlar başta olmak üzere mononükleer fagositik hücrelerden inflamatuvar mediyatör salınmasını azaltarak akciğerdeki inflamasyonunu azalttığı gösterilmiştir (97,98). Başka bir araştırmada ise, akciğerde parasempatik sinir denervasyonunun ile antiinflamatuvar etkiye neden olduğu

gösterilmiştir (97). Sitikolinin, sıçanlarda çekal ligasyon ile indüklenen septik şok modelinde de akciğer dokusundaki ileri derece inflamasyon ve hemorajiyi azalttığı histomorfolojik olarak gösterilmiştir (7). Bulgularımızla uyumlu olarak, köpeklerde oluşturulmuş endotoksemik şok modelinde, kolin ve sitikolinin düşük kan basıncını düzenlediği, ek olarak endotoksine bağlı artan solunum hızı ve proinflamatuvar yanıt ile gelişen solunumsal asidozu iyileştirdiği gösterilmiştir (99). Akut endotoksemi modelinde 24 saatlik protokolde sitikolin tedavisi genel görünüm ve solunum parametrelerini düzeltirken kolin tedavisi bilinç düzeyi, uyarana yanıt ve hareket parametrelerinde anlamlı bir iyileşmeye neden olmuştur. Çalışmamızda motor aktivitenin değerlendirilmesi yalnızca gözlemsel bir sonuç olmakla birlikte; geçtiğimiz yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda sıçanlarda beslenmede kolin eksikliğinin motor fonksiyon bozukluğunu artırdığı gösterilmiştir (100,101). Bu çalışmaya benzer şekilde dizayn edilmiş çalışmalarda da LPS ile endotoksemi oluşturulmuş farelerde de kontrole göre motor fonksiyon bozukluğu gözlendiği bildirilmiştir (100–102). Tüm bu elde edilen bulgular, kolinin motor koordinasyon üzerindeki olumlu etkilerini destekler niteliktedir. Nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde; hipokampusta Ach sentezlenmesi ve salıverilmesinin yanı sıra kolinin nöronal geri alım bozukluklarının da rolü olduğu bilinmektedir (103,104). Bu nedenle bu çalışmada endotoksemik sıçanlarda kolinin motor fonksiyonlar üzerindeki iyileştirici etkileri ile ilgili elde edilen veriler ileri çalışmalar ile doğrulanmalıdır.

Endotoksemi veya sepsis durumunda artan sitokin düzeylerinin orta beyinde yer alan hipotalamusa etkileri ile iştah kaybı (anoreksi) ve vücut ağırlığında azalma ile ilişkili olduğu bilinmektedir (95). Bu çalışmada endotoksemi oluşturulan sıçanlarda, 24 saatlik protokol süresince tespit edilen vücut ağırlığındaki belirgin kayıp tedavi gruplarında kısmen azalmıştır. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamamıştır. Bunun nedeni çalışmada kullanılan endotoksin dozunun subletal dozda olması olabilir. Benzer şekilde, bir çalışmada beslenme ile verilen kolin takviyesinin α7nAChR aracılı KAY aktivasyonu ile gebe sıçanlarda endotoksinin neden olduğu maternal, fetal ve plasental kilo kaybını iyileştirdiği gösterilmiştir (105). Önceki veriler ile bir arada ele aldığımızda bulgularımız endotoksemi varlığında sitikolin ve kolin tedavisinin vücut ağırlığı kaybı üzerindeki olumlu etkilerinin artan serum total kolin düzeyleri ile KAY aktivasyonuna bağlı olabileceğini düşündürmektedir

Dalak, sistemik inflamatuvar yanıtın kolinerjik kontrolüne katkıda bulunan önemli bir organdır. Dalak dokusunda bulunan splenik immün hücrelerde ifadelenen α7nAChR uyarılması sonucu inflamatuvar sitokin düzeylerinin baskılandığı bilinmektedir (106). Bu çalışmada da 10 mg/kg LPS ile oluşturulan endotoksemi modelinde dalak dokularında yaygın, şiddetli kanama ve inflamasyon gözlenmiş, histomorfolojik hasar skoru kontrol grubuna göre anlamlı oranda artmıştır. Sitikolin ve kolin tedavileri ise endotoksemi grubuna göre anlamlı olarak dalak histomorfolojisindeki bozulmayı düzeltmiştir. Çekal ligasyon ve delme modeli ile oluşturulan sıçan sepsis modelinde de akciğer, karaciğer ve böbrek dokularının histomorfolojik incelemesi sonucunda, inflamasyon, vasküler dejenerasyon, kanama ve nekroz parametrelerinde gözlemlenen artışın sitikolin tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (7,107). Sitikolinin, iskemik ve inflamatuvar koşullarda oksidatif stresi azaltarak dokuda koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. COX-2 inhibitörü selekoksib, sepsisli sıçanlarda COX-2 aracılı oluşan oksidatif hasarı azaltarak dalak, karaciğer ve akciğerlerdeki doku hasarını iyileştirmiştir (108). Bulgularımız bir arada ele alındığında endotoksemi durumunda sitikolin ve kolin tedavilerinin inflamatuvar sitokinlerin yanı sıra COX-2 yolu ürünleri olan prostaglandin düzeylerini de baskılayarak dokuda koruyucu etki oluşturarak sağ kalım oranlarını artırdığı düşünülmektedir. Ancak, sitikolin veya kolinin, endotoksin ile indüklenen COX-2 enzim ekspresyonunu baskılayıcı etkisi ile ilişkili olabilecek olası antioksidan etkisi bu çalışma kapsamında değerlendirilememiştir.

Bu çalışmada, COX-2 ekspresyonu ve COX-2 ürünleri olan prostaglandin düzeyleri endotoksemi grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır (5,6). COX-2 ekspresyon artışının prostaglandin düzeylerini artırarak inflamasyona katkıda bulunduğu bilinmektedir (61). İnflamatuvar koşullarda artan prostaglandin düzeyleri; vasküler geçirgenlik, ROS üzeylerinde artış, hemodinamik değişiklikler, çoklu organ hasarı ve ölümle ilişkilidir (79). Çalışmamızda karaciğer dokusundaki COX-2 ekspresyonlarındaki endotoksin kaynaklı artış her iki tedavi grubunda anlamlı olarak azalmıştır. COX-2 ekspresyon değişimine uyumlu olarak sitikolin uygulanan grupta serum 6-keto-PGF1α (stabil PGI_2 metaboliti), PGE_2 ve TXA_2 düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Kolin tedavisi sonucunda prostaglandin düzeylerinde düşüş gerçekleşse de yalnızca PGE_2 düzeylerinde azalma istatiksel

olarak anlamlıdır. Önceki bulgularla birlikte ele alındığında, kolin ve sitikolin tedavilerinin COX-2 yolağı ve dolayısıyla prostaglandinler üzerindeki baskılayıcı etkisinin doku hasarı ve sağkalım üzerine olumlu etkilerinde rolü olduğu düşünülmektedir.

