



**T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA ÇEKAL BAĞLAMA VE DELME YÖNTEMİ İLE
İNDÜKLENEN SEPSİS MODELİNDE ROSUVASTATİNİN
AKCİĞER DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Safiye İnşira YILDIZ

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM**

**RİZE
2023**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında, Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM danışmanlığında, Safiye İnşira YILDIZ tarafından hazırlanan *Sıçanlarda Çekal Bağlama ve Delme Yöntemi ile İndüklenen Sepsis Modelinde Rosuvastatinin Akciğer Dokusu Üzerine Etkisi* adlı bu tez çalışması, 30/12/2022 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı SOYADI	İmza
Başkan	: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCİ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN	

ETİK BEYAN

Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Sıçanlarda Çekal Bağlama ve Delme Yöntemi ile İndüklenen Sepsis Modelinde Rosuvastatinin Akciğer Dokusu Üzerine Etkisi” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

30/12/2022

Safiye İnşira YILDIZ

ÖN SÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimim süresince bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında ve tamamlanmasında beni destekleyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM'a;

Bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL'e, Dr. Öğr. Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi İhsan NALKIRAN'a;

Hayatımın her aşamasında sabır, sevgi ve fedakârlıkla tüm kararlarımı destekleyip bana yol gösteren kıymetli dedem Mehmet YILDIZ'a, anneannem Sabire YILDIZ'a, annem Birgül YILDIZ'a, babam İbrahim YILDIZ'a ve biricik kardeşim Beria Azra YILDIZ'a; teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Tezim TYL-2021-1289 nolu proje ile BAP Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Safiye İnşira YILDIZ
2023/RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
TÜRKÇE ÖZET	XIV
ABSTRACT	XV
KISALTMALAR	XI
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
GİRİŞ	1
1.GENEL BİLGİLER	2
1.1. Sepsis	2
1.1.1. Sepsis Epidemiyolojisi	3
1.1.2. Sepsis Patofizyolojisi	4
1.1.2.1. Oksidatif Stres	5
1.1.2.1.1. Malondialdehit (MDA)	6
1.1.2.1.2. Glutasyon	6
1.1.2.1.3. 8-OHdG	7
1.1.2.2. Hücre Hasarı	7
1.1.2.3. İnflamasyon	9
1.1.2.3.1. TNF- α	10
1.1.2.3.2. NFkB/p65	11
1.1.2.4. Apoptoz	11
1.1.2.4.1. Bcl-2	13

1.1.2.4.2. Bax	13
1.1.2.4.3. Kaspas-3	14
1.1.2.5. Otofaji	14
1.1.2.5.1. Beclin-1	15
1.1.2.5.2. LC-3	16
1.1.3. Sepsis ve Septik Şokta Prognoz	16
1.1.4. Sepsis ve Septik Şokta Tanı ve Tedavi	16
1.1.5. Septik Akciğer Hasarı	17
1.1.6. Deneysel Sepsis Modelleri	17
1.1.6.1. Çekal Bağlama ve Delme Yöntemi	18
1.2. Statinler	19
1.2.1. Statinlerin Antioksidan ve Antienflamatuvar Etkileri	20
1.2.2. Rosuvastatin	20
1.2.2.1. Rosuvastatinin Moleküler Yapısı ve Genel Özellikleri	20
1.2.2.2. Temel Etki Mekanizması, Doku ve Organlar Üzerine Etkisi	21
1.2.2.3. Kardiyovasküler Sistem ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisi	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Gereç	22
2.1.1. Alet ve Cihazlar	22
2.1.2. Kimyasal Malzemeler	24
2.1.3. Çözeltiler	25
2.2. Yöntem	26
2.2.1. Deney Hayvanları ve Grupları	26
2.2.2. Çekal Bağlama ve Delme Yöntemi	27
2.2.3. Moleküler Genetik Analizler	30
2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu ve RNA İzolasyonu	30
2.2.3.2. RNA Örneklerinin Saflık ve Konsantrasyon Analizi	31
2.2.3.3. Agoroz Jel Elektrophorez Analizi	31

2.2.3.4. cDNA Sentez	32
2.2.3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time-PCR, QRT-PCR)	33
2.2.4. Histolojik Analizler	37
2.2.4.1. Doku Takibi ve Kesit Alma İşlemleri	37
2.2.4.2. Hemotoksilen ve Eozin (H&E) Boyama	38
2.2.4.3. İmmunohistokimyasal (IHC) Analiz	39
2.2.4.4. Yarı Kantitatif Analiz	41
2.2.5. Biyokimyasal Analizler	44
2.2.5.1. Doku Homojenizasyonu	44
2.2.5.2. Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi	44
2.2.5.3. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analizi	45
2.2.6. İstatiksel Analizler	46
3. BULGULAR	47
3.1. Histolojik Bulgular	47
3.1.1. Hemotoksilen Eozin (H&E) Boyama Bulguları	47
3.1.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	51
3.1.2.1. Kaspas-3 Antikor Boyama Bulguları	52
3.1.2.2. NFkB/p65 Antikor Boyama Bulguları	54
3.1.2.3. Anti-8-OHdG Antikor Boyama Bulguları	55
3.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları	57
3.2.1. Malondialdehit (MDA) Analiz Bulguları	57
3.2.2. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analiz Bulguları	58
3.3. Moleküler Genetik Analiz Bulguları	60
3.3.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analiz Bulguları	60
3.3.2. AgaroZ Jel Elektroforez bulguları	65
4. TARTIŞMA	64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKÇA	74

EKLER	82
ETİK KURUL KARARI	87



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Sepsis etiyolojisinde yer alan başlıca mikroorganizmalar	4
Tablo 2. cDNA reaksiyon bileşen ve hacimler	32
Tablo 3. Thermal cycler koşulları	33
Tablo 4. Gen primer dizileri	34
Tablo 5. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve hacimleri	35
Tablo 6. qRT-PCR için çalışma protokolü	36
Tablo 7. Akciğer dokularına ait histolojik doku takip aşamaları	37
Tablo 8. Hematoksilen ve eozin boyama protokolü	38
Tablo 9. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü	40
Tablo 10. Matute-Bello ve ark. akciğer hasar skoru (LDS)	43
Tablo 11. İmmünohistokimyasal boyama pozitifliği skorları	43
Tablo 12. Akciğer hasar skoru (LDS, Matute-Bello ve ark.)	50
Tablo 13. Alveolar septum kalınlığı	51
Tablo 14. IHC pozitiflik derecesi puanı (%25 ve %75 çeyrekler arası aralıkla ortanca)	52
Tablo 15. Malondialdehit (MDA) bulguları	57
Tablo 16. İndirgenmiş Glutatyon (GSH)) bulguları	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Normal hücre ve apoptotik hücre	13
Şekil 2. Normal hücre ve otofajik hücre	15
Şekil 3. Rosuvastatin moleküler yapısı	21
Şekil 4. Abdomenin açılması ve çekumun explore edilmesi	28
Şekil 5. Çekumun bağlanması, perfore edilmesi ve abdomenin kapatılması	29
Şekil 6. Olympus DP 2.0 bilgisayar programı	42
Şekil 7. MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği	45
Şekil 8. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) analizi kullanılan standart grafiği.....	46
Şekil 9. Harris Hematoksilen ve Eosin G ile boyanmış akciğer dokusuna ait kesinlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü	48
Şekil 10. Kaspas-3 ile inkübe edilmiş akciğer dokusu bölümlerinin temsili ışık mikroskopik görüntüsü	53
Şekil 11. NF-k β /p65 ile inkübe edilmiş akciğer dokusu bölümlerinin temsili ışık mikroskopik görüntüsü	54
Şekil 12. 8-OHdG ile tedavi edilen akciğer dokusu kesitlerinin görüntüsü	56
Şekil 13. TBARS (Malondialdehit (MDA)) analiz	58
Şekil 14. Toplam tiyol tayini (İndirgenmiş Glutasyon (GSH)) analiz	59
Şekil 15. Bax geninin Tm ve grafiği	60
Şekil 16. Bcl-2 geninin Tm ve grafiği	61
Şekil 17. LC-3 geninin Tm ve grafiği	61
Şekil 18. Beclin-1 geninin Tm ve grafiği	62
Şekil 19. Akciğer dokularında Bax geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine göre değişimi	63
Şekil 20. Akciğer dokularında Bcl-2 geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine göre değişimi	63
Şekil 21. Akciğer dokularında Bcl-2/Bax geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine göre değişimi	64
Şekil 22. Akciğer dokularında LC-3 geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine genine göre değişimi	64

Şekil 23. Akciğer dokularında Beclin-1 geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine göre değişimi	65
Şekil 24. 0.8'lik Agaroz jele yüklenmiş RNA örnekleri	65
Şekil 25. %1 'lik Agaroz jele yüklenmiş PCR ürünleri	66
Şekil 26. %1' lik Agaroz jele yüklenmiş PCR ürünleri	66



KISALTMALAR

ARDS	: Akut Solunum Yetmezliği Sendromu
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
CLP	: Çekal Bağlama ve Delme
c-DNA	: Tamamlayıcı DNA
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPIC II	: Avrupa Yoğun Bakımda Enfeksiyon Yaygınlığı
FDA	: Food and Drug Administration
GSH	: Redükte Glutasyon
HCl	: Hidroklorik Asit
H&E	: Hematoksilen ve Eosin
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaryil koenzim A
IL	: İnterlökin
İHC	: İmmünohistokimyasal Boyama
KCl	: Potasyum Klorid
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LPS	: Lipopolisakkarit
MDA	: Malondialdehit
NF- κ B	: Nükleer Faktör Kappa B
PNL	: Polimorfonükleer Hücre
q-RT-PCR	: Quantitative Real-Time PCR
ROS	: Reactive Oxygen Species
RNS	: Reactive Nitrogen Species
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
SIRS	: Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu
TBA	: Tiobarbitürik Asit
TBARS	: Tiyobarbitürat Reaktif Maddeler
TNF- α	: Tümör Nekrosis Faktör Alfa
TT	: Toplam Tiyol

8-OHdG	: 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin
rpm	: Revolutions Per Minute
g	: Gram
%	: Yüzde
α	: Alfa
β	: Beta
°C	: Santigrad Derece
dk	: Dakika
kg	: Kilogram
mM	: Milimolar
μ L	: Mikrolitre
nmol	: Nanamol
pg	: Pikogram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
μ M	: Mikromolar
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
Na ₂ HPO ₄	: Di Sodyum Hidrojen Fosfat
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	: Tri Sodyum Sitrat
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum Di Hidrojen Fosfat, Anhidrat
NaOH	: Sodyum Hidroksit

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ana Bilim Dalı : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Türü : Tezli Yüksek Lisans

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM

Hazırlayan : Safiye İnşira YILDIZ

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 82

ÖZET

SIÇANLARDA ÇEKAL BAĞLAMA VE DELME YÖNTEMİ İLE İNDÜKLENEN SEPSİS MODELİNDE ROSUVASTATİNİN AKCİĞER DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ

Sepsis, mortalitesi %30-90 arasında değişen önemli bir sağlık sorunudur. Sepsisin patogenezi enfeksiyonlara karşı sistemik inflamatuvar yanıttır. Statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinden farklı pleiotropik etkileri olan anti-inflamatuvar, antioksidan ve immunomodülatör özellikleri vardır. Yüksek derecede pleiotropik etkilere sahip olan rosuvastatin diğer statinlerden farklı olarak enzim baskılama özelliğine sahiptir. Rosuvastatinin anti-inflamatuvar etkisini gösteren çok az sayıda çalışma literatürde mevcut olmakla birlikte sepsise etkisi değerlendirilmemiştir. Sepsisin doku hasarı sonucu oluşan otofaji ve indüklenmiş apoptozun literatürde herhangi bir etkisine dair bulgu yoktur. Amacımız rosuvastatinin akciğer dokusu hasarına karşı olan etkisini değerlendirmek için çekal bağlama ve delme (CLP) yöntemi ile indüklenen deneysel sepsis modelini kullanmaktır. Her grupta Sprague-Dawley sıçanları olacak şekilde 6 deney grubu oluşturuldu: Sham, CLP, CLP+Rosuvastatin (10 mg/kg), CLP+Rosuvastatin (20 mg/kg), Sham+Rosuvastatin (10 mg/kg), Sham+Rosuvastatin (20 mg/kg). Rosuvastatin uygulaması cerrahi işlemiden 5 saat önce, aynı anda, oral yol ile yapıldı. Antioksidan özelliği için GSH, oksidatif strese yanıtının belirlenmesi için de MDA ve 8'OHdG analiz edildi. Sepsisin inflamasyon yollarındaki rosuvastatin etkinliği immünohistokimyasal olarak NF- κ B/65 ve kaspas-3 ekspresyonları ile değerlendirildi. Otofaji için Beclin-1, LC3 ve sepsis sonucunda indüklenen apoptoz için Bcl-2, Bax genlerinin ekspresyonlarının analizi yapıldı. Rosuvastatinin sepsis sonucu oluşan doku hasarına koruyucu etkisinin varlığı ve en etkin dozun ise 10 mg/kg olduğu tespit edildi. Bununla birlikte, oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz ve otofaji hücresel yollarındaki rolü ile bulgularımız desteklenmiş oldu. Teropatik açıdan zorlayıcı, karmaşık ve yüksek orandaki mortalite özellikleri olan sepsise rosuvastatin gibi yaygın kullanılan bir ilacın tedavi edici etkisi önemli bir bulgudur. Çalışmamızın bulguları rosuvastatinin farklı tedavi stratejilerine ışık tutacak ve olağan etkilerinin ortaya çıkarılmasına kolaylık sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, Rosuvastatin, CLP, Akciğer

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Department of Medical Biology

Thesis Type : Master Thesis

Supervisor : Asst. Prof. Faruk SAYDAM

Author : Safiye İnşira YILDIZ

Year : 2023

Pages : 82

ABSTRACT

THE EFFECT OF ROSUVASTATIN ON LUNG TISSUE IN THE SEPSIS MODEL INDUCED BY CECAL LIGATION AND PUNCTURE IN RATS

Sepsis continues to be an important health problem due to its mortality rate of 30-90% despite modern treatments. Its pathogenesis includes the systemic inflammatory response to infection. It has been shown that statins have pleiotropic effects with their antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory aspects independent of their cholesterol-lowering effects. Rosuvastatin has more enzyme-suppressing properties than other statins as well as higher pleiotrophic effects. Although a few studies showing the anti-inflammatory effect of rosuvastatin are available in the literature, its effect on sepsis has not been evaluated. In addition, there is no finding in the literature regarding the effect of rosuvastatin on apoptosis and autophagy induced as a result of tissue damage in sepsis. Our aim was to evaluate the effect of rosuvastatin against lung tissue damage in an experimental sepsis model induced by the cecal ligation and puncture (CLP) method. Six experimental groups were designed with Sprague-Dawley rats in each group: Sham, CLP, CLP+Rosuvastatin (10 mg/kg), CLP+Rosuvastatin (20 mg/kg), Sham+Rosuvastatin (10 mg/kg), Sham+Rosuvastatin (20 mg/kg). Rosuvastatin was administered concurrently orally, 5 hours before the surgical procedure. MDA and 8'OHdG were analyzed to determine the response to oxidative stress, and GSH was analyzed for its antioxidant property. The efficacy of rosuvastatin in the inflammation pathways of sepsis was evaluated immunohistochemically by NF- κ B/65 and caspas-3 expressions. Expressions of Bcl-2 and Bax genes for sepsis-induced apoptosis, and Beclin-1 and LC3 genes for autophagy were analyzed. Rosuvastatin had a protective effect on tissue damage caused by sepsis and the most effective dose was 10 mg/kg. However, its role in oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy cellular pathways was supported by our findings. The therapeutic effect of a widely used drug such as rosuvastatin in sepsis, which has therapeutically challenging, complex and high mortality features, is an important finding. The findings of our study will shed light on the different potential effects of rosuvastatin and contribute to the formation of new treatment strategies.