Kolinerjik sistem ve siklooksijenaz etkileşimi ile ilgili olarak, oral yoldan verilen sitikolinin beyindeki nekrotik dokularda prostaglandinlerin öncülü araşidonik asitin oluşumunda rol alan fosfolipaz A_2 (PLA_2) enziminin aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir (83). Başka bir çalışmada ise, farelerde LPS ile oluşturulan endotoksemi modelinde kolin ve aspirinin birlikte uygulanması sonucunda sinerjistik anti-inflamatuvar etki oluşturduğu gösterilmiştir (6). Çalışma, kolin ve aspirinin sinerjistik etkileri ile araşidonik asit yolağı ürünleri olan prostaglandin ve lökotrien düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Bu etkinin, KAY aktivasyonu sonucunda inflamatuvar mediyatör serbestlenmesini önlenmesi sonucu olabileceği vurgulanmıştır (6,7,72).

Kolin ve sitikolin uygulamasının periferik etkilerini inceleyen araştırma sonuçları birbiri ile uyumlu olsa da, beyin dokusundaki santral etkileri hakkında literatürde bazı çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Sağlıklı sıçanlarda kan basıncını ve kalp hızını değerlendiren bir çalışmada, intraserebroventriküler sitikolin uygulamasının hipotalamusta COX-2 reaktivitesini artırdığı gösterilmiştir (109). Nikotin uygulaması ile α7nAChR aracılı KAY aktivasyonunun mikroglial hücrelerde COX-2 ekspresyonunda ve PGE_2 seviyesinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (110). Bulgularımız sitikolin tedavisi ile orta beyin dokusunda COX-2 ekspresyonunun endotoksemi grubuna göre anlamlı olarak değişmediğini göstermiştir. Kolin tedavisi ise hem karaciğer hem de orta beyin dokusunda COX-2 ekspresyonunu azaltmıştır.

Sitikolin, Kennedy yolağı ile beyindeki ana fosfolipidlerden biri olan fosfatidilkolin (FK) sentezinin önemli bir bileşenidir. Ek olarak FK, araşidonik asitler başta olmak üzere pek çok biyoaktif lipidlerin kaynağıdır (111). FK, membran fosfolipidleri, prostaglandinler ve lökotrienlerin kaynağı araşidonik asit üretimine katkıda bulunan fosfolipaz A_2 (PLA_2) tarafından hidrolize edilebilir (112). PLA_2 aktivitesinin sistemik inflamatuvar koşullarda önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (113). Sitikolinin serebral iskemiye bağlı gerçekleşen fosfolipid kaybını azalttığı ve

araşidonik asit düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (63). Ek olarak, endotokseminin santral inflamatuvar yanıtı tetikleyerek beyin dokusunda TNF düzeylerinde artışa yol açtığı bilinmektedir. İnflamatuvar koşullarda beyinde TNFα ve IL-1β seviyelerindeki artış, FK hidrolizini ve PLA_2 aktivitesini artırmaktadır (63,114). Bulgularımız, sitikolin tedavisinin beyin dokusunda COX-2 ekspresyonunun endotoksemik sıçanlara kıyasla anlamlı düzeyde değişmediğini göstermekle birlikte, endotoksin kaynaklı TNFα ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Sitikolinin kimyasal yapısında bulunan sitidinin biyoaktif bir ajan olduğu ve pürinerjik reseptör aktivasyonu ile inflamatuvar yanıtın alevlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (67,115). Önceki çalışmalarla birlikte ele alındığında sitikolinin yapısında bulunan sitidin molekülünün etkilerine bağlı olarak beyinde inflamatuvar sitokin düzeylerindeki artışa neden olduğu ancak sitikolin yapısında bulunan kolinin yüksek konsatrasyonlarda kolinerjik reseptörler ile direkt etkileşimi nedeniyle bu artışa zıt bir antiinflamatuvar etki oluşturabileceği düşünülmektedir (116).

Araştırmalar, endotoksemi ve sepsis modellerinde sitikolin ve kolin tedavilerinin kan kolin düzeyini arttırarak kolinerjik sistem reseptörleri ile doğrudan etkileşerek KAY aktivasyonu sağladığını bildirmektedir (117). Sistemik yol ile uygulanan sitikolin ve kolinin beyindeki ve kan dolaşımındaki total kolin düzeylerini artırdığı göstermiştir (57,58,118). Kanda total kolin konsantrasyonunun terapötik düzeyinin korunabilmesi amacıyla endotoksemi modellerinde protokol süresince tekrar eden kolin ve sitikolin sistemik ilaç uygulamaları literatürde kabul görmüş uygulamalardır (57,58,118). Endotoksemi varlığında endojen KAY aktivasyonuna bağlı total kolin/ACh konsantrasyonlarında ılımlı bir artış ve kolinomimetik ajanların uygulanmasına bağlı bu artışın belirgin düzeylere erişebileceği gösterilmiştir (50,119).Önceki bulgular ile uyumlu olarak sonuçlarımız, endotoksemik sıçanlarda intraperitoneal yol ile uygulanan sitikolin ve kolin tedavilerinin, kontrol grubuna kıyasla, serum ve beyin total kolin konsantrasyonlarını anlamlı ölçüde artırdığını göstermiştir. Periferik antiinflamatuvar etkilerin yanı sıra, beyin dokusunda total kolin düzeylerindeki artış santral KAY aktivasyonunun sitikolin ve kolinin, uygulanan dozlarda, antiinflamatuvar etkilerine aracılık edebileceğine işaret etmektedir. Önceki çalışmalarda artan kolin konsantrasyonuna bağlı α7nAChR aktivasyonunun sepsisli hayvanlarda trombosit fonksiyon bozukluklarını, dissemine intravasküler

koagülasyonu ve hepatorenal hasarı iyileştirdiğini destekleyen kanıtlara ulaşılmıştır (70,72,89). Sitikolin ve kolinin KAY aktivasyonunu sonucunda proinflamatuvar sitokin seviyelerini azalttığı, sağkalım oranlarını arttırdığı ve çoklu organ yetmezliğini düzelttiği farklı çalışmalarla desteklenmiştir. Araştırmalarda sitikolin ve kolinin olumlu etkisinin, kolinerjik sistemin parçası α7nAChR aktivasyonuna bağlı mononükleer hücrelerden inflamatuvar mediyatör salıverilmesinin azalmasından kaynaklanabileceği ortak olarak vurgulanmaktadır (8–10,89). Bununla birlikte, nikotinik reseptörlerin yanı sıra, muskarinik, pürinerjik, vazopressin, GABAerjik ve opioiderjik reseptörlerin, kolinerjik ajanların analjezik, antihiperaljezik ve antiinflamatuvar etkilerinde rol oynadığı gösterilmiştir (6,67,120,121). Sitikolin ve kolinin COX-2 yolu üzerindeki etkisinde α7nAChR'lerinin rolü çalışmamız kapsamında araştırılmamıştır ancak yapılan araştırmalar α7nAChR'lerinin olası rolüne işaret etmektedir. Ancak bu hipotezin ileri çalışmalar ile doğrulanması gereklidir.

Günümüzde inflamasyon kontrolünde sıklıkla kullanılan nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) siklooksijenaz yolunu baskılayarak etki göstermektedir. COX enziminin COX-1 izoformu daha çok homeostaz ile ilişkilendirilirken; COX-2 izoformu inflamatuvar uyaran ile indüklenebilen bir enzim olarak inflamasyonlu dokularda artış gösterir. (5). NSAİİ'ların COX-1 inhibisyonuna bağlı özellikle gastrointestinal sistem yan etkileri klinik kullanımlarını kısıtlamaktadır (122,123). İnflamasyon ile ilişkilendirilen COX-2 enzimini selektif olarak inhibe eden ilaçlar ise günümüzde kullanılsa da özellikle miyokard enfarktüsünü tetiklemeleri nedeniyle klinik kullanımları yaygınlaşmamıştır(123). Çalışmamızda sitikolinin inflamasyona bağlı artış gösteren periferik COX-2 enzim ekspresyonu ile COX-2 ürünleri prostaglandin E_2, tromboksan A_2 ve prostasiklin seviyelerini anlamlı olarak azaltarak antiinflamatuvar etki oluşturduğu gösterilmiştir. Sitikolin, iskemik ve travmatik beyin hasarı, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, bilişsel işlev bozuklukları ve madde bağımlılıkları gibi çeşitli durumlarda reçete edilen veya destekleyici tedavi olarak kullanılan bir ilaçtır (62,124–126). Yapılan araştırmalar pek çok organ sistemini olumlu etkileyerek sağ kalım oranlarını da arttıran sitikolin ve kolinin tedavilerinin, tedavisi güç olan endotoksemide/sepsiste antiinflamatuvar etkilerini destekleyen pre-klinik veriler ortaya koymaktadır (6,7,9,71,89,121). Çalışmamızda elde edilen bulgular, sitikolin ve kolinin endotoksemi varlığında antiinflamatuvar etkilerine COX-

2 yolu üzerindeki olumlu etkilerini de ekleyerek önceki bulguları destekler niteliktedir. Sitikolin ve kolinin COX-2 yolu ve prostaglandin düzeyindeki baskılayıcı etkisinin reseptör aracılı mekanizması ve α7nAChR'lerinin olası rolü yeni araştırma soruları ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma, lipopolisakkarit ile indüklenen sıçan endotoksemi modelinde sitikolin ve kolin tedavileri inflamasyon varlığında artış gösteren COX-2 enzim ekspresyonunu ve COX-2 enzim ürünleri olan prostaglandin düzeylerini, beyin dokusu ve kanda kolin düzeylerini artırarak baskıladığını gösteren ilk çalışmadır.

Bu araştırmada, sıçanlarda lipopolisakkarid ile oluşturulan endotoksemide, sitikolin ve kolin tedavisinin santral ve periferik total kolin düzeylerine etkisi değerlendirilerek sağkalım oranları, sepsis skorları, vücut ağırlık değişimleri, dalak dokusunun histomorfolojik hasarı, inflamasyon belirteci TNF-α düzeylerinde ve COX-2 enzim ekspresyonundaki değişim ve bu enzimin ürünleri prostaglandin düzeylerindeki değişimler analiz edilmiştir.

Çalışmamızda 24 saatlik protokol süresinde tespit edilen sağkalım oranları endotoksemik hayvanlarda kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak azalmaktadır. Sağkalım oranlarının sitikolin ve kolin uygulanan gruplarda tedavi uygulanmayan endotoksemik hayvanlara kıyasla, anlamlılık saptanmasa da artış eğiliminde olduğu dikkati çekmektedir. Sağkalım analizine ek olarak sepsis şiddetinin değerlendirilebilmesi için çalışmamızda 6. ve 24 saatlerde görünüm, bilinç düzeyi, hareket, uyarana yanıt, gözler, solunum hızı ve şekli olmak üzere sekiz parametreyi kapsayan akut inflamasyon bulgularının gözlemsel olarak değerlendirilebileceği sepsis skorlama sistemi kullanılmıştır. Sağkalım oranları ile uyumlu şekilde sepsis skorlama sistemi sonuçlarında da değerlendirilen tüm parametreler ve total sepsis skorları endotoksemi grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artış göstermiştir. Sitikolin ve kolin tedavileri ile 24 saat sonunda tespit edilen toplam sepsis skorlarında ve değerlendirilen parametrelerde belirgin ölçüde iyileşme saptanmıştır. Sitikolin tedavisi genel görünüm ve solunum parametrelerini düzeltirken kolin tedavisi bilinç düzeyi, uyarana yanıt ve hareket parametrelerinde anlamlı bir iyileşmeye neden

olmuştur. Çalışmamızda bazal ve 24 saatlik protokol sonucundaki vücut ağırlıkları kaydedilerek endotoksin etkisine bağlı ağırlık kaybı değerlendirilmiştir. Bulgularımız endotoksemi grubunda tespit edilen vücut ağırlığındaki belirgin azalmanın tedavi gruplarında, istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmasa da kısmen azaldığını göstermektedir. Dalak dokusunun histomorfolojik analizi subletal doz lipopolisakkarid ile oluşturulan endotoksemi modelinde kolin ve sitikolin tedavileri alan hayvanlarda dokudaki yaygın, şiddetli kanama ve inflamasyonun ve toplam histomorfolojik hasar skorunun endotoksemi grubuna belirgin ölçüde azaldığını göstermiştir.

Beyin ve karaciğer dokularındaki COX-2 ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde endotoksemi grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Periferik bir doku olan karaciğerde COX-2 ekspresyonlarındaki endotoksin kaynaklı artış her iki tedavi grubunda anlamlı olarak azalmıştır. Periferik COX-2 ekspresyon değişimine uyumlu olarak sitikolin uygulanan grupta serum 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (stabil PGI_2 metaboliti), PGE_2 ve TXA_2 düzeylerinde anlamlı olarak azlmıştır. Kolin tedavisi uygulanan hayvanlarda ise prostaglandin düzeylerinde azalma tespit edilse de yalnızca PGE_2 düzeylerinde istatiksel anlamlılık elde edilmiştir. Santral etkiler değerlendirildiğinde, sitikolin tedavisi ile orta beyin dokusunda COX-2 ekspresyonunun endotoksemi grubuna göre anlamlı olarak değişmediği ancak kolin tedavisi ise orta beyin dokusunda COX-2 ekspresyonunun anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiştir. Sitikolin tedavisi alan endotoksemik hayvanlarda beyin dokusunda COX-2 ekspresyonunun endotoksemik sıçanlara kıyasla anlamlı düzeyde değişmediğini göstermekle birlikte, endotoksin kaynaklı TNFα ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Kolin tedavisi alan endotoksemik hayvanlarda ise TNFα ekspresyon düzeyleri beyin dokusunda azalmıştır. Serum TNFα düzeyleri ise her iki tedavi grubunda da azalmıştır.