Keywords: Sepsis, Rosuvastatin, CLP, Lung

GİRİŞ

Sepsis için hangi yöntem denenmiş olursa olsun benzer oranda iyi sonuçlar bildirilmekle birlikte tedavide yeni yöntem arayışları devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda var olan tedavi yöntemlerinin diğerine üstünlüğü kanıtlanmadığı belirtiliyor. İyi kalitede metodolojik çalışmaların gerçekleştirilme sürecinde karşılaşılan sorunların başında, çalışmaların çok uzun zaman boyunca takip edilmesi gerekmektedir. Erken dönemde birçok yöntem iyi sonuç vermekle beraber zaman içerisinde bu iyileşme devam etmemektedir (Bosmann & Ward, 2013). Bu nedenle geleneksel tedavi yöntemlerinin yanı sıra akciğerin iyileşmesini artıracak ve farklı sistemler üzerinde olumsuz etkilere yol açmayacak daha güvenli ajanların keşfedilmesi ve bu etkinin mekanizması ya da mekanizmalarının gösterilmesi ana hedeflerimizden biridir.

Son çalışmalar, 3-hidroksi-3-metilglutaryl koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri olarak da bilinen statinlerin, anti-inflamatuar, antioksidan ve immünmodülatör etkileri ile vasküler endotel hücre fonksiyonunun iyileştirilmesi de dâhil olmak üzere faydalı etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Saadat, Roshan, Aslani, & Boskabady, 2020).

Rosuvastatin dışında diğer statinlerin sepsis ile ilgili klinik çalışmalarda mortaliteyi azalttığı, hayvan çalışmalarında ise organ hasarını düşürücü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Rosuvastatinin özellikle sepsisin indüklediği organ hasarına etkisini gösteren bir çalışma literatürde mevcut değildir.(Quirk, Thornton, & Kirkpatrick, 2003)

İlk defa bizim çalışmamız ile çoklu hücrel yolaklar analiz edilerek sepsisin indüklediği doku hasarına rosuvastatinin etkisi değerlendirilecektir.

Böylelikle CLP'nin neden olduğu inflamasyonun patofizyolojisi ve etiyolojisinde inflammatuar mediatörlerin rolünün gösterilmesi, rosuvastatin'in sitokin ve serbest oksijen radikallerini önlemedeki koruyucu rolünün ve sepsis tedavisinde iyileştirmeyi hızlandırıcı etkisinin gösterilmesi (Dejager, Pinheiro, Dejonckheere, & Libert, 2011) en büyük hedeflerimiz içerisinde yer almaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Sepsis

“Bakteriyemi” dolaşım sisteminde canlı bakteri bulunması olarak tanımlanır (EROĞLU & KIRBAŞ, 2020).

“Enfeksiyon” ise genellikle, mikroorganizmaların varlığına veya normalde steril olan konakçı dokuların bu organizmalar tarafından istilasına karşı verdiği inflamatuvar cevaptır (Al-Khafaji, Sharma, & Eschun, 2017).

“Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (Systemic Inflammatory Response Syndrome – SIRS), mikroorganizmalarla kontamine olan veya olmayan etkenler nedeniyle hematolojik ve immünolojik yanıtların tüm alanlarında meydana gelen olayların toplamıdır. Eş zamanlı SIRS enfeksiyonu sepsistir.(EROĞLU & KIRBAŞ, 2020).

Aşağıda verilen kriterlerden 2 veya daha fazlasının aynı anda görülmesi ile klinik olarak SIRS tanısı konulur:

1. Vücut ısısı $>38^{\circ}\text{C}$ ya da $<36^{\circ}\text{C}$ olması
2. Kalp atış hızı $>90/\text{dk}$ olması
3. Solunum hızı $>20/\text{dk}$ ya da $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mmHg}$ olması
4. Lökosit sayısı $>12000 /\text{mm}^3$ ya da $<4000 /\text{mm}^3$ olması ya da periferik yaymada

%10'un üzerinde bant formunun bulunması gerekmektedir. (Günel & Barut, 2009).Sepsis tanısının konulabilmesi için bu kriterlerin yanında enfeksiyonun da kanıtlanması gerekir (Gürkan & ÇOBANLI, 1999). Enfeksiyon kaynağından şüphelenilen SIRS, sepsis olarak adlandırılır. Bu nedenle, pozitif kültürlerle enfeksiyonun doğrulanması, en azından erken aşamalarda zorunlu değildir. Bir veya daha fazla üç organ yetmezliği olan sepsise “ağır sepsis”, intravasküler volüm doluluğuna rağmen hemodinamik instabiliteye “septik şok” denir (Chakraborty & Burns, 2019).

Üç organda işlev bozukluğu olan olgularda mortalite %80-100'e yükselmiştir (Gürkan & ÇOBANLI, 1999).

1.1.1. Sepsis Epidemiyolojisi

Amerika Birleşik Devletleri'nde şiddetli sepsisin 100.000 nüfus başına 300 vaka olduğu tahmin edilmektedir. Bu vakaların yarısı yoğun bakım ünitesi dışında meydana gelmektedir. Şiddetli sepsis gelişen hastaların dörtte biri hastaneye yatışları sırasında ölecektir. Septik şok, %50'ye yaklaşan en yüksek ölüm oranıyla ilişkilidir. Organ yetmezliğinin kümülatif yükü, hem yetersiz organ sayısı hem de organ işlev bozukluğu derecesi açısından ölümün en güçlü ön görücüsüdür. 2003 yılında, Martin ve meslektaşları, Amerika Birleşik Devletleri'nde son 20 yılda septisemi insidansında ve septisemiye bağlı ölümlerde bir artış buldular. Nüfusun yaşlanması, kronik sağlık koşullarının artan yükü ve immünosupresif tedavi, transplantasyon, kemoterapi ve invaziv prosedürlerin artan kullanımı nedeniyle bu eğilimin devam etmesi beklenmektedir. Yoğun bakım ünitesinde daha uzun süre kalan ve giderek daha fazla hasta olan hastalarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha sık kullanılması, muhtemelen zamanla bakteri direncinin artmasına neden olmuştur. Şiddetli sepsise neden olan organizmanın tipi, sonucun önemli bir belirleyicisidir. En son çalışmalar gram pozitif organizmaların artan bir insidansını öne sürse de, en son Avrupa Yoğun Bakımda Enfeksiyon Yaygınlığı (EPIC II) çalışması daha fazla gram negatif organizma bildirdi (%62.2'ye karşı %46.8). Enfekte eden organizmaların paternleri önceki çalışmalara benzerdi; baskın organizmalar *Staphylococcus aureus* (%20.5), *Pseudomonas* türleri (%19.9), *Enterobacteriaceae* (esas olarak *Escherichia coli*, %16.0) ve mantarlar (%19). *Acinetobacter* enfeksiyonların %9'unda yer almıştır ve farklı bölgelerde enfeksiyon oranlarında önemli farklılıklar vardır (Kuzey Amerika'da %3,7 ve Asya'da %19,2). Çok değişkenli lojistik regresyon analizinde hastane mortalitesi ile ilişkili tek organizmalar *Enterococcus*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleriydi (Mayr, Yende, & Angus, 2014).

Tablo1. Sepsis etiyolojisinde yer alan başlıca mikroorganizmalar

Gram (+) bakteriler: %30-50	Gram (-) bakteriler: %30
MSSA	<i>Escherichia coli</i>
MRSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Diğer stafilokok türleri	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ve diğer streptokok türleri	Diğer enterobasiller
Enterokoklar	<i>Haemophilus influenzae</i>
Gram (+) anaeroblar	Gram (-) anaeroblar
Diğer	
Fungal Ajanlar: %3-6	
Viral etkenler: %2-4	
Paraziter ajanlar: %1-3	
Polimikrobial: %13	

1.1.2. Sepsis Patofizyolojisi

Sepsis patofizyolojisi oldukça karmaşık yapıdadır. Mikroorganizmaların toksinleri ve hücresel yapıları dolaşım sisteminde bulunan mononükleer fagositleri, endotel hücreleri ve diğer hücreleri uyararak güçlü mediyatörlerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Bunların en önemli olanları; tümör nekrosis faktör alfa (TNF-a), interlökin- 1 (IL-1), interlökin- 2 (IL-2), interlökin- 6 (IL-6) ve trombosit aktive eden faktördür. Mediyatörlerin salınmasını takip eden süreçte kompleman sistemi, koagülasyon sistemi, kinin ve fibrinolizis sistemi aktive olur. Tümör nekroz faktörü alfa, sepsis patogenezinde merkezi bir rol oynar. Çalışmalar, IL-1, IL-6 ve TNF'nin yüksek plazma seviyeleri ile mortalite arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bazofil ve mast hücrelerinden artan histamin salınımı ile birlikte kompleman sisteminin uyarılması ve polimorfonükleer hücre (PNL) aktivasyonu, düz kaslarda vazokonstriksiyon, kapiller permeabilitede artma ve hipotansiyonda ilerleme oluşur. Endotel permeabilitesini artıran bir başka faktör de nötrofillerin degranülasyonu sonucunda oluşan lizozomal enzimler ve toksik oksijen radikalleridir. Artan permeabilite ve endotel hasarı mikrotrombüs oluşumunu

kolaylaştırır. Endotel hasar ve mikrotrombüsler, organ yetmezliğinin ilerlemesini sağlar. Sepsiste en çok organ yetmezliği akciğer, karaciğer, böbrek ve kalp yetmezliğidir (Gotts & Matthay, 2016).

1.1.2.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, antioksidan ve oksidalar arasındaki dengenin oksidan sistem lehine bozulması, lipid peroksidasyonu ve serbest reaktif/radikal oksijen ürünlerinin salınması sonucu organizmalarda hücresel hasarın oluşmasıdır. Organizmanın oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları (antioksidan mekanizmalar) yetersiz kaldığı durumda hücrelerde oksidatif hasar gelişir ve fonksiyonlar önemli ölçüde bozulur. Oksidatif stres birçok hastalığın patogenezinde kritik öneme sahip olduğu için hastalığın şiddeti artmaktadır. Bu mekanizma, yaşlanma süreci ve kalp damar hastalıkları, dejeneratif nörolojik hastalıklar, kanser, böbrek yetmezliği, kısırlık, kas ve karaciğer hastalıkları, sepsis gibi birçok hastalığın etiyolojisinden sorumludur. Aerobik organizmaların normal metabolizma basamaklarında, oksijen kullanılarak besinlerin enerjiye dönüştürülmesi sırasında oksijen molekülü indirgenir ve yan ürünler olarak çeşitli serbest radikaller ve hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit gibi reaktif oksijen türleri oluşur. Serbest radikaller, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak sınıflandırılır (Tabakoğlu & Durgut, 2013).

Sepsis, bir enfeksiyona ilk konakçı yanıtının artması ve düzensizleşmesi sonrasında gelişir, bu da dolaşım değişikliklerine ve septik şoka yol açar. En yaygın sonuçlar, bozulmuş vasküler geçirgenlik, kardiyak işlev bozukluğu ve solunum bozukluğuna yol açan mitokondriyal işlev bozukluğudur. Sepsisle uyarılan miyokart hasarı patogenezi açık değildir, ancak kalp kas hücrelerinin çok mitokondriyal disfonksiyon patofizyolojik mekanizmasında önemli bir rol oynar; oksidantlar ve 8antioksidantlar da önemli bir rol oynar. Normalde vücuttaki oksidan ve antioksidan sistemler arasında bir denge vardır; “Oksidatif stres”, oksidan seviyeleri, septik sürece katkıda bulunan ve organ hasarına yol açabilen antioksidantların seviyelerini aştığında ortaya çıkar. Sepsis kaynaklı organ yetmezliği sırasında görülen inflamatuvar yanıt ve kalıcı oksidatif stres, mitokondride nihayetinde mitokondriyal disfonksiyona ve hücre ölümüne yol açan değişiklikleri indükler. Genel olarak kabul

edilen teori, sepsisin bir patojene karşı kontrolsüz bir inflamatuvar yanıtı temsil etmesidir. Anti-inflamatuvar ajanlar kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmış olsa da, çoğu herhangi bir yararlı etkiyi tanımlayamadı ve bu nedenle yukarıda belirtilen hiper-inflamasyon hipotezini sorguladı. (Nagar, Piao, & Kim, 2018)

1.1.2.1.1. Malondialdehit (MDA)

Üç ya da daha çok çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin parçalanmasıyla, lipid peroksidasyonunun en önemli belirteçlerinden birisi olan üç karbonlu dialdehit olan malondialdehit (MDA) oluşur. Ortaya çıkan MDA; enzim aktivitesi, hücre deformasyonu, iyon taşınması ve hücre yüzeyi bileşenlerinin toplanması gibi membran özelliklerinde değişikliklere yol açar. Antioksidan/oksidan dengesinde; Serbest radikallerin üretiminde artış olması, antioksidanların inaktif veya yetersiz olması gibi sebeplerle bozulması "Oksidatif Stres" yaratarak, oksidan maddelerin hücresel yapı ve moleküllerde birikmesine ve çeşitli fizyolojik olayların bozulmasına neden olur. ROS'un yararlı ve zararlı etkileri arasındaki hassas dengeyi korumak çok önemlidir. Aerobik organizmalarda serbest radikallerin neden olduğu hasarı önlemek için, radikal oluşumunu önleyen ve hasarı azaltan antioksidanlar olarak bilinen çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda oksidan maddelerle karşılaşır ve hedef molekülün oksidasyonunu geciktirir veya engeller. Antioksidan enzimler serbest radikalleri azaltarak hasarın önlenmesinde rol oynar. Serbest radikalleri bağlayarak ya da daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek aktivitelerini azaltırlar ya da serbest radikalleri kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kırar/onarır gibi davranırlar (Tabakoğlu & Durgut, 2013)

1.1.2.1.2. Glutasyon

Glutasyon canlılarda bulunan bir antioksidandır. İndirgenmiş glutasyon, peroksitler, lipid peroksitler, serbest radikaller ve ağır metaller gibi reaktif oksijenlerin sebep olduğu önemli hücre bileşenlerinin hasar görmesinin önüne geçer. Glutasyon, farklı reaksiyonlar için indirgeme kapasitesi sağlar ve hidrojen peroksitin ve diğer peroksitlerin detoksifiye edilmesinde ve serbest radikallerin oluşumunda önemli bir rol oynar (Pastore et al., 2001). Ayrıca Glutasyon, hücrenin

okside-redüksiyon dengesinin düzenlenmesinde de görev alır. Hücreden toksik metabolitleri uzaklaştırır ve indirgenmiş formu sayesinde hücrelerdeki sülfhidril grubunun devamlılığını sağlar. Dokularda bulunan glutatyon miktarında indirgenmiş glutatyon tayini (GSH) ile belirlenir (Ottaway, 1989).

1.1.2.1.3. 8-OHdG

Serbest radikal üretiminin artması ve antioksidan savunmanın azalması sonucunda oksidatif stres meydana gelebilir. Bu sebeple oksidatif stres durumu, antioksidan tüketimi, antioksidan miktarlarındaki azalma ya da metabolitlerindeki artış değerlendirilerek ölçülebilir. Ayrıca, oksidatif DNA hasarının belirteci olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ölçülmesi oksidatif stres durumunu gösteren analiz yöntemleridir.(Kelek, 2021). Nükleer ve mitokondriyal DNA'da, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ya da 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oksodG), serbest radikal kaynaklı baskın formlardan biridir. Oksidatif lezyonlar ve bu nedenle oksidatif stres ve karsinogenez için bir biyobelirteç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Valavanidis, Vlachogianni, & Fiotakis, 2009).

1.1.2.2. Hücre Hasarı

Hücre hasarı, birçok sebebe bağlı olarak enzim defektlerine neden olan genetik mutasyonlardan fiziksel travmalara kadar çeşitli mekanizmalarla gelişebilir:

Doku hipoksisi – nekrozun en sık nedenlerinden biridir ve şoktaki en temel hücre ölüm sebebidir. - Kimyasal etmenler – özellikle toksik ajanlar hücresel düzeyde nekroz ile sonuçlanabilirler.