Endotoksemik sıçanlarda intraperitoneal yol ile uygulanan sitikolin ve kolin tedavilerinin, kontrol grubuna kıyasla, serum ve beyin total kolin konsantrasyonlarını anlamlı ölçüde artırdığını göstermiş ve uygulama dozlarında gerçekleştirdikleri total kolin düzeylerindeki bu artışın sitikolin ve kolinin antiinflamatuvar etkilerine aracılık edebileceği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bulgularımız endotoksemik sıçanlarda sitikolin ve kolin tedavilerinin lipopolisakkarid uygulaması sonucunda artış gösteren COX-2 ekspresyonunu ve prostaglandin düzeylerini baskıladığını göstermiştir. Sitikolin ve kolin, iskemik ve travmatik beyin hasarı, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, bilişsel işlev bozuklukları ve madde bağımlılıkları gibi santral sinir sistemi rahatsızlıklarında çeşitli ülkelerde klinik olarak reçete edilen veya besin takviyesi olarak tavsiye edilen bir ilaçtır. Çalışmamız, sitikolin ve kolinin kolektif olarak pek çok çalışmadan elde edilen endotoksemi/sepsis tedavisindeki olumlu preklinik bulgularını inflamatuvar yanıta katkı sağlayan COX-2 yolu ve prostaglandinler üzerindeki baskılayıcı etkisini vurgulayarak desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. Annu Rev Pathol [Internet]. 2011;6:19–48. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887193
2. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. Mol Med [Internet]. 2003;9(5–8):125–34. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14571320
3. Cansev M, Ilcol Y, Yilmaz S, Hamurtekin E, H Ulus I. Peripheral administration of CDP-choline, phosphocholine or choline increases plasma adrenaline and noradrenaline concentrations. Auton Autacoid Pharmacol. 2008 Feb 1;28:41–58.
4. B. Weiss G. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. Vol. 56, Life sciences. 1995. 637–660 p.
5. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. J Lipid Res [Internet]. 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S423–8. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095631
6. Pan ZY, Wang H. Synergistic interaction between choline and aspirin against acute inflammation induced by carrageenan and lipopolysaccharide. Int Immunopharmacol [Internet]. 2014;20(1):229–37. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.03.004
7. Sevim Ç, Altinbas B, Yalcin M, Inan S, Özgür Özyiğit M, Arican İ, et al. Protective effect of CDP-choline on hypotension and tissue injury in septic shock model. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2017 Jan 1;64:103–10.
8. Yilmaz Z, Eralp Inan O, Kocaturk M, Baykal AT, Hacariz O, Hatipoglu I, et al. Changes in serum proteins after endotoxin administration in healthy and choline-treated calves. BMC Vet Res [Internet]. 2016 Sep 20;12:210. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27646125
9. Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yang L-H, et al. Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. Mol Med [Internet].

2008/06/20. 2008;14(9–10):567–74. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18584048

10. Ilcol YO, Yilmaz Z, Ulus IH. Endotoxin alters serum-free choline and phospholipid-bound choline concentrations, and choline administration attenuates endotoxin-induced organ injury in dogs. Shock. 2005;24(3):288–93.
11. Kumar V. Inflammasomes: Pandora's box for sepsis. J Inflamm Res [Internet]. 2018 Dec 11;11:477–502. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30588058
12. Coopersmith CM, Deutschman CS. The New Sepsis Definitions: Implications for the Basic and Translational Research Communities. Shock [Internet]. 2017;47(3). Available from: https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2017/03000/The_New_Sepsis_Definitions__Implications_for_the.2.aspx
13. Purcarea A, Sovaila S. Sepsis, a 2020 review for the internist. Rom J Intern Med. 2020;58(3):129–37.
14. Esposito S, De Simone G, Boccia G, De Caro F, Pagliano P. Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. 2017;10:204–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.06.013
15. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet [Internet]. 2020;395(10219):200–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7
16. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. BMJ [Internet]. 2016;353:i585. Available from: https://www.bmj.com/content/353/bmj.i1585
17. Lelubre C, Vincent J-L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. Nat Rev Nephrol [Internet]. 2018;14(7):417–27. Available from: https://doi.org/10.1038/s41581-018-0005-7
18. André P, Laugerette F, Féart C. Metabolic Endotoxemia: A Potential Underlying Mechanism of the Relationship between Dietary Fat Intake and

Risk for Cognitive Impairments in Humans? Nutrients [Internet]. 2019 Aug 13;11(8):1887. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31412673

19. Raymond SL, Holden DC, Mira JC, Stortz JA, Loftus TJ, Mohr AM, et al. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. Biochim Biophys acta Mol basis Dis. 2017 Oct;1863(10 Pt B):2564–73.
20. Arens C, Bajwa SA, Koch C, Siegler BH, Schneck E, Hecker A, et al. Sepsis-induced long-term immune paralysis--results of a descriptive, explorative study. Crit Care. 2016 Feb;20:93.
21. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol [Internet]. 2010;11(5):373–84. Available from: https://doi.org/10.1038/ni.1863
22. Wu Y, Yao Y-M, Lu Z-Q. Mitochondrial quality control mechanisms as potential therapeutic targets in sepsis-induced multiple organ failure. J Mol Med (Berl). 2019 Apr;97(4):451–62.
23. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. Viruses. 2011 Jun;3(6):920–40.
24. Vincent J-L, Moreno R. Clinical review: scoring systems in the critically ill. Crit Care. 2010;14(2):207.
25. Font MD, Thyagarajan B, Khanna AK. Sepsis and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. Med Clin North Am. 2020 Jul;104(4):573–85.
26. Huang M, Cai S, Su J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Oct 29;20(21):5376. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31671729
27. Keegan MT, Gajic O, Afessa B. Severity of illness scoring systems in the intensive care unit. Crit Care Med. 2011 Jan;39(1):163–9.
28. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb;315(8):775–87.
29. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer

M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb;315(8):801–10.

30. Kilinc Toker A, Kose S, Turken M. Comparison of SOFA Score, SIRS, qSOFA, and qSOFA + L Criteria in the Diagnosis and Prognosis of Sepsis. Eurasian J Med. 2021 Feb;53(1):40–7.
31. Markanday A. Acute Phase Reactants in Infections: Evidence-Based Review and a Guide for Clinicians. Open forum Infect Dis. 2015 Sep 1;2:ofv098.
32. Shusterman N, Kimmel PL, Kiechle FL, Williams S, Morrison G, Singer I. Factors influencing erythrocyte sedimentation in patients with chronic renal failure. Arch Intern Med. 1985 Oct;145(10):1796–9.
33. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. J Clin Invest. 2003 Jun;111(12):1805–12.
34. Gilbert DN. Procalcitonin as a biomarker in respiratory tract infection. Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am. 2011 May;52 Suppl 4:S346-50.
35. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am. 2004 Jul;39(2):206–17.
36. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. Crit Care Med. 2021 Nov;49(11):e1063–143.
37. Howell MD, Davis AM. Management of Sepsis and Septic Shock. JAMA. 2017 Feb;317(8):847–8.
38. Rochwerg B, Alhazzani W, Sindi A, Heels-Ansdell D, Thabane L, Fox-Robichaud A, et al. Fluid resuscitation in sepsis: a systematic review and network meta-analysis. Ann Intern Med. 2014 Sep;161(5):347–55.
39. Rochwerg B, Alhazzani W, Gibson A, Ribic CM, Sindi A, Heels-Ansdell D, et al. Fluid type and the use of renal replacement therapy in sepsis: a systematic review and network meta-analysis. Intensive Care Med. 2015 Sep;41(9):1561–71.
40. Raghunathan K, Bonavia A, Nathanson BH, Beadles CA, Shaw AD, Brookhart MA, et al. Association between Initial Fluid Choice and Subsequent In-hospital

Mortality during the Resuscitation of Adults with Septic Shock. Anesthesiology. 2015 Dec;123(6):1385–93.