- Fiziksel etmenler – her türlü travma doku nekrozuna sebep olabilir.

- Serbest oksijen radikalleri – hücre membran lipidlerinin peroksidasyonu, hücresel proteinlerin oksidatif modifikasyonu ve DNA hasarı oluşumu nedeniyle hücresel hasara ve hücre ölümüne sebep olurlar.

- Enfeksiyonlar – gerek mikroorganizmaların direk etkileri gerek ise endotoksin aracılı mediyatörlerin neden olduğu metabolik yollar hücre ölümü ile sonuçlanabilir.

- İmmün reaksiyonlar – enfeksiyöz ajanlardan bağımsız olarak ortaya çıkabilen immünolojik reaksiyonlar da (anafilaksi, otoimmün hastalıklar gibi) geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz hücresel hasar nedeni olabilirler.

-Kalıtsal hastalıklar – özellikle DNA düzeyindeki ufak değişikliklere neden olan veya enzim bozuklukları ile seyreden genetik bozukluklar, hücre ölümünü tetikleyebilir.

- Malnütrisyonlar – protein, vitamin ve mineral eksiklikleri ile dengesiz diyet alımları hücresel hasara sebep olabilmektedir.

Hücrede hasar yaratma potansiyeline sahip etmenlere maruziyet süresi ve etmenlerin hasarlayıcı gücü önemlidir. Ayrıca hücrenin içinde bulunduğu durum ve uyum sağlayabilme kapasitesi de hasarın derecesini belirler. Hücre hasarına neden olan etmenlerin ana hedefleri şunlardır:

- Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ve ATP sentezi
- Hücre ve hücre içi organellerin membranı
- Protein sentez basamakları
- Hücrenin genetik materyali

Hipoksiye veya ortamdaki toksinlere bağlı olarak mitokondride oksidatif fosforilasyonun azaldığı durumlarda, hücre içi ATP üretimi de azalır veya tamamen durur. Hücre içi ATP'nin tükenmesinden ilk etkilenen yapılardan biri de hücre membranındaki aktif transport yapan – yani enerji bağımlı – sodyum-potasyum pompasıdır (Na^+/K^+ -ATPaz) ve bu pompanın işlevinin kaybı intraselüler iyonik ve osmotik homeostazisin bozulmasıyla sonuçlanır. Sodyum ve su hücre içinde birikirken, potasyum hücre dışına kaçır; sonuçta hücre şişer (Bohm ve ark., 2006; Krysko ve ark., 2008). ATP eksikliği benzer şekilde kalsiyum (Ca^{2+}) pompasının da disfonksiyonuna neden olur ve hücre içerisinde kalsiyum depozitleri oluşmaya başlar. ATP eksikliği/yokluğu hücrenin temel yapısını oluşturan proteinlerin de sentezinin aksamasına yol açar. Aerobik solunumun bozulması da hücreyi anaerobik solunuma zorlar ki ortaya çıkan anaerobik solunum son ürünü laktat, hücre içi pH'ın düşmesine neden olur ve bu durumda nükleer kromatin bozulur ve kromatin agregatları oluşur (Kumar ve ark., 2009). Mitokondriyal hasar, mitokondri iç membranındaki geçirgenliğin bozulmasına ve oksidatif fosforilasyonun bozulmasına neden olur. Ayrıca bu mitokondriyal hücre hasarı, elektron transport zincirinin temel

elemanlarından birisi olan sitokrom C'nin sitozole sızmasına yol açar. Dolayısıyla hücre, aerobik solunum yapamaz hale gelir (Kumar ve ark., 2009). Hücre hasarında ya da doku iskemisi sonrasındaki reperfüzyonu takiben serbest oksijen radikalleri oluşur. Serbest oksijen radikalleri, normal oksidatif solunumda da oluşsa da genellikle çeşitli antioksidan mekanizmalarla katalaz, süperoksit dizmutaz, glütatyon peroksidaz gibi – ortamdan uzaklaştırılırlar. Ancak bu denge bozulduğunda ve ortamda oksijen radikalleri artmaya başladığında hücre hasarı ortaya çıkar ya da var olan hasar derinleşir. Reaktif oksijen türevleri özellikle hücre membran lipidlerinin peroksidasyonu yoluyla sitozol membranının bütünlüğünün bozulmasında rol oynar. Ayrıca hücrenin yapısal ve işlevsel proteinleri ile genetik materyalini de hasarlarlar (Lushchak, 2016). Seçici geçirgen yapıdaki hücre membranının bu özelliğini kaybetmesi, özellikle hücresel nekrozun temel özelliklerinden birisidir. ATP kaybı, Ca^{2+} tarafından indüklenen fosfolipazların aktivasyonu ya da oksidatif stres nedeniyle gelişen lipid peroksidasyonu dışında, bakteriyel endotoksinlerin, viral antijenlerin, litik kompleman proteinlerinin ve fiziksel/kimyasal etmenlerin direk etkisiyle de sitozolik membran hasarlanabilir ve bütünlüğü kaybolabilir. Hücre zarının bütünlüğünün korunamaması hücrenin kaybıyla sonuçlanır (Kumar ve ark., 2009).

1.1.2.3. İnflamasyon

İnflamasyon, konakçıyı enfeksiyondan ve çevresel zararlardan koruyan doğal bir savunma sistemidir. Doku onarımı sürecinde ve enfekte veya hasarlı dokularda homeostazın sürdürülmesinde ve konakçıya zarar veren patojenlerin hapsedilmesinde aktif bir rol oynar. İnflamasyon, kronik inflamasyon ve akut inflamasyon olarak ikiye ayrılır. Akut inflamasyon, vücuttaki inflamatuvar faktörlere verilen ilk yanıttır. Kronik inflamasyon ise inflamasyonlu bölgedeki hücrelerin progresif olarak bozulması ile karakterize olmuştur. Böylece düşük ve yüksek dereceli kronik inflamasyon olarak sınıflandırılmıştır. Yüksek dereceli kronik inflamasyon sonucunda hasar oluşan bölgede veya sistemik dolaşımda aktif inflamatuvar hücre seviyesinin ve inflamatuvar belirteçlerin etkisinin arttığı gözlenmektedir. Bununla birlikte, düşük dereceli kronik inflamasyonda, inflamatuvar belirteçler az veya önemsizdir ve doku infiltrasyonunun bir örneği olarak artan proinflamatuvar

sitokinlerle birlikte, bağışıklık hücrelerinde, özellikle makrofajlarda ve insüline bağımlı dokulardaki T hücrelerinde görülür. Şimdiye kadar sepsiste rol oynayan sitokinler TNF α , interlökinler, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve interferon gamadır. TNF α , sepsis patofizyolojisinde saptanan en güçlü mediatördür (Bodur & Ünal, 2019).

1.1.2.3.1. TNF- α

TNF-alfa'nın iki formu vardır, zarda lokalize protein (transmembran) ve çözünür sitokin. TNF-alfa, vücutta fazla bulunan iki TNF reseptörü olan TNFR-I ve daha çok bağışıklık sistemi, endotelial ve sinir sistemi hücrelerinde bulunan TNFR-II ile etkileşime girer. TNFR-I, çözünür bir ligand tarafından aktive edilirken, TNFR-II genellikle zarda lokalize bir form tarafından aktive edilir. Transmembran TNF-alfa, hedef hücreler üzerindeki reseptörlerine bağlanarak bölgesel inflamasyonun hücreden hücreye temasta ve hücre tipine özel şekilde düzenlenmesine katkı sağlar. Transmembran TNF-alfa'nın farklı hücrelerdeki ekspresyon düzeyi, fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alır (BAŞLILAR & AYDIN). Normal şartlarda karaciğere alınan yağ asidi arttıkça VLDL serum TG düzeyi de artacaktır. Yüksek doz lipopolisakkaritlerde ise LPL enzim aktivitesinin baskılanması nedeniyle TG katabolizması oluşamaz ve serum TG düzeyi tekrar yükselir. Görülebileceği gibi, hafif veya şiddetli bakteriyemi sonunda serum TG düzeylerinde bir artışa yol açacaktır. Sitokinlerin TG metabolizması üzerinde bulunan etkileri karmaşık olsa da, sonuç hipertrigliserideminin faydasına olacaktır. Örneğin; IL-1, IL-6, IFN-alfa, TNF-alfa, TNFbeta, trombosit aktive eden faktör hepatik TG üretimini arttırıyorken, IFN gama, IL-2, IL-4 TG üretimini arttırmaz. İnflamasyona neden olan başka bir faktör olmamasına rağmen, izole hipertrigliserideminin kendisi proinflamasyon ile ilişkilidir. Hipertrigliseridemi ile CRP, IL-6, IL-8, monosit kemoatraktan protein-1 ve TNF-alfa seviyeleri yükselir (Akker & Utku, 2020).

1.1.2.3.2. NF κ B/p65

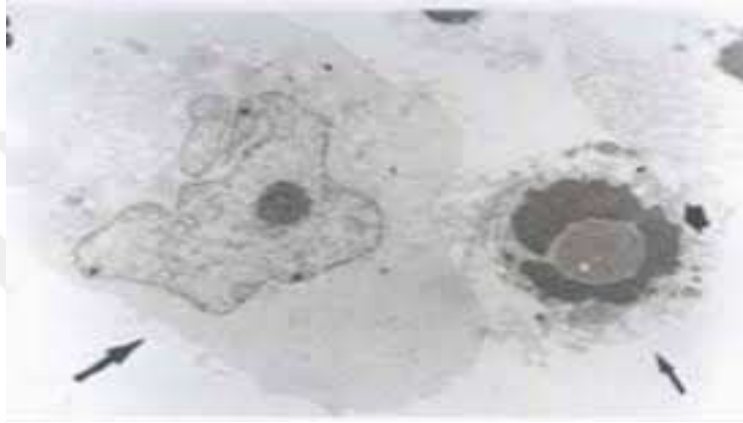
Transkripsiyon faktörü NF κ B/p65, immün ve inflamatuvar yanıtların kritik bir düzenleyicisidir. Memelilerde, NF- κ B/Rel ailesi beş üyeden oluşur: p50, p52, p65 (Rel-A), c-Rel ve homo- veya heterodimerler oluşturan ve inhibitör ile inaktif bir

kompleks olarak kalan Rel-B proteinleri. Dinlenme hücrelerinde I κ B proteinleri adı verilen moleküller. İki farklı NF- κ B sinyal yolu tarif edilmiştir: 1) öncelikle patojenler ve enflamatuar araçlar tarafından aktive edilen kanonik yol ve 2) çoğunlukla gelişimsel ipuçları tarafından aktive edilen kanonik olmayan yol. Kanonik yol patolojik uyarılar tarafından aktive edilen NF- κ B formu p65:p50 heterodimerdir. Aktive edilmiş p65'teki orantısız artış ve ardından efektör moleküllerin transaktivasyonu, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, multipl skleroz ve hatta nörodejeneratif patolojiler gibi birçok kronik hastalığın patogenezinin ayrılmaz bir parçasıdır. Bu nedenle, NF κ B/p65 sinyal yolu, yoğun ilaç keşfi ve gelişimi için çok önemli bir nokta olmuştur. Bu derleme, p65 aracılı sinyalleşmeye genel bir bakışla başlar, ardından kronik inflamasyon bağlamında NF κ B/p65'i doğrudan hedefleyen stratejilerin tartışılmasıyla başlar(Giridharan & Srinivasan, 2018).

1.1.2.4. Apoptoz

Direk hasarlayıcı maddelerle veya uyum sağlayamayacakları bir stres ile karşı karşıya kaldıklarında hücrelerde hasar meydana gelir. Sürecin başında bu hasar geri dönüşümlü olabilse de sürekli maruziyet hücrenin ölümü ile sonlanır. Sürecin ilk dönemlerinde hücrede oksidatif fosforilasyon azalır, hücrede temel enerji birimi olan adenozin trifosfat (ATP) kaybı ortaya çıkar. ATP kaybına bağlı olarak hücre içi iyon konsantrasyonu bozulmaya başlar ve intraselüler kompartmana su girişi olur; dolayısıyla hücre şimeye başlar. Eğer hasarlayıcı etken veya stresör faktör ortadan kaldırılabiliyse bu dönem çoğunlukla geri dönüşümlüdür. Geri dönüşümsüz safhanın hangi aşamada başladığını söyleyebilmek için kesin bir belirteç olmamakla birlikte, hasar gören hücrenin kromatinin erimesi (piknoz, karyoreksis ve karyolizis aşamaları), intraselüler kalsiyum depozitleri ve selüler membranın bütünlüğünün bozulması, hücrenin geri dönüşümsüz safhada olduğunu gösterir ve süreç nekroz ile sonuçlanır. Apoptotik mekanizma ile programlı olarak ölüme giden hücrelerde ise hücresel bir şişme değil, tam tersine küçülme görülür, kromatin kondanase olur ve lipid diziliminde yapısal değişiklikler olsa da membran bütünlüğü bozulmaz (Kumar ve ark., 2009).

Apoptozis; gelişmiş olarak sınıflandırılan organizmalarda hücreler arasında gerek görülmeyen ve işlev fonksiyonları bozulmuş hücrelerin, çevreye zarar vermeyecek şekilde programlandırılmış ölümüdür. Apoptozdaki temel morfolojik olay, çekirdeğin yoğunlaşması ve ardından parçalanmasıdır. Kromatin normalde karışık yoğun bir yapıdadır ve daha dağınık bir görünüme sahiptir (L. Mis ve A. Ç. Yeltekin).



Şekil 1. Normal hücre ve apoptotik hücre

Hücre, apoptozda süperkondens yapıya geçerek nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşturur. (Şekil1). Apoptoz iki ana yolla başlatılır. Bunlardan ilki hücre dışından pozitif (TNF α varlığı) veya negatif (büyüme faktörü yokluğu) indüklenerek gerçekleşir. İkinci yol ise hücre içinde endoplazmikretikulum stresi, DNA hasarı veya mitokondriden indüklenen intrensek yol. apoptotik süreç hücre içi veya hücre dışı mekanizmalarla başlasa dahi kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir.

Apoptozun aşamaları:

- Apoptozun indüksiyonu
- Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin uyarılması, Sitokrom c'nin serbest bırakılması
- Apoptozomun oluşumu (Apaf-1, sitokrom c, kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelinin değişmesi

- Kaspaz enzim grubunun aktifleşmesi
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine taşınması
- DNA-az'ın aktifleşmesi sonucunda DNA'nın fragmentasyonu
- Yapısal proteinlerin yıkılmasıyla apoptozise ait morfolojik değişikliklerin gerçekleşmesi (L. Mis ve A. Ç. Yeltekin).

1.1.2.4.1. Bcl-2

Bcl-2 proteini (B-hücreli lenfoma 2), Bcl-2 protein ailesinde anti-apoptotik görev yapan proteindir. Bcl-2 ile ilişkilendirilmiş protein ailesi, apoptotik hücre ölümünü indükleyen (bax, bak, bim) ve baskılayan (bcl-2, bcl-x) birçok proteinden oluşur. Hücre yaşayabilirliği, bu gen ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin nispi oranına bağlıdır. Bax geninde kodlanan protein, Bcl-2 protein ailesinde bulunur. Bcl-2 ailesi üyeleri, heterodimer ya da homodimerler oluşturur. Farklı hücresel aktivitelerde bulunan anti-apoptotik ya da pro-apoptotik düzenleyici olarak işlev görür (Patty, Safitri, & Saraswati, 2020).

Bu protein Bcl-2 ile bir heterodimer oluşturur ve bir apoptotik aktivatör olarak işlev görür. Bax ile Bcl-2 arasındaki ilişki ve oran ayrıca bir apoptotik uyarıyı takiben bir hücrenin hayatta kalmasını veya ölümünü belirler. Bu heterodimerlerden Bcl-2/Bax oranında artış ya da azalışın olması apoptozun inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bcl-2/Bax oranı artarsa apoptoz inhibe edilir. Bcl-2/Bax oranı azalırsa pro-apoptotik olay gerçekleşir (Akşit & BİLDİK, 2008).