41. De Backer D, Aldecoa C, Njimi H, Vincent J-L. Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: a meta-analysis*. Crit Care Med. 2012 Mar;40(3):725–30.
42. Patel GP, Grahe JS, Sperry M, Singla S, Elpern E, Lateef O, et al. Efficacy and safety of dopamine versus norepinephrine in the management of septic shock. Shock. 2010 Apr;33(4):375–80.
43. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. Am J Med. 2003 Nov;115(7):529–35.
44. Savage RD, Fowler RA, Rishu AH, Bagshaw SM, Cook D, Dodek P, et al. Pathogens and antimicrobial susceptibility profiles in critically ill patients with bloodstream infections: a descriptive study. C open. 2016;4(4):E569–77.
45. Baris E, Arıcı MA, Hamurtekin E. The Role of Nicotinic Anti-inflammatory Pathway in Prostaglandin Mediated Inflammatory Response in Sepsis: A short review. Clin Exp Heal Sci. 2019;
46. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. J Exp Med [Internet]. 2002 Mar 18;195(6):781–8. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901203
47. Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature [Internet]. 2000 May 25;405:458. Available from: https://doi.org/10.1038/35013070
48. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella C, Tanovic M, Susarla S (Seenu, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature. 2003 Feb 1;421:384–8.
49. Xue Zhao Y, He W, Jing X-H, Ling Liu J, Rong P-J, Ben H, et al. Transcutaneous Auricular Vagus Nerve Stimulation Protects Endotoxemic Rat from Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. Vol. 2012, Evidence-based

complementary and alternative medicine : eCAM. 2012. 627023 p.

50. Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, et al. Selective α7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. Crit Care Med. 2007;35(4):1139–44.
51. Westerloo D, A J Giebelen I, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno M, F de Vos A, et al. The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Regulates the Host Response during Septic Peritonitis. Vol. 191, The Journal of infectious diseases. 2005. 2138–2148 p.
52. Yeboah MM, Xue X, Javdan M, Susin M, Metz CN. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Renal Physiol [Internet]. 2008/07/09. 2008 Sep;295(3):F654–61. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18614620
53. Ulus IH, Cansev M. Kolin'in Merkezi ve Periferik Kolinerjik Nöronlarda ve Kolinerjik İletimdeki İşlevi. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim Derg [Internet]. 2010;1(7). Available from: https://docplayer.biz.tr/3885720-Kolin-in-merkezi-ve-periferik-kolinerjik-noronlarda-ve-kolinerjik-iletimdeki-islevi.html
54. McMaster CR. From yeast to humans – roles of the Kennedy pathway for phosphatidylcholine synthesis. FEBS Lett [Internet]. 2018 Apr 1;592(8):1256–72. Available from: https://doi.org/10.1002/1873-3468.12919
55. Von V, Krahmer N. Analysis of Lipid Droplet Proteins and their Contribution to Phospholipid Homeostasis during Lipid Droplet Expansion. 2021 Oct 12;
56. Synoradzki K, Grieb P. Citicoline: A Superior Form of Choline? Nutrients [Internet]. 2019 Jul 12;11(7):1569. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31336819
57. Ilcol Y, Cansev M, Yilmaz S, Hamurtekin E, H Ulus I. Intraperitoneal administration of CDP-choline and its cholinergic and pyrimidinergic metabolites induce hyperglycemia in rats: Involvement of the sympathoadrenal system. Arch Physiol Biochem. 2007 Oct 1;113:186–201.
58. Savci V, Goktalay G, Cansev M, Cavun S, Yilmaz S, H. Ulus I. Intravenously

injected CDP-choline increases blood pressure and reverses hypotension in haemorrhagic shock: Effect is mediated by central cholinergic activation. Eur J Pharmacol. 2003 May 1;468:129–39.

59. H. Ulus I, J. Hirsch M, Wurtman J. TransSynaptic Induction of Adrenomedullary Tyrosine Hydroxylase Activity by Choline: Evidence that Choline Administration Can Increase Cholinergic Transmission. Vol. 74, Proceedings of The National Academy of Sciences - PNAS. 1977. 798–800 p.
60. H Ulus I, C Scally M, Wurtman J. Enhancement by choline of the induction of adrenal tyrosine hydroxylase by phenoxybenzamine, 6-hydroxydopamine, insulin or exposure to cold. Vol. 204, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 1978. 676–682 p.
61. Adib-Conquy M, Cavaillon J-M. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. FEBS Lett [Internet]. 2007;581(19):3723–33. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579307003523
62. Adibhatla RM. Citicoline in stroke and TBI clinical trials. Nat Rev Neurol [Internet]. 2013;9(3):173. Available from: https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.166-c1
63. Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Does CDP-choline modulate phospholipase activities after transient forebrain ischemia? Brain Res [Internet]. 2001;893(1):268–72. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899300032807
64. Dixon CE, MA X, MARION DW. Effects of CDP-Choline Treatment on Neurobehavioral Deficits after TBI and on Hippocampal and Neocortical Acetlycholine Release. J Neurotrauma [Internet]. 1997;14(3):161–9. Available from: https://doi.org/10.1089/neu.1997.14.161
65. K. Başkaya M, Dogan A, Adibhatla R, J. Dempsey R. Neuroprotective effects of citicoline on brain edema and blood-brain barrier breakdown after traumatic brain injury. Vol. 92, Journal of neurosurgery. 2000. 448–452 p.
66. Liu T, Luo W, Tan X, Fang Y, Chen J, Zhang H, et al. A Novel Contrast-Induced Acute Kidney Injury Model Based on the 5/6-Nephrectomy Rat and Nephrotoxicological Evaluation of Iohexol and Iodixanol In Vivo . Oxid Med

Cell Longev. 2014;2014:1–14.

67. Bagdas D, Sonat FA, Hamurtekin E, Sonal S, Gurun MS. The antihyperalgesic effect of cytidine-5′-diphosphate-choline in neuropathic and inflammatory pain models. Behav Pharmacol. 2011;22(5–6):589–98.
68. Gurun M, Parker R, C Eisenach J, Vincler M. The Effect of Peripherally Administered CDP-Choline in an Acute Inflammatory Pain Model: The Role of α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. Anesth Analg. 2009 Jun 1;108(5):1680–7.
69. Gurun M, Hamurtekin E. The antinociceptive effects of centrally administered CDP- choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. Brain Res., 1117, 92-100. Brain Res. 2006 Jan 1;(1117):92–100.
70. Yilmaz Z, Ilcol YO, Torun S, Ulus IH. Intravenous administration of choline or CDP-choline improves platelet count and platelet closure times in endotoxin-treated dogs. Shock. 2006;25(1):73–9.
71. Li XD, Buccafusco JJ. Role of α7 Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Pressor Response to Intracerebroventricular Injection of Choline: Blockade by Amyloid Peptide Aβ1-42. J Pharmacol Exp Ther [Internet]. 2004 Jun 1;309(3):1206 LP – 1212. Available from: http://jpet.aspetjournals.org/content/309/3/1206.abstract
72. Yilmaz Z, Ilcol Y, Cansev M, Eralp Inan O, Kocatürk M, H Ulus I. Choline or CDP-choline attenuates coagulation abnormalities and prevents the development of acute disseminated intravascular coagulation in dogs during endotoxemia. Blood Coagul Fibrinolysis. 2010 Jun 1;21(4):339–48.
73. Coskun C, Avci B, Yalcin M, Yermezler A, Yilmaz S, Savci V. Protective effect of CDP-choline on ischemia-reperfusion-induced myocardial tissue injury in rats. Ir J Med Sci. 2013 Nov 29;183:539–48.
74. Schmidt K, Frederick Hernekamp J, Doerr M, Zivkovic A, Brenner T, Walther A, et al. Cytidine-5-diphosphocholine reduces microvascular permeability during experimental endotoxemia. BMC Anesthesiol. 2015 Aug 3;15:114–22.
75. Pereira MR, Leite PEC. The Involvement of Parasympathetic and Sympathetic Nerve in the Inflammatory Reflex. J Cell Physiol [Internet]. 2016 Sep 1;231(9):1862–9. Available from: https://doi.org/10.1002/jcp.25307

76. Mardini I, Fitzgerald G. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. Mol Interv. 2001 May 1;1:30–8.
77. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]. 2011 May;31(5):986–1000. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508345
78. Engblom D, Saha S, Engström L, Westman M, Audoly LP, Jakobsson P-J, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. Nat Neurosci [Internet]. 2003 Oct 19;6:1137. Available from: https://doi.org/10.1038/nn1137
79. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacol Ther [Internet]. 2004;103(2):147–66. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725804000968
80. Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, et al. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. J Neurochem. 2007 Apr 1;101:397–410.
81. Wu KK, Liou JY. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. Biochem Biophys Res Commun. 2005;338(1):45–52.
82. W. Berkenkopf J, M. Weichman B. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: Its role in the writhing response. Vol. 36, Prostaglandins. 1988. 693–709 p.
83. Arrigoni E, Avéret N, Cohadon F. Effects of CDP-choline on phospholipase A2 and cholinephosphotransferase activities following a cryogenic brain injury in the rabbit. Biochem Pharmacol. 1987 Dec 1;36:3697–700.
84. De Simone R, Ajmone-Cat M, Carnevale D, Minghetti L. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures. J Neuroinflammation. 2005 Feb 1;2:4–13.
85. Nørregaard R, Kwon T-H, Frøkiær J. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. Kidney Res Clin Pract

[Internet]. 2015/11/12. 2015 Dec;34(4):194–200. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26779421

86. Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D. Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? J Cell Mol Med [Internet]. 2008/07/24. 2009 Sep;13(9B):3753–63. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18657230

87. Tunctan B, Ozveren E, Korkmaz B, Buharalıoğlu C, Tamer L, Degirmenci U, et al. Nitric oxide reverses endotoxin-induced inflammatory hyperalgesia via inhibition of prostacyclin production in mice. Pharmacol Res. 2006 Mar 1;53:177–92.

88. Tunctan B, Korkmaz B, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Serin MS, et al. Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91(phox) to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. Nitric oxide Biol Chem [Internet]. 2013/05/14. 2013 Sep 1;33:18–41. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684565

89. Ilcol YO, Yilmaz Z, Cansev M, Ulus IH. Choline or CDP-choline alters serum lipid responses to endotoxin in dogs and rats: Involvement of the peripheral nicotinic acetylcholine receptors. Shock. 2009;32(3):286–94.

90. Biesmans S, Matthews LJR, Bouwknecht JA, De Haes P, Hellings N, Meert TF, et al. Systematic Analysis of the Cytokine and Anhedonia Response to Peripheral Lipopolysaccharide Administration in Rats. Biomed Res Int. 2016;2016.

91. Shrum B, Anantha R V., Xu SX, Donnelly M, Haeryfar SMM, McCormick JK, et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. BMC Res Notes [Internet]. 2014;7(1):1–11. Available from: BMC Research Notes

92. Ozer EK, Goktas MT, Kilinc I, Pehlivan S, Bariskaner H, Ugurluoglu C, et al. Coenzyme Q10 improves the survival, mesenteric perfusion, organs and vessel functions in septic rats. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017;91:912–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.017

93. Udvari E, Völgyi K, Gulyassy P, Dimén D, Kis V, Barna J, et al. Synaptic proteome changes in the hypothalamus of mother rats. J Proteomics. 2017 Mar 1;159:54–66.
94. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402–8.
95. Lawrence CB, Brough D, Knight EM. Obese mice exhibit an altered behavioural and inflammatory response to lipopolysaccharide. DMM Dis Model Mech. 2012;5(5):649–59.
96. Huet O, Ramsey D, Miljavec S, Jenney A, Aubron C, Aprico A, et al. Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock. Shock. 2013;39(6):488–94.
97. Kistemaker LEM, Slebos D-J, Meurs H, Kerstjens HAM, Gosens R. Anti-inflammatory effects of targeted lung denervation in patients with COPD. Eur Respir J [Internet]. 2015 Nov 1;46(5):1489 LP – 1492. Available from: http://erj.ersjournals.com/content/46/5/1489.abstract
98. Yamada M, Ichinose M. The cholinergic pathways in inflammation: A potential pharmacotherapeutic target for COPD. Front Pharmacol. 2018;9(December):1–9.
99. Kocaturk M, Yilmaz Z, Cansev M, Ozarda Y, Ceron JJ, Buturak A, et al. Choline or CDP-choline restores hypotension and improves myocardial and respiratory functions in dogs with experimentally – Induced endotoxic shock. Res Vet Sci [Internet]. 2021;141(September 2020):116–28. Available from: https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.10.010
100. Pacelli C, Coluccia A, Grattagliano I, Cocco T, Petrosillo G, Paradies G, et al. Dietary Choline Deprivation Impairs Rat Brain Mitochondrial Function and Behavioral Phenotype. J Nutr. 2010;140(6):1072–9.
101. Idrus NM, Breit KR, Thomas JD. Dietary choline levels modify the effects of prenatal alcohol exposure in rats. Neurotoxicol Teratol [Internet]. 2016/11/23. 2017;59:43–52. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27888055
102. Zaghloul N, Addorisio ME, Silverman HA, Patel HL, Valdés-Ferrer SI,

Ayasolla KR, et al. Forebrain cholinergic dysfunction and systemic and brain inflammation in murine sepsis survivors. Front Immunol. 2017;8(DEC):1673–83.

103. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. Curr Neuropharmacol [Internet]. 2016;14(1):101–15. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26813123
104. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. Sci Rep [Internet]. 2019;9(1):1–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8
105. Zhang M, Han X, Bao J, Yang J, Shi SQ, Garfield RE, et al. Choline Supplementation During Pregnancy Protects Against Gestational Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses. Reprod Sci. 2018;25(1):74–85.
106. Munyaka P, Rabbi MF, Pavlov VA, Tracey KJ, Khafipour E, Ghia J-E. Central muscarinic cholinergic activation alters interaction between splenic dendritic cell and CD4+CD25- T cells in experimental colitis. PLoS One. 2014;9(10):e109272.
107. Zazueta C, Buelna-Chontal M, Macías-López A, Román-Anguiano NG, González-Pacheco H, Pavón N, et al. Cytidine-5'-Diphosphocholine Protects the Liver From Ischemia/Reperfusion Injury Preserving Mitochondrial Function and Reducing Oxidative Stress. Liver Transplant [Internet]. 2018 Aug 1;24(8):1070–83. Available from: https://doi.org/10.1002/lt.25179
108. Ozer EK, Goktas MT, Kilinc I, Bariskaner H, Ugurluoglu C, Iskit AB. Celecoxib administration reduced mortality, mesenteric hypoperfusion, aortic dysfunction and multiple organ injury in septic rats. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017;86:583–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.102
109. Topuz BB, Altinbas B, Ilhan T, Yilmaz MS, Erdost H, Saha S, et al. Centrally administered CDP-choline induced cardiovascular responses are mediated by activation of the central phospholipase-prostaglandin signaling cascade. Brain