1.1.2.4.2. Bax

Apoptozun düzenlenmesi Bcl-2/Bax gen ailesi tarafından sağlanmaktadır. Bu ailenin 20 üyesi tespit edildi; bunlardan birkaçı apoptoz inhibitörü (antiapoptotik) iken, diğerleri apoptozu uyarak proapoptotik genler olarak tanımlanır. Bax (proapoptotik) proteinleri, apoptotik sinyali aldıktan sonra mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltır. Zarda gerçekleşen değişiklikler sebebiyle mitokondri zarında bulunan sitokrom c ve AIF (Apoptoz İndükleyici Faktör) gibi faktörler sitoplazmaya geçer. AIF doğrudan yoğunlaştırılmış kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönlendirilirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun son aşamasında yer alır. Sitokrom c, sitoplazma proteini olarak bilinen Apaf-1'e bağlanır ve prokaspaz-9'u

aktifleştirir. Oluşan bu kompleks 'apoptozom' olarak adlandırılır. Bir dizi kaspaz aktivasyonunun oluşumu Prokaspaz-9'un aktifleşmesi ile gerçekleşir ve apoptozun düzenlenmesi devam eder (Akşit & BİLDİK, 2008).

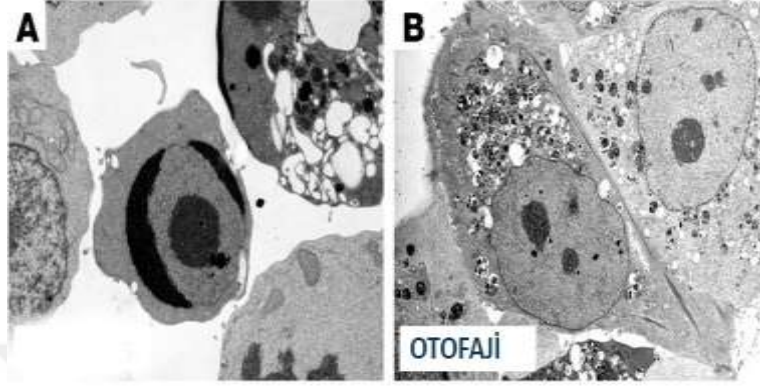
1.1.2.4.3. Kaspaz-3

Programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) önemli araçları kaspazlardır. Kaspaz-3, birden fazla önemli hücre proteinin özel bölünmesini katalizleyen çokça aktive edilen ölüm proteazıdır. Bununla beraber, bu (veya başka herhangi bir) kaspazın apoptozdaki özel gereksinimleri şimdiye kadar bilinmiyordu. Kaspaz-3 aktivasyonunda ki yollar, mitokondriyal sitokrom-c salınımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağımlı ya da bağımsız olarak tanımlanmıştır. Kaspaz-3, diğer apoptotik senaryolarda doku, hücre tipi veya ölüm uyarısı için özellikle önemli ya da esastır. Kaspaz-3 apoptoz için gereklidir ve çalışılan tüm hücre tiplerinde apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması için zorunludur. Bu sebeple kaspaz-3, hücre lizisi ve apoptotik cisimlerin oluşumu için önemlidir, ancak hücre canlılığı taahhüdünün kaybında veya öncesinde de işlev görebilir (Porter & Jänicke, 1999). Bu nedenle çalışmamızda, sepsis sırasında apoptoz patogeneğinde kaspaz-3'ün rolünü belgelemek için kaspaz-3-pozitif apoptotik hücrelerini değerlendirdik.

1.1.2.5. Otofaji

Otofaji, protein yıkımı ve organel döngüsü gibi homeostatik işlevleri koruyan, evrimsel olarak korunmuş bir katabolik süreçtir. Geleneksel olarak, otofaji, hücre stresine yanıt olarak hücrenin kalite kontrolü için bir hayatta kalma mekanizması olarak düşünülmüştür. Ek olarak, otofaji patojen enfeksiyonu, hipoksi, besin tükenmesi veya reaktif oksijen türleri (ROS) gibi hücre stres tarafından tetiklenebilir. Hücrenin zor şartlara uyum sağlamasını sağlayan bu özelliği ile hayati organları tüketerek ölüme neden olur (Karadağ, 2016). Tip II programlı otofajik hücre ölümünde en göze çarpan morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki ya da daha çok katmanlı zarla (üst üste iki ya da çok fazla lipid tabakası) çevrilmiş veziküllerin oluşmasıdır. Bu veziküller sitoplazma fragmentleri ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içerir. Bu sebeple otofajik veziküller, taşıma vezikülleri ve stres veziküllerinden farklı olarak elektron mikroskopunda

“elektronca yoğun” olarak görülür. Son olarak otofaji vezikülleri lizozomla birleşerek içlerinde taşıdıkları yükün lizozomal enzimlerle parçalanmasını sağlar (Arslan, Korkmaz, & GÖZÜAÇIK, 2011).



Şekil 2. Normal hücre ve otofajik hücre

Kaynak. Levine & Yuan (2005)

Artmış otofajiye sahip hücrelerde programlanmış ölüm, apoptozdan çok farklı morfolojik ve moleküler özelliklere sahiptir. Kromatin yoğunlaşması gibi nükleer spesifik değişiklikler, apoptotik hücre ölümüne göre otofajik hücre ölümünde çok daha sonra meydana gelir. Ölüm kaspaz aktivitesine bağlı olmadığı için apoptoz oluşumu gözlenmez. Ayrıca otofajide ölü hücrelerin fagositozla temizlenmesi apoptoza göre çok daha geç ve düzensiz bir şekilde gerçekleşir. Tüm bu gözlemler ve veriler, otofajik hücre ölümünü farklı bir ölüm türü olarak sınıflandırmanın doğru olduğunu göstermektedir (Arslan et al., 2011).

1.1.2.5.1. Beclin-1

Beclin-1, otofajik programlanmış hücre ölümüne dahil olan tümörjenez ve nörodejenerasyonda önemli bir rol oynar (Zhong et al., 2009). Beclin 1, Bcl-2'nin bir etkileşim ortağı olarak keşfedildi ve başta tümörjenez olmak üzere birçok mekanizmada yer alıyor (Alkurt). Bcl-2, belcin-1 gibi anahtar otofajik proteinlerle doğrudan etkileşerek otofajinin düzenlenmesinde rol oynar. Bcl-2, otofaji proteini Beclin-1 ile doğrudan etkileşim yoluyla otofajiyi inhibe eder (Karadağ, 2016).

1.1.2.5.2. LC-3

LC3, otofaji substrat seçiminde ve otofagozom biyogenezinde işlev gördüğü otofaji yolunda merkezi bir proteindir. LC3 geni: MAP1 LC3B mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3 beta.LC3, otofagozomların en yaygın kullanılan belirtecidir (Menna-Barreto, 2016).

LC-3 otofaji de rol oynayan proteinler içerisinde bulunur. Otofajinin regülasyonunda en önemli proteindir. Otofajinin hücresel yolakta nasıl yol izlediğini anlamak için LC3-II/LC3-I oranı kullanılır. LC3-I, sitoplazmanın içerisinde bulunur ve otofaji aktive edildikten sonra, otofagozom içeriği tamamen bozulur (CAN).

1.1.3. Sepsis ve Septik Şokta Prognoz

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu bulgularının bir enfeksiyona bağlı olarak ortaya çıkması “sepsis” olarak tanımlanır. Sepsis ile birlikte doku perfüzyonunun azaldığı ya da organ disfonksiyonu geliştiği durumlarda “ağır sepsis” tanımı kullanılmaktadır. Şiddetli sepsiste hipotansiyon vardır: Sistolik kan basıncı <70 mm Hg'dir. Sepsise bağlı bu hipotansiyon uygun sıvı replasmanına rağmen düzelmezse “septik şok” evresindedir. Septik şok, serum laktat düzeyinde artış, oligüri, konfüzyon doku perfüzyonunun azaldığını gösteren bulgulardır. Şiddetli sepsis ve septik şokta mortalite çok yüksektir. Septik şok sepsis hastalığı olanların çoğunda görülür ve septik şok geçiren hastaların çoğunluğu ölür. Mortaliteyi azaltmak ancak erken tanı ve destek tedavisi ile önlenir (ÇALANGU).

1.1.4. Sepsis ve Septik Şokta Tanı ve Tedavi

Sepsis tanısı konulmuş hastalara antibiyotikle tedaviye başlanılabilmesi için uygun kültür örneklerinin alınması gerekir. En az biri periferik venden olmak üzere en az iki kan kültürü alınmalıdır. Aynı zamanda kültür için damarda 48 saatten fazla kalmış kateterlerden de kan örneği alınır. Bunun dışında gerekli görülen bütün örnekler (irin, idrar, trakeal, balgam, aspirat) alınarak mikrobiyolojik incelemesi yapılır. Enfeksiyonu belirlemek için hastanın durumuna göre tıbbi görüntüleme yöntemleri (CT, USG, eko,) kullanılır (ÇALANGU).

Septik şokta enfeksiyon şüphesi ve/veya vücut ısısında anormallik (her yaşta 38 0 C , >3 ay >38,5 0 C) olan hastalar değerlendirilmeye alınır (Duman et al., 2018).

Sepsis ve septik şokta odağın saptanması ve kontrolünden sonra, antibiyotik tedavisi, sıvı tedavisi, vazopressörler, inotropik tedavi steroid tedavisi ve rekombinan “human” aktive protein C (rhAPC) tedavileri uygulanır (ÇALANGU).

1.1.5. Septik Akciğer Hasarı

Sepsis, inflamatuvar mediatörlerin aktivasyonuna aynı zamanda salınmasına sebep olur. Akut akciğer hasarı (ALI) ve/veya akut solunum yetmezliği sendromu (ARDS) gelişmekte olan sistemik inflamatuvar yanıt sendromuyla ilişkilidir. Akciğer hasarı patofizyolojisinde aşırı oksidan üretimi sonucu antioksidan savunma sisteminin yokluğu ya da yetersiz antioksidan savunmasının yer aldığı düşünülmektedir. Savunma, bu oksidatif mekanizmalarla savaşmak ve organizmayı oksidatif strese karşı korumak için gelişir (Demirbilek et al., 2004).

1.1.6. Deneysel Sepsis Modelleri

Sepsis tedavilere, antibiyotiklere, immünoterapi ajanlarına ve yeni tedavilere rağmen %90'a varan çok fazla mortalite oranı gösterdiği için yoğun bakım ünitelerinde ölüme neden olan bir sağlık sorunudur. Bu sebep ile sepsis dünya üzerinde insanlarda ve deney hayvanlarında en çok araştırma yapılan hastalıklardan birisi olmuştur. Klinik çalışma öncesi ilaçların hayvan deneylerinde denenmesi ve incelenmesi gerekli olduğundan ve hayvanların da refahını tehdit eden hastalık olması nedeniyle hayvanlarda kullanılan birçok sepsis modeli vardır. Sepsis modelleri arasında fekal sepsis modelleri, lipopolisakkarit (LPS) gibi eksojen toksinin enjeksiyonu ile oluşturulan sepsis modeli, eksojen bakterinin infüzyonu ya da aşılamaıyla oluşturulmuş sepsis modelleri bulunmaktadır.

Sepsis oluşturulması için kullanılan kronik deneysel sepsis hayvan modelleri 3'e ayrılır: a) Lipopolisakkarit (LPS) gibi eksojen bir toksinin enjeksiyonuyla oluşturulan b) Fekal c) eksojen bakterinin infüzyonu veya aşılamaı ile oluşturulanlardır.

Lipopolisakkarit (LPS) ekzojen toksinin enjeksiyonuyla oluşturulmuş sepsis modelleri; *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram negatif bakterilerle LPS elde edilir. LPS toz halinde satılır ve deneyde sepsis modeli oluşturmak için suda çözündürülür ve sonra periton içerisine ya da damar içerisine enjekte edilir. Deneysel LPS modelinde kullanılan endotoksin miktarı, sepsis olan canlının endotoksin miktarından fazla olduğu için ve aynı zamanda tek tip bakteriden geldiği için klinikte var olan canlı ile oluşturulan model arasında uyumsuzluk olur. Bu sebep ile bir başka sepsis modeli olan çekal bağlama ve delme yöntemi tercih edilir.

Fekal sepsis modelinde ise fekal nakil kullanılır. Bu yöntemde hazırlanan fekal emülsiyon bütün abdominal bölgeyi kontamine etmesi için karın içine doğrudan enjekte edilir. Fekal sepsis modeli kliniğe en yakın sepsis modelidir. Ancak feçes çeşitliliğinden kaynaklı standardize edilemeyen ve deneysel olarak kontrol altına alınamayan sepsis modelidir.

Ekzojen bakterinin infüzyonu ya da aşılması ile oluşturulan sepsis modelinde periton ya da damar içerisine canlı bakterilerin enjekte edilmesiyle oluşturulur. Bu modelde en çok *Escherichia coli* bakterisi kullanılır.

Bu modelde sınırlı tipteki bakteriler (aerobik ve anaerobik suşlar dahi) kullanıldığından canlı bakterilerle oluşturulan sepsis modeli klinikteki polimikrobiyal sepsisi tam anlamıyla yansıtmaz (ERKAYMAN, 2020).

1.1.6.1. Çekal Bağlama ve Delme Yöntemi

Çekal bağlama ve delme yöntemi (*Cecal Ligation and Puncture – CLP*), 1980 yılında Wichterman ve ark. tarafından geliştirilmiştir. CLP yönteminin deneysel uygulaması kolay ve ucuz bir yöntemdir. CLP modeli sıçan, koyun ve farede kullanılmaktadır. CLP yöntemi ile oluşturulan sepsisin deneysel protokolü şu şekilde özetlenebilir: Genel anestezi altına alınmış sıçanlar sırt üstü yatırılarak sabitlenir. Abdominal bölge tıraş edilir ardından tıraş edilen bölge dezenfekte edilir. Batın genital çıkıntının önünden olacak şekilde 2 cm yukarı yönde açılır. Çekum çıkarılır ve çekal valf distalinden 3/0 dikişle bağlanır. Antimezenterik kenardan 18 G iğne ile her bir kenardan bir kez geçecek şekilde 2 kez delinir. Cilt, kas ve periton bölge önce 3/0 ipek suturela kapatılır. Karın bölgesi kapatıldıktan sonra hayvanın ağırlığına göre

deri altı sıvı takviyesi yapılır. CLP sayesinde, *Escherichia coli*, *Enterokok* bakteriler başta olmak üzere birden fazla bakterili bir septik tablo oluşturulmuştur. İlk 24 saat içerisinde %30 ile %70 arasında mortalite görülür. Klinik vakalarda görülen patofizyolojik değişiklikler birçok CLP modelinde de görülür. Bu değişikliklerin örnekleri, sıcaklık, kalp hızı ve kalp debisindeki iki fazlı değişiklikler, bozulmuş sol ventrikül kontraksiyonu, gereksiz glikoz kullanımı ve azalmış pulmoner ve sistemik vasküler dirençlerdir. Oluşturulmak istenen polimikrobiyal sepsisin standardize olabilmesi, oluşturulmak istenen sepsisin derecelerinin belirlenmesi için çekum hep aynı seviyeden bağlanmalı ve dışkı çıkışı için kullanılan iğnenin çapı ve delik sayısı aynı olmalıdır. Sepsis şiddeti artırılmak istenirse çapı büyük iğne kullanılır veya delik sayısı artırılır. Sepsis oluşturulurken hayvanların açlık-tokluk durumlarına dikkat edilmeli ve deneyden bir gece önceden hayvanlar beslenmemeli, aç bırakılmalıdır. Resüsitasyonun amacı ile hayvanlara sıvı verilip verilmemesi de sepsisin şiddetini değiştir (ERKAYMAN, 2020).