Res [Internet]. 2014;1563:61–71. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.03.040

110. De Simone R, Ajmone-Cat MA, Carnevale D, Minghetti L. Activation of α7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures. Vol. 2, Journal of Neuroinflammation. 2005.
111. Cui Z, Houweling M. Phosphatidylcholine and cell death. Biochim Biophys Acta. 2002 Dec;1585(2–3):87–96.
112. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. Biochim Biophys Acta. 2000 Oct;1488(1–2):1–19.
113. Tan TL, Goh YY. The role of group IIA secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as a biomarker for the diagnosis of sepsis and bacterial infection in adults-A systematic review. PLoS One [Internet]. 2017 Jul 3;12(7):e0180554–e0180554. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28671974
114. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. Neurochem Int. 2008 Feb;52(3):447–56.
115. Ledderose C, Bao Y, Kondo Y, Fakhari M, Slubowski C, Zhang J, et al. Purinergic Signaling and the Immune Response in Sepsis: A Review. Clin Ther [Internet]. 2016;38(5):1054–65. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291816302235
116. Adibhatla RM, Hatcher JF. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. Neurochem Res. 2005 Jan;30(1):15–23.
117. Ulus IH, Millington WR, Buyukuysal RL, Kiran BK. Choline as an agonist: Determination of its agonistic potency on cholinergic receptors. Biochem Pharmacol [Internet]. 1988;37(14):2747–55. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006295288900378
118. Köppen A, Klein J, Holler T, Löffelholz K. Synergistic effect of nicotinamide and choline administration on extracellular choline levels in the brain. J Pharmacol Exp Ther [Internet]. 1993 Aug 1;266(2):720 LP – 725. Available from: http://jpet.aspetjournals.org/content/266/2/720.abstract

119. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor α7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature [Internet]. 2002 Dec 22;421:384–8. Available from: https://doi.org/10.1038/nature01339
120. Bagdas D, Gurun MS, Flood P, Papke RL, Damaj MI. New Insights on Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors as Targets for Pain and Inflammation: A Focus on α7 nAChRs. Vol. 16, Current Neuropharmacology. 2018. p. 415–25.
121. Wang Y, Su D-M, Wang R-H, Liu Y, Wang H. Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. Neuroscience [Internet]. 2005;132(1):49–56. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452205000606
122. Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, Lanas A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. Best Pract Res Clin Gastroenterol [Internet]. 2010;24(2):121–32. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521691809001589
123. Rane MA, Gitin A, Fiedler B, Fiedler L, Hennekens CH. Risks of Cardiovascular Disease and Beyond in Prescription of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. J Cardiovasc Pharmacol Ther [Internet]. 2019 Aug 29;25(1):3–6. Available from: https://doi.org/10.1177/1074248419871902
124. Fioravanti M, Buckley AE. Citicoline (Cognizin) in the treatment of cognitive impairment. Clin Interv Aging [Internet]. 2006;1(3):247–51. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046877
125. Fioravanti M, Yanagi M, Fioravanti M, Yanagi M. Cytidinediphosphocholine (CDP-choline) for cognitive and behavioural disturbances associated with chronic cerebral disorders in the elderly (Review) Cytidinediphosphocholine (CDP-choline) for cognitive and behavioural disturbances associated with ch. 2010;(1):1–3.
126. Wignall ND, Brown ES. Citicoline in addictive disorders: a review of the literature. Am J Drug Alcohol Abuse [Internet]. 2014/06/20. 2014 Jul;40(4):262–8. Available from:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24950234

8. EKLER

Ek 1. 12 Aralık 2017 toplantı tarihli ve 23/2019 protokol numaralı Etik Kurul Kararı

Ek 1.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURU

35340, İnciraltı, İzmir-Tel: 0232 4122234

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 01/10/2018
Toplantı Tarihi : 22 Mayıs 2018

Sayın, Prof.Dr.Ayşe GELAL
DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

51/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz **"Sıçanlarda Lipopolisakkarid ile Oluşturulan İnflamatuvar Yanıta Sitikolin ve Kolinin Araşidonik Asit Yolak Aracılı Etkisi"** isimli; Metiner Tosun, Emre Hamurtekin, Şeyma Öncü, Zeynep Yüce, Hande Efe ve Elif Barış'ın araştırıcı olduğu, 56 Wistar Albino'nun verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilen projede; gönderilen belgeler incelenerek, Mualla Aylin Arıcı'nın projeye araştırıcı olarak katılması hususunda bilgi edinilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof.Dr.Ali Necati GOKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye

Prof.Dr. Türkan ERTAY
Üye

Prof.Dr.Pembe UYGUN/KESKİNOĞLU
Danışman

Prof.Dr. Neraiz DURMUŞ

ProfDr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye (Topl.Katılamadı)

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye (Topl.Katılamadı)

Doç.Dr.Orhan KALEMCİ
Üye (Topl.Katılamadı)

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin proje başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340 İnciraltı İzmir-T: 0 232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 02/12/2019
Toplantı Tarihi : 27 Haziran 2019

Sayın, Doç.Dr.Aylin ARICI
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

51/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Sıçanlarda Lipopolisakkarid ile Oluşturulan İnflamatuvar Yanıta Sitikolin ve Kolinin Araşidonik Asit Yolak Aracılı Etkisi" isimli, Metiner Tosun, Emre Hamurtekin, Zeynep Yüce, Hande Efe, Ayşe Gelal, Şeyma Öncü, Oğuzhan Şimşek, Seda Özbal ve Elif Barış'ın araştırıcı olduğu, 56 adet Wistar Albino sıçanın verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verilen projede; gönderilen belgeler incelenerek, 5(beş) adet Wistar Albino erkek sıçan verilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof.Dr.Ali Necati GOKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye

Prof.Dr.Neraiz DÜRMUŞ

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman

Prof.Dr.Gamze ÇAPA KAYA
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Semra KOÇTÜRK
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN
Üye (Topl.Katılamadı)

Doç.Dr.Sefa KURT
Üye

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

9. KATKI

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2017.KB.SAG.010 sayı ile desteklenmiştir.

10. ÖZGEÇMİŞ



ELİF BARIŞ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

14 Eylül 2017 - Şu Anda (4 yıl 5 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FARMAKOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.88 / 4.0

01 Eylül 2011 - 01 Ocak 2017 (5 yıl 5 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, DOĞU AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
ECZACILIK FAKÜLTESİ, ECZACILIK PR. (İNGİLİZCE) (T.C. VATANDAŞLARI) (ÜCRETLİ)
Diploma Numarası: 110649
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.65 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Mart 2017 - Şu Anda (4 yıl 11 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, İZMİR EKONOMİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Kitaplar

A. B. DEMİR & E. BARIŞ, Moleküler Genetik Teknolojiler, Y. KİMYA & N. DEMİR [Editörler], Creasy&Resnik?s Maternal-Fetal Tıp: İlkeler ve Uygulama (15 - 38), ISBN: 978-975-277-856-6: Güneş Tıp Kitap Evi, 01 Ocak 2022, Kitapta Bölüm.