1.2. Statinler

Statinler, HMG-KoA redüktaz (3-Hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz) enziminin inhibitörü görevi yapan hipolipidemik özellikteki ilaçlardır. HMG-KoA redüktaz enzimi insanlarda, hepatik ve ekstrahepatik kolesterol biyosentezinde hız sınırlayıcı basamağında oluşturan HMG-KoA redüktazın mevalonata dönüşmesini katalizleyen enzimdir. Statinler, HMG-KoA redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe ederler (ÇETİN & ÖZGÜNEŞ, 2017).

HMG-KoA redüktaz enziminin inhibisyonu ile LDL kolesterol seviyesindeki azalma karaciğer hücre içerisinde görülür. Karaciğer hücrelerinde kolesterol düzeyindeki bu azalma, hücre yüzeyindeki LDL reseptörlerinin sayısında artışa ve plazma LDL düzeylerinde azalmaya neden olur. Statinler, LDL'nin periferik Emilimini artırır ve karaciğer hücrelerine ve diğer hücrelere girmesine izin verir. Hücrede yıkımı artırarak kolesterol seviyesinin düşmesini sağlar. Statinlerin kolesterol düşürücü etkileri dışında oksidasyon, inflamasyon ve hücre proliferasyonu, endotel fonksiyonları, pıhtılaşma ve trombosit sistemi üzerinde birçok etkisini gösterilmiştir (TÜRKEL & TERZİ, 2009).

Statin'ler lipid tedavisinde en başarılı ilaç grubudur. Statinler ile yapılan klinik çalışmalarda statinlerin LDL'yi düşürmeye yönelik girişimlerde etkisinin olduğu aynı zamanda güvenli olduğu gösterilmiştir. Ülkemizde klinik kullanımlarda mevcut olan statin çeşitleri ve kullanılan dozları şu şekildedir: Atorvastatin: 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg, fluvastatin: 80 mg (kontrollü salınımlı form) pravastatin: 40 mg, rosuvastatin: 10 mg, 20 mg, simvastatin: 10 mg, 20 mg, 40 mg. Statinler, grup içinde lipid düşürme açısından benzer olsa da, farklı statinlerle, aralarındaki potens farklarından dolayı, verildikleri dozlara bağlı olarak, farklı yüzdelerde LDL düşüşü elde edilir (NEDİR).

1.2.1. Statinlerin Antioksidan ve Antienflamatuvar Etkileri

Statin grubu ilaçlar LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak oksidatif stresi azaltırlar (Kilit, Koçak, & Kilit, 2017).

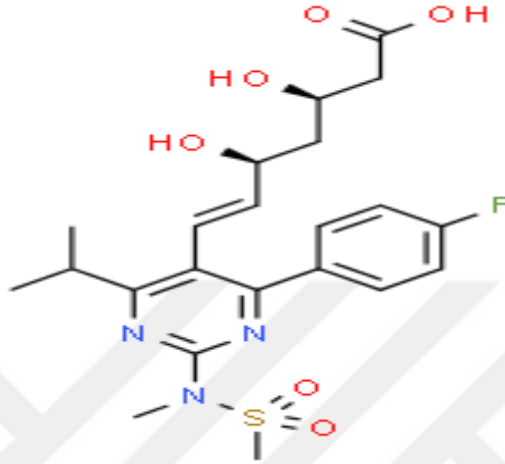
Statin grubu ilaçların kolesterol düşürücü etkilerinden farklı olarak antienflamatuvar, immunomodülatör ve antioksidan yönleri ile pleiotropik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Statinlerin antioksidan etkileri kardiyovasküler hastalıkların yanı sıra oksidatif stres ile ilişkili diğer kronik hastalıklarda da klinik olarak katkı sağlamaktadır (Saadat et al., 2020). Rosuvastatinin diğer statinlerden daha çok enzim baskılama özelliği ile birlikte diğer statinlerden daha yüksek pleiotrofik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Bradbury, Traini, Ammit, Young, & Ong, 2018). Fakat bu çalışma dışında literatürde rosuvastatinin sepsise karşı nasıl bir etkisinin olduğuna dair bir çalışma mevcut değildir. Statinlerin geniş kullanımı ile birlikte yeni immünomodülatör yönleri, bu ilaçların potansiyel etkilerinin incelenmesinin önemini vurgulamaktadır.

1.2.2. Rosuvastatin

1.2.2.1. Rosuvastatinin Moleküler Yapısı ve Genel Özellikleri

Rosuvastatin, kolesterol sentezinde hız sınırlayıcı adımdan sorumlu bir karaciğer enzimi olan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktazını rekabetçi bir şekilde inhibe ederek kolesterolün endojen sentezine müdahale ederek etki eden tam sentetik bir statindir. Aynı sınıftaki diğer moleküllerle karşılaştırıldığında, lipid

profilinin iyileştirilmesinde yüksek etkinlik gösterir ve kolesterol düşürücü olmayan etkileri (anti-inflamatuar, antioksidan ve antitrombotik) sayesinde kardiyovasküler birincil ve ikincil koruma sağlar. Rosuvastatin, 5 mg, 10 mg, 20 mg ve 40 mg'lık tabletlerde oral uygulama için piyasada bulunan tam sentetik bir lipid düşürücü ajandır (Cortese et al., 2016).



Şekil 3. Rosuvastatin moleküler yapısı

Kaynak. Chemspider

1.2.2.2 Temel Etki Mekanizması, Doku ve Organlar Üzerine Etkisi

Rosuvastatin iki lipid düşürücü ajanı birleştirir: hepatik kolesterol sentezi üzerinde özellikle güçlü inhibitör etkileri olan bir HMG-CoA redüktaz inhibitörü (yani statin) olan rosuvastatin ve kolesterolün bağırsak emilimini engelleyen enzimdir. Rosuvastatin sabit dozlu bir kombinasyonu (FDC), dünya çapında birçok ülkede yetişkinlerde primer hiperkolesteroleminin tedavisi için diyetle ek tedavi olarak edilmektedir. Ayrı ajanlar veya FDC olarak uygulanan rosuvastatin terapötik etkinliğini değerlendiren iyi tasarlanmış klinik çalışmalarda, rosuvastatin hiperkolesterolemili erişkinlerde düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü (LDL) ve toplam kolesterolü düşürmede rosuvastatin monoterapisinden (rosuvastatinin iki katı doz dahil) veya diğer statinlerden önemli ölçüde daha etkilidir. Ayrıca, rosuvastatin monoterapisi veya diğer statinler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek oranda hastaların önerilen LDL-C seviyelerine ulaşmasını sağlamıştır. Rosuvastatin bu kısa süreli çalışmalarda tedaviye bağlı veya ciddi advers olayların insidansı

açısından rosuvastatin monoterapisinden anlamlı bir farklılık göstermedi ve diğer statinlere benzer bir güvenlik profili sergiledi (Lamb, 2020).

1.2.2.3. Kardiyovasküler Sistem ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Kardiyovasküler (KV) hastalıklar tüm dünyada en başta gelen ölüm nedenidir. Son zamanlarda kardiyovasküler hastalıklara neden olan risk faktörlerinin belirlenmesi ve önlenmesinde ve kardiyovasküler ilişkili mortalite ve morbiditenin azaltılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu bağlamda hidroksimetilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri veya kısaca statinler rol oynamaktadır. Birincil ve ikincil kardiyovasküler korumada lipit düzeylerinin düşürücü tedavinin birincil hedefi LDL-kolesteroldür ve ilacı statinlerdir. LDL-kolesterol kan düzeyi ile ateroskleroz arasında yakın ilişki vardır. LDL kolesterolün düşürülmesinde en güçlü ve etkin ilaç grubu statinlerdir. Statinlerle yapılan klinik araştırmalarda fayda sağladığı kanıtlanmıştır. Son 20 yılda gerçekleştirilen klinik çalışmalarda, statin tedavisi ile sekonder korunmada tüm klinik aterosklerotik vasküler hastalık vakalarının azaldığı gösterilmiştir. Primer korunmada, yüksek LDL-kolesterolü veya ortalamanın altında HDL kolesterolü olan hastalarda statin tedavisi ile benzer fayda elde edilmiştir. Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda kan lipit parametrelerinin ölçümü tek başına hangi hastaların statin tedavisinden fayda görebileceğini belirlemede yetersizdir (Ertaş, 2011).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Alet ve Cihazlar

- Soğutucu (Arçelik, Türkiye/İstanbul)
- Yatay Jel Elektroforez Sistemi (Thermo Scientific Owl™ EasyCast™ B1 Mini Gel Electrophoresis Systems)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Consort EV233, ABD/Cohasset)
- Jel Dökümantasyon Sistemi (DNR MiniLumi, İsrail/Neve Yamin)
- Jel Görüntüleme ve İşleme Sistemi (DNR Bio-Imaging Systems/MiniLumi)
- Hassas Terazı (OHAUS Pioneer® Analytical, Filipinler/Batangas)
- Ligh Cyclor 480 II Roche (LightCycler® 480 Instrument II, İsviçre/Basel)
- 96'lık plate (Light Cyclor 480 Multiwell Plate 96, İsviçre/Basel)
- Mikrodalga Fırın (VESTEL MD-23)
- Mikropipet Seti (Eppendorf, Almanya/Hamburg)
- 1,5 ml'lik Mikrosantrifüj Tüpü (DNaz/RNaz Free) (Isolab)
- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge® 16, ABD/ Kaliforniya)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, ABD/Massachusetts)
- Otoklav (Nüve OT 40L, Türkiye/Ankara)
- Saf Su Cihazı (GFL Saf Su Cihazı 2104, Almanya/Burgwedel)
- Thermal Cyclor (Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cyclor, ABD/Kaliforniya)
- Vorteks (ZX3 VELP® SCIENTIFICA, İtalya/Usmate)
- Pipet uçları (ISOLAB)
- Tüp Standı (ISOLAB)
- Soğutmalı Santrifüj (SIGMA 1-14K)
- Çeker Ocak (BİLSER)
- pH Metre (Hanna Instruments pH 211)
- Mikrotom Cihazı (SHANDON AS325 RETRACTION)

- İnkübatör/Etöv (WiseCube)
- Floresan Mikroskop (BAB Görüntü İşleme ve Analizi Sistemi, Türkiye/Ankara)
- Işık Mikroskobu (Olympus/ CX21, Japonya/Tokyo)
- Poli-Lizin Kaplı Lam (SUPERIOR QUALITY)
- Cam şaleler (ISOLAB)
- Mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO)
- Mikroplaka yıkayıcısı (Biotek ELX50/8)
- Otomatik Doku Takip Cihazı Shandon Citadel 2000 (Thermo Scientific, Almanya)
- Doku Gömme Cihazı Leica (EG1150 H ve EG1150 C, Almanya)
- Mikrotom (Leica, RM2255)
- Ben Mari (Leica, HI1210)
- Doku Boyama Cihazına (Leica, ST5020 Multistainer Bath Array)
- Mikroskop Olympus DP72 kamera ataçmanlı (Olympus, Tokyo, Japonya)
- Mikroskop Olympus trioküler BX51 TF (Olympus, Tokyo, Japonya)

2.1.2. Kimyasal Malzemeler

- cDNA Sentez Kiti (NucleoGene cDNA Synthesis Kit (5X))
- qRT-PCR Mastermix (Hibrigen 2X SYBR Green qpcr MIX)
- RNA İzolasyon Kiti (Hibrigen Genel RNA izolasyon Kiti)
- Etil alkol ($\geq$ % 99,5 J.T Baker)
- Etidyum Bromür (EtBr) (SIGMA®, ABD/ Missouri, 1239-45-8)
- Tris Baz (Fisher Bioreagents®, ABD, BP152-500)
- SDS (BIO BASIC)
- Agaroz (Bio Basic Inc., Kanada)
- Hematoksilen (MERCK)
- Di sodyum fosfat (Na_2PO_4) (HIMEDIA)
- Tri sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (HIMEDIA)
- Sodyum di hidrojen fosfat, anhidrat (NaH_2PO_4) (HIMEDIA)
- Asetik asit (MERCK)

- Potasyum klorid (KCl) (HIMEDIA)
- Redükte glutatyon (GSH) (Sigma-Aldrich)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (HIMEDIA)
- Hidroklorik asit (HCl) (MERCK)
- Etanol (MERCK)
- Tiyoarbitürik asit (TBA) (MERCK)
- Ditiyobis 2 nitrobenzoik asit (DTNB) (Alfa Aesar)
- 1,1,3,3 Tetrametoksipropan (TEP) (Fluka)
- Formaldehit (Sigma-Aldrich)
- %96 Etanol (Merck)
- %100 Absolü etanol (Merck)
- Ksilen (Merck)
- Parafin (Merck)
- Pikrik Asit (Sigma-Aldrich)
- Fosfat buffer solüsyonu (PBS) (Sigma-Aldrich)
- Harris hematoksilen ve eozin G (H&E; Merck, GmbH Darmstadt, Almanya)

2.1.3. Çözeltiler

10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu

108 g Tris Baz, 55.65 g Borik Asit ve 40 ml 0.5 M EDTA (ph 8.0) ile bir karışım hazırlanarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi.

0.5X Elektroforez Yürütme Tamponu

Hazırlanan 10X TBE'den 50 ml alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Jel Boyama Solüsyonu (0.5 µg/ml)

1X TBE içerisinde 0.5 µg/ml etidyum bromür olacak şekilde stok (5 mg/ml) etidyum bromür çözeltisinden alınarak hazırlandı.

Agaroz Jel (50 ml)

% 0.8'lik jel hazırlamak için 0.4 g agaroz, %1 lik jel hazırlamak için 0.5 g agaroz 50 ml 0.5X TBE çözeltisine eklendi. Çözelti agaroz çözülene kadar mikrodalga fırında

ısıtıldı. Soğuması için bekletilen (60°C'ye kadar) çözeltiye sonrasında 5 µl Etidyum Bromür eklendi.

6X Yükleme Tamponu

- %0.25 Bromofenol mavisi
- %0.25 Ksilen siyanol
- %30 Gliserol, eklenerek hazırlanıp +4 °C'de saklandı.

Doku Homojenizasyon Tamponu (TBARS ve Toplam Tiyoil Tayini)

0,94 g NaH₂PO₄, 10,44 g KCl 1,73 g Na₂HPO₄ tartıldı. pH 7,4 olarak sabitlendi.. Son hacim 1000 ml tamamlandı.

%8,1'lik SDS

8,1 g SDS tartılarak 100 mL distile su ile çözündürüldü.

%50'lik Asetik Asit

50 mL asetik asit 50 mL distile su ile çözündürüldü.

%0,8'lik TBA

%50'lik asetik asit çözeltisi içerisinde 0,8 g TBA çözündürüldü ve %50'lik asetik asit ile 100 ml'ye tamamlandı.

%20'lik Asetik Asit

20 mL asetik asit pH 3,5'a ayarlandı. 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

0,3 M Na₂HPO₄ Çözeltisi

2,13 g Na₂HPO₄ tartılıp 50 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

Ellman Ayıracı Çözeltisi

%1'lik sodyum sitrat çözeltisi içerisinde 0,004 g DTNB reaktifi çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Deney Hayvanları ve Grupları

Çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylandı (Kabul Tarihi: 16/07/2020, Karar No:2020/32) ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi. Hayvan deneyleri protokolü Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası bulunan araştırmacılar tarafından gerçekleştirildi.

Uygun anatomik yapısı, filogenetik uygunluğu, fizyolojik olarak insana en yakın model olması ve daha önceki benzer çalışmalarda kullanılmış olması sebebiyle araştırmamızda 4-6 haftalık ve 270-300 gramlık erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanlarının üretilmesi ve barındırılması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Deney çalışmaları Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki araştırma laboratuvarlarında yürütüldü. Bulundukları ortama uyum sağlaması için sıçanlar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Üretim ve Uygulama Ünitesi içerisinde iki ve üçerli gruplar halinde (minimum kafes alanı 350 cm²; minimum kafes tavan yüksekliği 14 cm) sıcaklığı 25±2°C, bağıl nemi %32±7, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü uygulanan standart kafeslerde barındırıldı. Cerrahi işlem yapılana kadar hayvanların serbest yem ve su alımları sağlandı. Operasyona hazır olan deney hayvanlarına planlanan deney protokolü uygulandı.

Literatüre göre CLP yönteminde hayvan mortalite oranının %30'larda olabileceği ve istatistiksel anlamlılık dikkate alınarak toplamda 60 sıçanın kullanıldığı 6 deney grubu oluşturuldu.

Grup 1, Laparotomi (sham) grubu (n=10): Çekumun abdomenden çıkarılıp hafifçe yer değiştirilmesi sağlanarak sıçanların abdomenleri kapatılması ile laparotomi işlemi gerçekleştirildi. Laporotomi işleminden 4 saat önce oral olarak % 0.9 NaCl verildi.

Grup 2, CLP grubu (n=10): CLP protokolünden 4 saat önce oral olarak % 0.9 NaCl verilerek, sonrasında CLP protokolü gerçekleştirildi.

Grup 3, CLP + Rosuvastatin 10 mg/kg grubu (n=10): CLP protokolünden 4 saat önce oral olarak 10 mg/kg rosuvastatin verilerek, sonrasında CLP protokolü gerçekleştirildi.

Grup 4, CLP+ Rosuvastatin 20 mg/kg grubu (n=10): CLP protokolünden 4 saat önce oral yolla 20 mg/kg rosuvastatin verilerek, sonrasında CLP protokolü gerçekleştirildi.

Grup 5, Sham + Rosuvastatin 10 mg/kg (n=10): Laporotomi işleminden 4 saat önce oral olarak 10 mg/kg rosuvastatin verilerek, laporotomi işlemi gerçekleştirildi.

Grup 6, Sham+ Rosuvastatin 20 mg/kg (n=10): Laporatomi işleminden 4 saat önce oral olarak 10 mg/kg rosuvastatin verilerek, laporatomi işlemi gerçekleştirildi.

Önceden yapılmış çalışmalarda CLP uygulanan hayvanların takip süreleri esnasında %30'a varan oranlarda kayıp yaşandığı tespit edildiğinden, doku eldesi ve sonrasındaki sakrifikasyon işlemi 16 saat sonra uygulandı.

2.2.2. Çekal Bağlama ve Delme Yöntemi

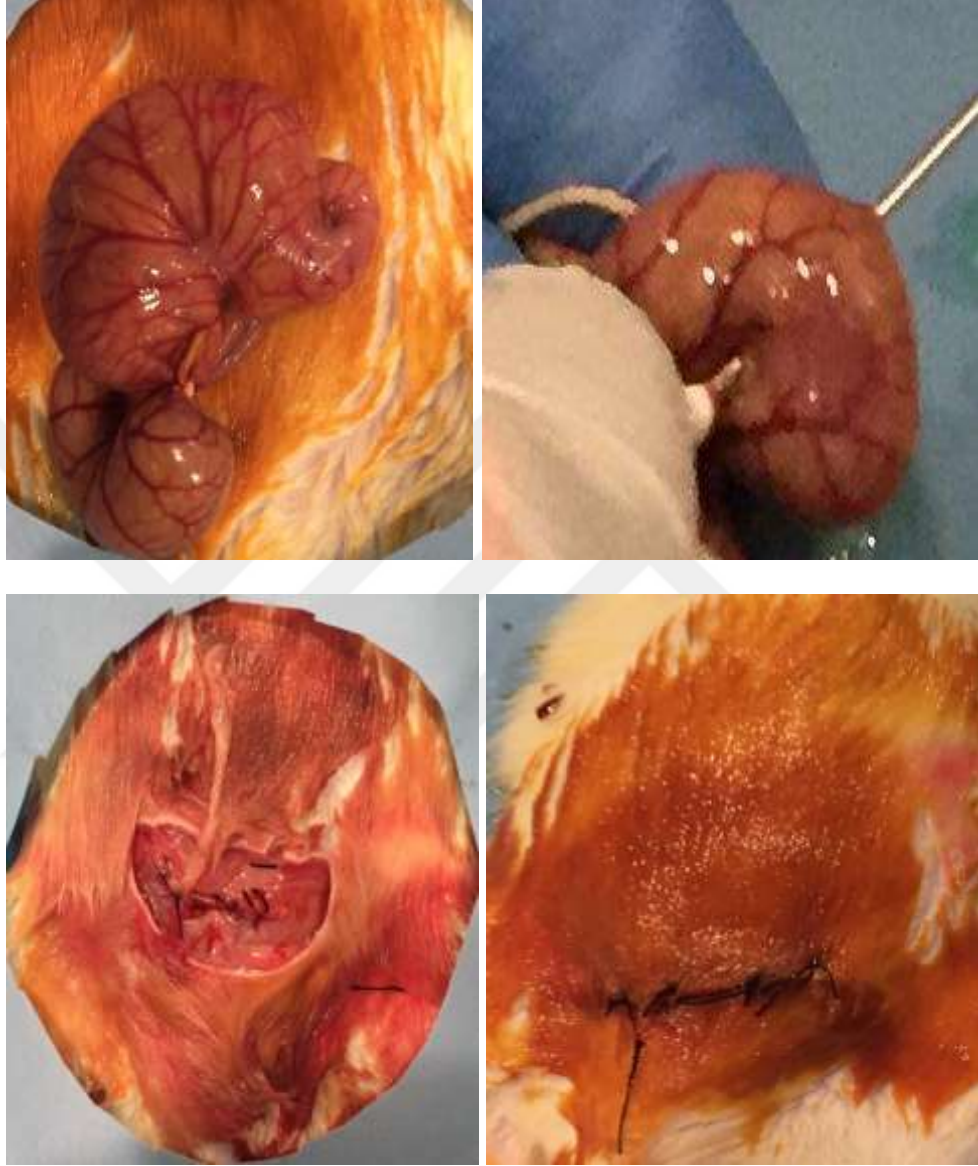
Tüm cerrahi işlemler 3'e 1 oranında ketamin (500 mg/10ml) ve rompun (%2'lik, 25 ml) anestezisi altında yapılarak deney hayvanlarının acı hissetmemeleri sağlandı. Anestezi yapıldıktan sonra hayvanların aneztesi durumu, cilt ve parmak kıstırma cevapları ile takip edildi. Anestezi altındaki deney hayvanlarının alt abdominal bölgeleri traş edildi. Abdominal kısım antiseptik özellikli gazlı bezlerle en az 3 kez yukarıdan aşağıya silinerek dezenfekte edildi.



Şekil 4. Abdomenin açılması (a) ve çekumun eksplere edilmesi (b)

oldukları anlaşıldığında karın orta hat alanında 2,5 cm uzunlamasına bir kesik oluşturuldu (Şekil 4). Bu küçük kesiden abdominal organlar ve çekum izole edilerek distalinde 3/0 ipek sütur ile çekal valfde bağlandı. Çekumun distaline 18-gauge iğne ile mezenterden karşı tarafa çıkacak şekilde iki delik açılarak çekum içeriği peritona temas ettirildi Sıçanların anestezide. Karın insizyonundan sonra iki kat halinde steril

4/0 sentetik emilebilir sütur ile kapatıldı. Yara, analjezi sağlamak amacıyla %1 lidokain solüsyonu ile yıkandı (Şekil 5).



Şekil 5. Çekumun bağlanması, perfore edilmesi ve abdomenin kapatılması

Sıçanlara operasyon sonrası yem verilmedi, fakat sakrifiye edileceği 16. saat sonuna kadar su verildi. Tüm gruplarda bulunan sıçanlara ameliyat sırasında ve 6. saat sonrası deri altına sıvı replasmanı yapıldı. 16 saat boyunca septik şartlar altında sıçanlar gözlemlendi, mortalite saatleri kayıt edildi ve ölüm oranları hesaplandı.

Sakrifiye edilen bütün hayvanların akciğer dokuları immunohistokimyasal ve histopatolojik incelemeler için içerisinde %10'luk formaldehit bulunan çözeltiye alındı.

2.2.3. Moleküler Genetik Analizler

2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu ve RNA İzolasyonu

Akciğer dokusundan RNA izolasyonu ticari kit (Hibrigen Genel RNA izolasyon Kiti) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon işlemi için kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki işlemler uygulandı.

Her 50-100 mg akciğer dokusundan alınan doku için 1 ml HT tamponu kullanılarak dokular bu solüsyon içerisinde homojen hale getirildi. Nükleoprotein kompleksinin tamamen parçalanması için buz üzerinde 5 dk. inkübasyona maruz bırakıldı. Daha yüksek saflıkta RNA elde edebilmek için +4°C'de, 12000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Tüp içerisinde bulunan süpernatant, yeni bir RNAaz bulundurmeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 200µl kloroform eklendi, 15 sn. vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırdı ve buz üzerinde 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Örnekler +4°C'de 12000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra karışım 3 kısma ayrıldı. En altta fenol kloroform fazı, bir arafaz ve en üstte RNA içeren renksiz faz. En üstteki renksiz faz pipet yardımıyla alttaki diğer fazların karışmamasına dikkat edilerek yeni bir RNAaz bulundurmeyen boş tüpe aktarıldı. Alınan renksiz fazın hacmine göre hesaplanarak üzerine ½ oranında önceden soğutulmuş etil alkol (EtOH) (%100) eklendi. Karışım vorteksle karıştırıldı, etanol eklendikten sonra gözle görülebilen çökelmeler oluştu. Karışım filtreli tüpe aktarıldı. +4°C'de 12000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi ve filtrenin altındaki tüpte toplanan sıvı atıldı. Filtreye 500 µl kit içerisinde bulunan RY1 solüsyonundan eklendi ve +4°C'de 12000 rpm'de 30 sn. kalacak şekilde santrifüj edildi ve yine altta kalan sıvı atıldı. Daha sonra filtreye 500 µl kit içerisinde bulunan RY2 solüsyonu eklendi, 1 dk. oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve +4°C'de 12000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi ve altta kalan sıvı atıldı. Bu aşama bir kez daha tekrarlandı. Filtreli tüp 12000 rpm'de 2 dk. kuruması için santrifüj edildi. Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Direkt olarak membran üzerine 30-100 µl DEPC ile muamele edilmiş su

eklendi. 2 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı, sonra RNA'yı bu su içerisinde toplamak için 12000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi. Tüp su içerisinde saf RNA bulundurmaktadır. Örnekler çalışmanın sonraki adımlarında kullanılmak üzere etiketlenerek -80 °C dondurucuda saklandı.

2.2.3.2. RNA Örneklerinin Saflık ve Konsantrasyon Analizi

Akciğer dokularından izole edilen RNA örneklerinin saflıklarını ve konsantrasyonlarını belirlemek için nanodrop spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific Multiskan™ FC Microplate Photometer) kullanıldı. Örnekler ve kör için 3 µl kullanılarak protokol gerçekleştirildi. Ölçümü yapılan örneklerin absorbans ve konsantrasyon değerleri belirlendi. RNA saflığının göstergesi olan A260/A280 oranı her örnek için hesaplanarak 2 civarında bulundu. RNA örneklerinin konsantrasyonları gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapmak için en düşük konsantrasyon olan 36 ng/µl'ye eşitlendi. Konsantrasyon eşitleme işlemi nükleaz içermeyen su ile yapıldı.

2.2.3.3. Agoroz Jel Elektroforez Analizi

İzole edilen RNA örneklerinin kalitesini görsel olarak belirlemek için çözeltiler bölümünde belirtilen protokole göre % 0.8'lik agaroz jel hazırlandı. Real Time PCR ürünlerinin varlığını tespit etmek için ise çözeltiler bölümünde belirtilen protokole göre %1'lik agaroz jel hazırlandı.

Hazırlanan karışımlar mikrodalga fırını ile ısıtılarak jel tablasına döküldü. Jel katı hale gelmesi için 30 dk bekletildi. Jel katılastıktan sonra tablanın içerisinde bulunan tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak, 0.5X TBE elektroforez tamponu içerisine yerleştirildi. Örnekler, 6X yükleme tamponu ile 5:1 (2 µl örnek + 3 µl dH2O: 1 µl yükleme tamponu) oranında karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler, 0.5X TBE tamponu içerisinde 70 V'da 45 dk yürütüldü. Jelde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, örnekler UV altında jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi.

2.2.3.4. cDNA Sentezi

Akciğer dokularından izole edilen RNA'lerden NucleoGene cDNA Synthesis Kit (5X) marka kiti kullanılarak cDNA elde edildi. cDNA sentezi için üretici firmanın önerdiği protokol basamakları uygulandı: İlk olarak 5X ters transkripsiyon master mix hazırlanması için kit bileşenleri buz üzerinde çözdürüldü. Reaksiyonu hazırlamak için gerekli bileşenlerin hacmi hesaplandı (gerekli bileşenler ve hacimleri Tablo 2'de belirtilmiştir)

Tablo 2. cDNA Reaksiyon bileşen ve hacimler

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
NucleoGene cDNA Synthesis 5X Kit Mix	4 µl	1X (1 µg da 10 pg total RNA)
RNA Örneği	5 µl	
Su (nükleaz bulundurmayan)	11 µl	
Toplam Hacim 20 µl		

Yapılan tüm pipetleme işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların spektrofotometre cihazında konsantrasyonları ölçüldü her örneğin konsantrasyon değerleri farklı olduğu için $M1 \times V1 = M2 \times V2$ formülü kullanarak son hacim 50 µl, son konsantrasyon değerinin 36,16 µg/µl olacak şekilde nükleaz içermeyen steril su ile seyrelterek konsantrasyonları eşitlendi. Konsantrasyonları eşitlenmiş RNA örnekleri üzerine primerler eklenerek karıştırıldı. Tüm bu işlemler buz üzerinde yapıldı. 20 µl'lik toplam reaksiyon hacmi için gerekli bileşenlerin hacmi hesaplandı (gerekli bileşenler ve hacimleri Tablo 2'de belirtilmiştir). 0.2 mL'lik her bir tüpün içerisine 16 µL revers transkripsiyon reaksiyon karışımı, hazırlanan 4 µL RNA ve primer karışımıyla toplam hacim 20 µL olacak şekilde birleştirildi. Hazırlanan karışım thermal cycler cihazı hazır olana kadar buz üzerinde

bekletildi. Thermal Cycler cihazı ile ters transkripsiyon işlemi aşağıdaki Tablo 3’de verilen koşullar kullanılarak thermal cycler programlandı.

Tablo 3. Thermal cycler koşulları

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25 °C	42 °C	85 °C	4 °C
Süre	5 dk	30 dk	5 dk	∞
Toplam reaksiyon hacmi: 20 µl				

2.2.3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time-PCR, QRT-PCR)

cDNA dönüşümü sonrasında akciğer dokularında Beclin, LC3, Bax, BCL2 ve Actb genlerinin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi, Light Cycler 480 II (Roche) cihazında Hibrigen 2X SYBR Green qPCR MIX ticari kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kullanılacak bileşenler +4°C’deki blok üzerinde çözünmeleri için bekletildi. İlgilenilen genlerin RNA ekspresyonunu normalize etmek için Actb geninin ekspresyon seviyeleri dahili bir referans olarak kullanıldı. Actb referans genine ait Forward Primer:5’-ACA ACC TCC TTG CAG CTC CTC-3’, Reverse Primer: 5’-CTG ACC CAT ACC CAC CAT CAC-3’ bilgileri üretici firmanın veri tabanından elde edildi (Microsynth). Sonuçlar LightCycler 480 II SW 1.5.1 programında yer alan “Abs Quantification/2nd Derivate Max for All Samples” analiz metodu ile değerlendirildi ve total RNA miktarı Actb referans geni ile normalize edilip $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü uygulanarak ekspresyon hesaplaması yapıldı.