Makaleler

E. BARIŞ, M. GÜMÜŞTEKİN & M. A. ARICI, COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçların güvenliliği, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2021, 1300-6622, 35, 35, 19-33.

E. BARIS, O. SİMSEK, H. EFE, S. ONCU, A. GELAL, E. HAMURTEKİN, M. TOSUN, S. OZBAL, Z. YUCE & M. A. ARICI, Effects of CDP-Choline and Choline on COX Pathway in LPS-Induced Inflammatory Response in Rats, INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACOLOGY, 2021, 1811-7775, 17, 2, 86-96.

E. BARIŞ, Possible Therapeutic Role Of Cholinergic Agonists On Covid-19 Related Inflammatory Response, The Journal of Basic and Clinical Health Sciences , 2021, 2458-8938, 5, 1, 102-105.

E. BARİS, H. EFE, M. GUMUSTEKIN, M. A. ARİCİ & M. TOSUN, Varenicline Prevents LPS-Induced Inflammatory Response via Nicotinic Acetylcholine Receptors in RAW 264.7 Macrophages, FRONTIERS IN MOLECULAR BIOSCIENCES, 2021, 2296-889X, 8.

E. BARIŞ, THE ROLE OF NICOTINIC ANTI-INFLAMMATORY PATHWAY IN PROSTAGLANDIN MEDIATED INFLAMMATORY RESPONSE IN SEPSIS: A short review, Clinical and Experimental Health Sciences, 2019, 2459-1459, 9, 4, 350-357.

Bildiriler

E. BARIŞ, O. ŞİMŞEK, M. A. ARICI & M. TOSUN, Choline and CDP-choline ameliorate oxidative stress in acute kidney injury in rat endotoxemia model, Poster Sunumu, 8th European Congress of Pharmacology-EPHAR 2021, 06 Aralık 2021, 08 Aralık 2021.

O. ŞİMŞEK, E. BARIŞ, C. İNCİR, S. AYDEMİR, C. URAL, M. GÜMÜŞTEKİN, Z. ÇAVDAR, O. YILMAZ, S. ÖZBAL & M. A. ARICI, The NF-KB, NOX4 and p22phox Expression Mediated Effect of Montelukast in Preventing Radiocontrast Agent Nephropathy in Rats, Poster Sunumu, 26th National and 1 st International Pharmacology Congress, 04 Kasım 2021, 06 Kasım 2021.

E. BARIŞ, I. ÜSTÜNKOL, G. UTKUGÜN, O. ŞİMŞEK, E. AKALIN, E. HAMURTEKİN, A. GELAL, Ş. R. UÇKU & M. A. ARICI, "Plasma choline levels and the relation with leptin in patients with fibromyalgia syndrome: case-control study, interim analysis results, Poster Sunumu, 26th National and 1st International Pharmacology Congress , 04 Kasım 2021, 06 Kasım 2021.

E. BARIŞ, Sıçanlarda Lipopolisakkarit ile Oluşturulan Sepsis Modelinde Kolin ve Sitikolinin Etkileri, Poster Sunumu, 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi 9. Klinik Farmakoloji Sempozyumu ve 8. Klinik Toksikoloji Sempozyumu, 04 Kasım 2019, 07 Kasım 2019.

E. BARIŞ, A. B. DEMİR & M. TOSUN, Raw 264.7 Makrofaj Hücrelerinde Kinurenik Asit Ve Kolinin Sinerjistik Antiproliferatif Etkisi, Poster Sunumu, Iv. Türkiye In Vitro Diyagnostik Sempozyumu- Biyosensörler, 20 Şubat 2019, 22 Şubat 2019.

E. BARIŞ, A. B. DEMİR & M. TOSUN, Raw 264.7 Makrofaj Hücrelerinde Kolinin Antiproliferatif Ve Antimigratif Etkileri, Poster Sunumu, 7.onkolojide Arayışlar Sempozyumu, 30 Kasım 2018, 02 Aralık 2018.

E. ALAN, G. SEVİN, S. YILMAZ, E. BARIŞ, J. ZİGA, T. TİHOMİR & G. ANACAK, Resveratrol analog induces hydrogen sulfide formation and vasorelaxation., Poster Sunumu, A bridge between EpiChemBio and MuTaLig COST Actions, 22 Ekim 2017, 24 Ekim 2017.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Fibromiyaljili hastalarda Plazma Kolin düzeyleri ve Leptin ile ilişkisi; olgu-kontrol çalışması , Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), BURSIYER, Hepatoselüler karsinoma hücre hatlarının Doksorubisin hassasiyetini arttırmaya yönelik TOLLIP geninin Doksorubisin dirençliliğindeki rolünün belirlenmesi. , Yürütülen Kuruluş: TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI, Destek Alınan Kuruluş: TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, RAW264.7 Makrofaj Hücrelerinde Endotoksin ile Oluşturulan in vitro Sepsis Modelinde Kolin ve Kininerik Asitin ?7 Nikotinik Asetilkolin Reseptörü Aracılı Etkileri, Yürütülen Kuruluş: TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI, Destek Alınan Kuruluş: İZMİR EKONOMİ ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Kasım 2019, 01 Nisan 2021.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Sıçanlarda Radyokontrast Madde Nefropatisini Önlemede Montelukast?in NF-Kb, Nos4 ve P22 Phox Ekspresyonu Aracılı Etkisi, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Ocak 2020, 01 Ocak 2021.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Sıçanlarda Lipopolisakkarid ile Oluşturulan İnflamatuvar Yanıta Silikolin ve Kolinin Araşidonik Asit Yolak Aracılı Etkisi , Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2018, 01 Aralık 2019.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Raw 264.7 Makrofaj Hücre Kültüründe Lipopolisakkarid ile Oluşturulan İn Vitro Sepsis Modelinde Vareniklinin İnflamasyon ve Migrasyon Süreçleri Üzerine Alfa7 Nikotinik Asetilkolin Reseptörü Aracılı Etkileri., Yürütülen Kuruluş: TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI, Destek Alınan Kuruluş: TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI (Yurt İçi) , 01 Şubat 2019, 01 Eylül 2019.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

1195936, Raw 264.7 Makrofaj Hücre Kültüründe Lipopolisakkarid ile Oluşturulan İn Vitro Sepsis Modelinde Vareniklinin İnflamasyon ve Migrasyon Süreçleri Üzerine Alfa7 Nikotinik Asetilkolin Reseptörü Aracılı Etkileri, 1002 - Hızlı Destek, Araştırmacı/Uzman, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.02.2020 - 01.11.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.02.2020 - 01.11.2020.
119Z221, Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hatlarının Doksorubisin Hassasiyetini Arttırmaya Yönelik TOLLIP Geninin Doksorubisin Dirençliliğindeki Rolünün Belirlenmesi, 3501 - Kariyer, Bursiu, Yürürlükte, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 29.03.2021 - 01.02.2023, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.02.2020 - 01.02.2023.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Diş Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0