Gen ifadelerinin analiz edilmesi için yapılan qPCR’da kullanılan primer dizileri aşağıda ki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4. Gen primer dizileri

Gen	Primer dizisi
Beclin	Forwad: 5’-TTC AAG ATC CTG GAC CGA GTG AC-3’ Reverse: 5’-AGA CAC CAT CCT GGC GAG TTT C-3’
LC3	Forwad: 5’-AGT GGA AGA TGT CCG GCT CAT-3’ Reverse: 5’-GCT GCT TCT CAC CCT TGT ATC G-3’
Bax	Forwad: 5’-AGA CAC CTG AGC TGA CCT TG-3’ Reverse: 5’-GGT GTT CAG TTC ATC GCC-3’
BCL-2	Forwad: 5’-GGT GAA CTG GGG GAG GAT TG-3’ Reverse: 5’-AGA GCG TTG TCC ACC AG-3’
Actb	Forwad: 5’-ACA ACC TTC TTG CAG CTC CTC-3’ Reverse: 5’-CTG ACC CAT ACC CAC CAT CAC-3’

qRT-PCR için Örneklerin Cihaza Yükleme ve Reaksiyonun Başlatılması

Örneklerdeki Beclin-1, LC3, Bax, Bcl-2 ve Actb genlerinin gen ekspresyonlarının kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile tespiti için Tablo 5’de belirtilen reaksiyon bileşenleri ticari kit (Hibrogen 2X SYBR Green qPCR MIX) kullanılarak hazırlandı. Örnek sayısına göre hazırlanan reaksiyon karışımı ve cDNA’lar, 96 Multiwell plate üzerinde yer alan her bir kuyucuğa eşit hacimde (16 µl reaksiyon karışımı + 4 µl cDNA) kuyucuklara yüklendi. Platein üzeri Light Cycler® 480 Sealing Foil ile kapatılarak cihaza yüklendi.

Tablo 5. qRT-PCR Reaksiyon bileşenleri ve hacimleri

Bileşen	Hacim	Son konsantrasyon
2X SYBR Green qPCR Mix	10 µl 1X	1X (1 µg da 10 pg total RNA)
Forward Primer (10 µM)	1 µl	0.4 µM (0.2~0.6 µM)
Reverse Primer (10 µM)	1 µl 0.4 µM (0.2~0.6 µM)	
Kalıp DNA	4 µl	10 pg-1 µg
Su (nükleaz bulundurmayan)	4 µl	-

Örneklerin cihaza yüklenmesinin ardından LightCycler 480 SW 1.5.1 programında aşağıda Tablo 6’de verilen koşullar programa girildi.

Delta CT (ΔCT) ve Delta Delta CT (ΔΔCT) değerlerinin hesaplanması

Gen ekspresyonu deneyinin sonucunda elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. β-aktin geni referans gen olarak kullanıldı. İlk olarak araştırılmak istenilen genlerin Ct değeri ve referans genin Ct değeri arasındaki fark bulunarak normalize edilmiş ve delta Ct (ΔCt) değeri hesaplandı. Daha sonra kontrol grubunun ΔCt değerleri ile deney grubunun ΔCt değerleri arasındaki fark alınarak ΔΔCt değeri bulundu. Gen ifadelerinin kat cinsinden artan veya azalan değerler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplandı. Yapılan hesaplamaların formülü aşağıda gösterilmiştir.

$$\Delta Ct = Ct (\text{kontrol}) - Ct (\text{referans})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hedef}) - \Delta Ct (\text{kontrol})$$

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tablo 6. qRT-PCR için çalışma protokolü

PROGRAMLAR			
Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Metodu	
Pre-inkübasyon	1	Yok	
Amplifikasyon	55	Miktar Tayini	
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi	
Soğutma	1	Yok	
PROGRAM SICAKLIK HEDEFLERİ			
Hedeflenen Sıcaklık (°C)	Edinme Modu	Süre (sa:dk:sn)	Pik Değeri (°C/s)
Pre-inkübasyon			
95 °C	Yok	00:08:00	4.4
Amplifikasyon			
95 °C	Yok	00:00:10	4.4
58 °C	Yok	00:00:15	2.2
72 °C	Sürekli	00:00:20	4.4
Erime Eğrisi			
95 °C	Yok	00:00:05	4.4
65 °C	Yok	00:01:00	2.2
97 °C	Sürekli	Yok	0.11
Soğutma			
40 °C	Yok	00:00:30	1.5

2.2.4. Histolojik Analizler

2.2.4.1. Doku Takibi ve Kesit Alma İşlemleri

Sıçanlardan çıkarılan akciğer dokusundan elde edilen kesitler %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 48-72 saat süre ile tespit edildi. Histolojik değerlendirme için alınan dokular kasetlere koyularak doku takip cihazında (ThermoScientific™ Citadel 2000, İngiltere) takip edilip işlemlere devam edildi. Akciğer dokuları %50, %60, %70, %80, %96 ve %100'lük alkol solüsyonlarından geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Ksilen serilerinde bekletilerek şeffaflaştırma işlemi ile devam edildi. Doku takip cihazının son aşamasında parafin dolu haznelerde bekletilerek parafinin doku içine nüfuz etmesi sağlandı (Tablo 7).

Tablo 7. Akciğer dokularına ait histolojik doku takip aşamaları

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10'luk Formalin	48-72 saat
Dehidratasyon	%50'lik Etanol 1	180dakika
Dehidratasyon	%50'lik Etanol 2	75dakika
Dehidratasyon	%60'lık Etanol	90dakika
Dehidratasyon	%70'lik Etanol	90dakika
Dehidratasyon	%80'lik Etanol	60dakika
Dehidratasyon	%96'lık Etanol	60dakika
Dehidratasyon	%100'lık Etanol 1	75dakika
Dehidratasyon	%100'lık Etanol 2	75dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	90 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	90 dakika
Parafinizasyon	Parafin 1	60 dakika

Parafinizasyon	Parafin 2	210 dakika
Bloklama		

Doku takibi işleminin ardından kasetler parafin bloklama cihazına (Leica EG 1150 H made in Germany) alındı. Bloklan dokular soğutma ünitesinde (Leica EG 1150 C) bekletildikten sonra kesit kalitesini arttırmak için -20°C’de 3 saat bekletildi. Sonrasında parafin bloklardan kesit alma işlemine geçildi.

Parafin bloklardan rotary mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak (Leica RM2255) ilgili kesitler 37-38°C sıcaklıktaki distile su içeren benmari havuzuna (Leica HI 1210, Almanya) bırakıldı ve doku kırışıklıklarının açılması beklendikten sonra adhesivli ve pozitif şarjlı lamlara alındı.

2.2.4.2. Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyama

Lama alınan örneklerin kesitleri boyama yapılmasından önce hem dokulardaki parafinin uzaklaştırılması hem de kesitlerin lama daha iyi yapışması için 60°C’de 1 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemleri uygulandı. Yıkama işlemlerinden sonra kesitler Harris hematoksilen ve eozin G (H&E; Merck, GmbH Darmstadt, Almanya) ile boyandı (Tablo 8).

Tablo 8. Hematoksilen ve Eozin Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C’lik Etüv	60 dakika
Deparafinizasyon	Boyama cihazı fırın	5 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen	3 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen	3 dakika
Rehidratasyon	%100’lük etanol	1 dakika
Rehidratasyon	%96’lık etanol	2 dakika
Rehidratasyon	%90’lık etanol	2dakika

Rehidratasyon	%80'lik etanol	2 dakika
Rehidratasyon	%70'lik etanol	2 dakika
Yıkama	Musluk suyu	5 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Boyama	Harris Hematoksilen	1dakika10 saniye
Yıkama	Musluk Suyu	5 dakika
Boyama	Eozin G	8 dakika30 saniye
Yıkama	Musluk suyu	15 saniye
Dehidratasyon	%70'lik etanol	20 saniye
Dehidratasyon	%80'lik etanol	15 saniye
Dehidratasyon	%90'lık etanol	15 saniye
Dehidratasyon	%100'lük etanol	15 saniye
Dehidratasyon	%100'lük etanol	15 saniye
Şeffaflaştırma	Ksilen	5 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	Kapama

2.2.4.3. İmmunohistokimyasal (IHC) Analiz

Çalışmamızda pro-inframatuvar sitokinleri belirlemek için NF- κ B/p65 primer antikor (rabbit polyclonal, ab16502, Abcam, UK) ile beraber sekonder antikor (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), ab205718, Abcam, UK) kullanıldı. Bunun yanın da apoptotik pnömositleri belirlemek için kaspaz-3 primer antikor (rabbit polyclonal, ab44976, Abcam, UK) ile beraber sekonder antikor (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), ab205718, Abcam, UK) kullanıldı. Ayrıca DNA hasarını belirlemek için 8-OHdG primer antikor (rabbit polyclonal, ab16502, Abcam,

İngiltere) ile birlikte sekonder antikor (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), ab205718, Abcam, İngiltere) kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama cihazı kullanılarak (Leica Bond-Max, Avustralya) örnekler primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edildi.

Akciğer dokularından 4-5 µm kalınlığında alınan kesitler doku çevresindeki parafininin erimesi için 1 saat boyunca 60°C sıcaklıkta etüvde bekletildi. Bundan sonra yapılan aşamaların tamamı oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Parafinin dokudan tamamen uzaklaştırılması için 10 dakika süreyle iki kez ksilenle bekletildi. Sonrasında sırasıyla %100, %96, %90, %80, %70'lik alkol serilerinde 5'er dakika bekletildi. Bundan sonraki işlemlerde primer antikor üretici firmanın önerdiği şekilde boyama işlemlerine devam edildi (Tablo 9).

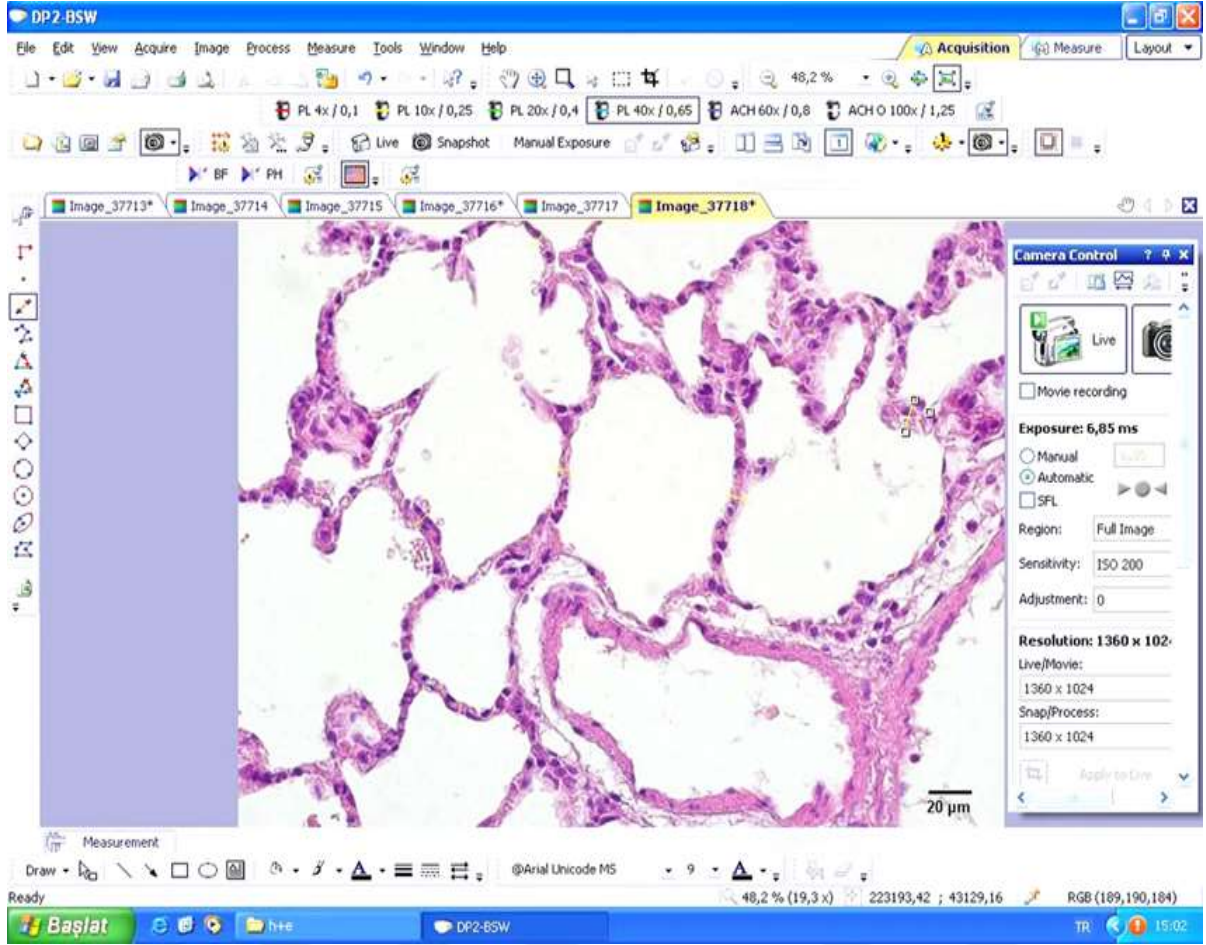
Tablo 9. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C'lik Etüv	60 dk
Deparafinizasyon	Ksilen	10 dk
Deparafinizasyon	Ksilen	10 dk
Rehidratasyon	%100'lük etanol	5 dk
Rehidratasyon	%96'lık etanol	5 dk
Rehidratasyon	%90'lık etanol	5 dk
Rehidratasyon	%80'lik etanol	5 dk
Rehidratasyon	%70'lik etanol	5 dk
Yıkama	Distile su	5 dk
Endojen enzim blokajı	%3'lük Hidrojen peroksit blok	10 dk
Yıkama	PBSx2	10 dk
Blokaj	Protein blok	10 dk

Yıkama	PBS	15 saniye
Antikor	Primer antikor	1 saat
Yıkama	PBSx4	10 dk
Boyama	Biotinylatedsinoat anti-polyvalent	10 dk
Yıkama	PBSx4	10 dk
Boyama	SteptavidinPeroxidase	10 dk
Yıkama	PBSx4	10 dk
Boyama	DAB	5-10 dk
Yıkama	PBSx	10 dk
Boyama	Harris hematoksilen	3 dk
Yıkama	Musluk suyu	3 dk
Dehidratasyon	%70'lik etanol	5 dk
Dehidratasyon	%80'lik etanol	5 dk
Dehidratasyon	%90'lık etanol	5 dk
Dehidratasyon	%100'lük etanol	5 dk
Dehidratasyon	%100'lük etanol	5 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dk
Kapama	Entellan	Kapama

2.2.4.4. Yarı Kantitatif Analiz

Hematoksilen ve eozin ile boyanmış akciğer dokusuna ait kesitler Olympus DP71 (Olympus Corp., Japonya) digital kamera ataçmanlı Olympus BX51 (Olympus Corp., Japan) ışık mikroskopunda görüntülendi. Kesit görüntülerindeki alveolar septal duvar kalınlığı, Olympus DP 2.0 (Olympus Corp., Japonya) bilgisayar programının arbitrary probu vasıtasıyla ölçüldü (Şekil 6).



Şekil 6. Olympus DP 2.0 (Olympus Corp., Japonya) bilgisayar programı

Histopatolojik analiz için akciğer örnekleri alveolar inflamasyon, interstisyel inflamasyon, vasküler konjesyon ve alveolar septal kalınlık bakımından değerlendirildi. Akciğer dokusu hasar skoru, Matute-Bello ve arkadaşlarının akciğer hasar skoru (LDS) kullanılarak hesaplandı. Her bir akciğer dokusu kesitinde otuz beş farklı alan değerlendirildi. Matute-Bello ve arkadaşlarının akciğer hasarı skorlamasına göre yüzdelik hasar durumu seviyesi 0, 1, 2 veya 3 ile skorlandı. Alveolar septal kalınlığının skorlaması, uygulama grubunun sham grubuna oranı hesaplanarak oluşturuldu. Bu oran 1 katın altında ise 0, 2 katından az ise 1, 2 katından fazla ise 2, 4 katından fazla ise 3 olarak puanlandı (Tablo 10).

Tablo 10. Matute-Bello ve ark. Akciğer Hasar Skoru (LDS)

Bulgular	Skor			
	0	1	2	3
Alveolar inflamasyon	$\leq\%5$	$\%6-\%25$	$\%26-\%50$	$\geq\%50$
İnterstisyel İnflamasyon	$\leq\%5$	$\%6-\%25$	$\%26-\%50$	$\geq\%50$
Vasküler Konjesyon	$\leq\%5$	$\%6-\%25$	$\%26-\%50$	$\geq\%50$
Alveoler septal kalınlık (uygulama grubu/sham grubu)	$\leq X1$	$< X2$	$\geq X2$	$\geq X4$

İmmünohistokimya (IHC) analizi için antikor kullanılarak işaretlenen immün-pozitif hücreler Tablo 10'da gösterildiği gibi pozitiflik puanlamasına tabi tutuldu. Her doku bölümüne 0, 1, 2 veya 3 puan verildi. Etkilenen hücre oranı %5'den az ise 0 (Yok), %5-25 ise 1 (Hafif seviye), %26-50 ise 2 (Orta seviye), %50'den fazla ise 3 (Yoğun seviye) olarak örnekler skorlandı. Her bir kesitte rastgele belirlenen otuz beş farklı alan skorlandı.

Tablo 11. İmmünohistokimyasal boyama pozitifliği skorları

Yok	0	$<\% 5$
Hafif Seviye	1	5-25%
Orta Seviye	2	26-50%
Yoğun Seviye	3	$\%50>$

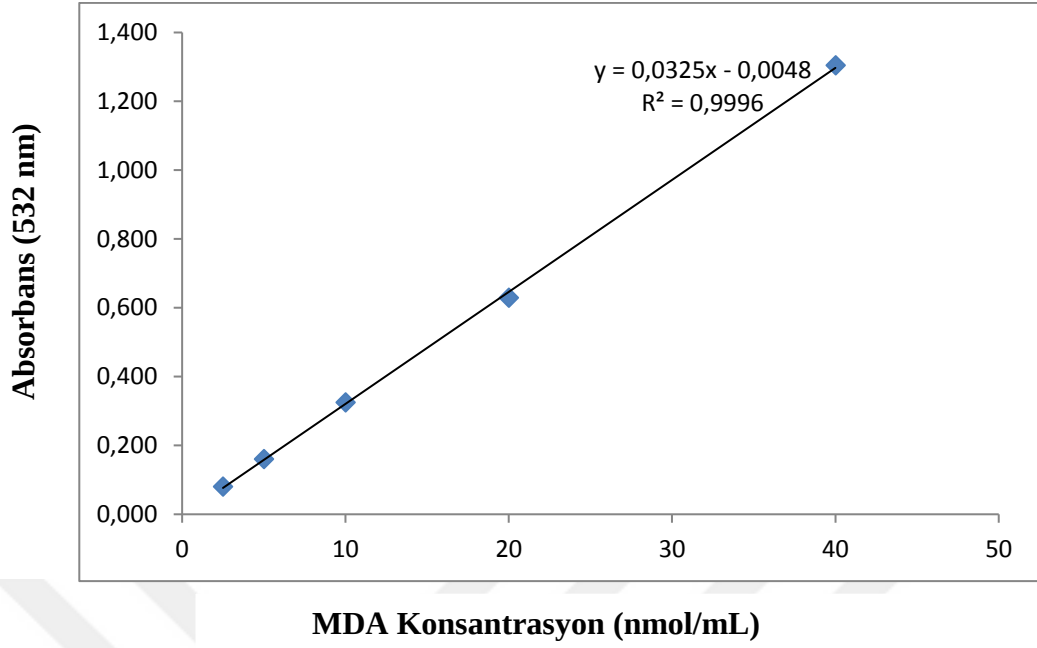
2.2.5. Biyokimyasal Analizler

2.2.5.1. Doku Homojenizasyonu

Akciğer doku örnekleri 0,1 g olarak tartıldı. Ağırlık/hacim oranı 1/10 g/mL olacak şekilde hesaplanarak kit içerisinde çıkan homojenizasyon tamponu içine alındı. Alınan örnekler buz üzerinde taşınarak homojenizatör cihazına yerleştirildi. Homojenizatör cihazında 30 sıklık/saniye devirde 5 dakikada parçalanması sağlandı. Parçalanmış dokular santrifüjde +4° C’de 800 g’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj edilen dokuların süpernatantları biyokimyasal analizlerde kullanıldı.

2.2.5.2. Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi

Serbest hidroksil radikallerinin son ürünü ve lipid peroksidasyonun belirteci olan malondialdehit (MDA) seviyesi, tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin (Thiobarbituric Acid Reactive Substance: TBARS) tayini ile ölçüldü. TBARS tayini Ohkawa ve arkadaşlarının (1979) yöntemine göre yapılmıştır (Tabakoğlu & Durgut, 2013). Her bir örnek için, 200 µL akciğer dokusu süpernatantı, 50 µL %8.1 sodyum dodesilsülfat (SDS), 375 µL %20’lik asetik asit (v/v), 375 µL %0.8’lik tiyobarbitürik asit (TBA, pH 3.5) kullanılarak ependorflarda karışım hazırlanıp vortekslendi. Ependorflardaki doku örnekleri reaksiyon için sıcak su banyosunda (95 °C) 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 5 dk buzlu suda soğutulan örnekler, 750 g devirde 10 dk santrifüj edildi. Soğutulan örnekler 96 kuyucuktan oluşan plakalara pipetlenerek 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutuldu. TBARS standart grafiği çizilerek konsantrasyon nmol/mL olarak hesaplandı.

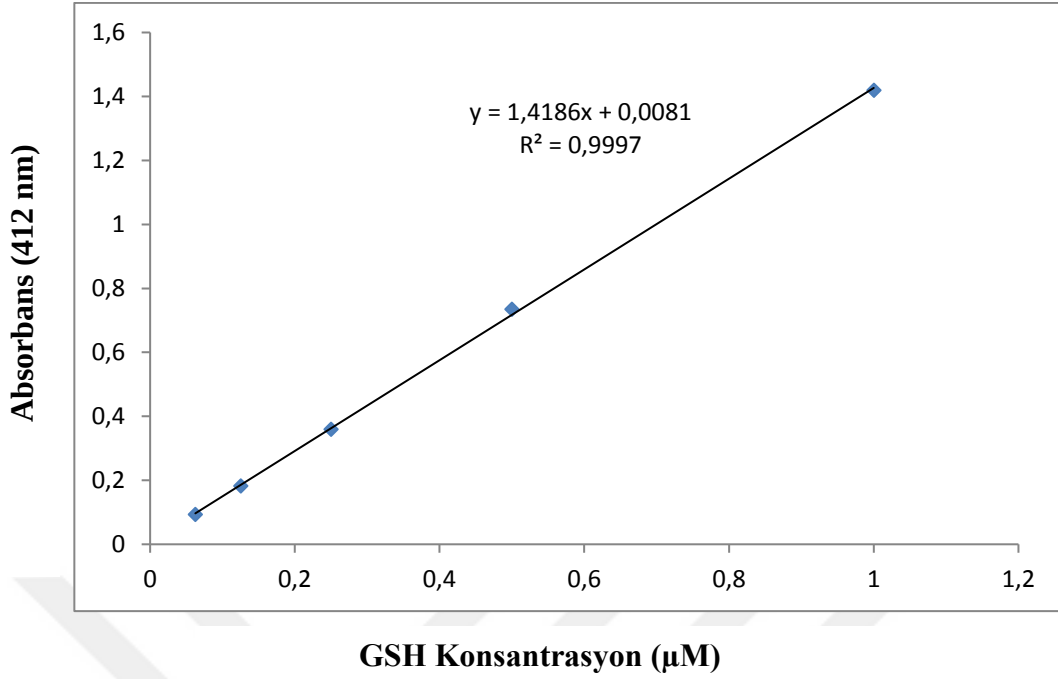


Şekil 7. MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafiği

2.2.5.3. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analizi

Akciğer dokusunda toplam tiyol tayini için Ellmann yöntemi kullanıldı. Dokuda Ellmann ayırıcı kullanılarak –SH grupları belirlendi. Bu analizler için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

- Ellmann ayırıcı için 4 mg Ditiyobis 2 nitrobenzoik asit (DTNB), %1'lik sodyum sitrat çözeltisi içinde çözüldü.
- 250 µL doku süpernatantı üzerine 1000 µL 3M Na₂HPO₄ ve 250 µL DTNB çözeltisi eklenerek vortekslendi.
- Örnekler 412 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okundu. 1000 µM- 62.5 µM aralığındaki standart çözeltiler kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Bu grafiğe göre örneklerin GSH konsantrasyonu µM olarak belirlendi.



Şekil 8. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Analizi kullanılan standart grafiği

2.2.6. İstatiksel Analizler

Ekspresyon çalışmasında, Beclin, LC3, Bax, BCL2 genleri için, akciğer doku örneklerine ait Cp verileri Actb geni için elde edilen veriler referans kullanılarak normalize edildi. Analiz için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü uygulanarak, veriler istatistiksel analiz için uygun hale getirildi.

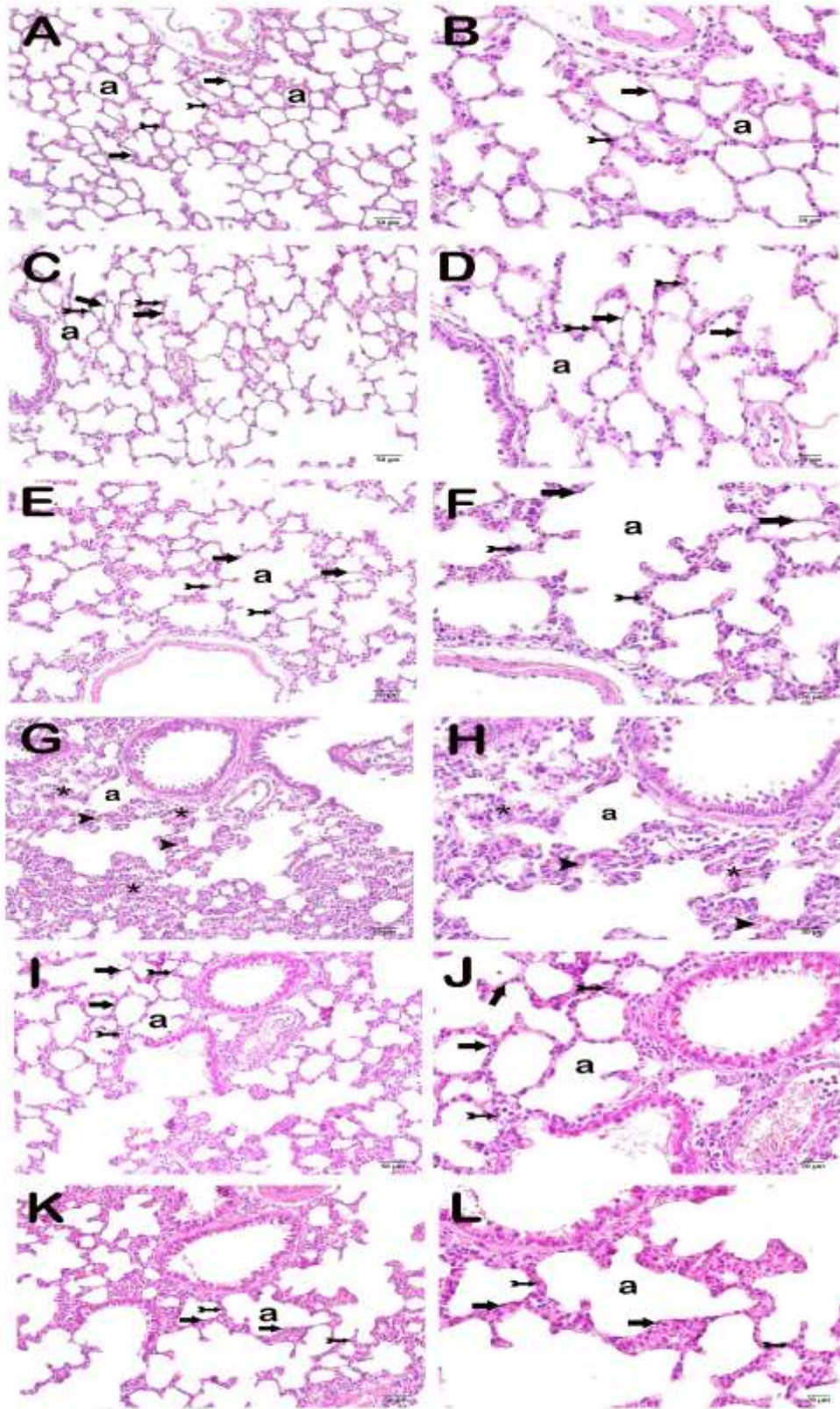
Kantitatif, yarı kantitatif ve biyokimyasal verilerden elde edilen sonuçlar SPSS 18.0 istatistik yazılımı (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak analiz edildi. Yarı niceliksel analizden elde edilen parametrik olmayan veriler, çeyrekler arası aralıkla medyan olarak hesaplandı. Parametrik olmayan veriler Kruskal Wallis testi ve ardından Tamhane T2 testi kullanılarak analiz edildi. Biyokimyasal analizden elde edilen parametrik veriler ortalama±standart sapma olarak hesaplandı ve gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizine (ANOVA) ve ardından Duncan testine tabi tutuldu. p değerleri <0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Histolojik Bulgular

3.1.1. Hemotoksilen Eozin (H&E) Boyama Bulguları





Şekil 9. Harris Hematoksilen ve Eosin G ile boyanmış akciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.

Alveol (a), Tip I pnömosit (ok), Tip II pnömosit (kuyruklu ok).

A(x20)-B(x40): Sağlıklı kontrol grubuna ait kesitlerde normal yapıdaki Tip I pnömosit (ok) ve Tip II pnömositlerden oluşan alveol (a) septal duvarlar gözlemlendi (LDS: 0(0-0.5)).

C(x20)-D(x40): CR10 mg tedavi grubuna ait kesitlerde tipik yapıdaki alveol septal duvar yapıları gözlemlendi (LDS: 0(0-1)).

E(x20)-F(x40): CR20 mg tedavi grubuna ait kesitlerde tipik yapıdaki Tip I pnömosit (ok) ve Tip II pnömositlerden (kuyruklu ok) oluşan alveol (a) yapıları gözlemlendi (LDS: 1(0-1)).

G(x20)-H(x40): CLP uygulama grubuna ait kesitlerde alveolar septal duvar yapılarında kalınlaşmalar (yıldız) gözlemlendi. Bunun yanında, interstisyel alanlarda yaygın vasküler konjesyonlar (ok başı) gözlemlendi (LDS: 5(4-7)).

I(x20)-J(x40): CLP+CR10 mg tedavi uygulama grubuna ait kesitlerde alveolar septal duvar kalınlığında azalma ve interstisyel alanlardaki vasküler konjesyonlarda azalma olduğu gözlemlendi. Bunun yanında, tipik yapıdaki Tip I pnömosit (ok) ve Tip II pnömositlerden (kuyruklu ok) oluşan alveol (a) yapıları gözlemlendi (LDS: 0.5(0-2)).

K(x20)-L(x40): CLP+CR20 mg tedavi uygulama grubuna ait kesitlerinde alveolar septal duvar kalınlığında azalma ve tipik yapıdaki Tip I pnömosit (ok) ve Tip II pnömositlerden (kuyruklu ok) oluşan alveol (a) yapıları gözlemlendi (LDS: 1(0-1)).

Tablo 12. Akciğer Hasar Skoru (LDS, Matute-Bello ve ark.)

Grup	Alveolar inflamasyon	İnterstisyel İnflamasyon	Vasküler Konjesyon	LDS
Sham	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0.5)
Sham + 10 mg/kg Rosuvastatin	0(0-0)	0(0-0) ^b	0(0-0) ^b	0(0-1) ^b
Sham + 20 mg/kg Rosuvastatin	0(0-0)	0(0-1) ^c	0(0-1) ^b	1(0-1) ^b
CLP	1(0-1) ^a	1(1-2) ^a	2(1-2) ^a	5(4-7) ^a
CLP + 10 mg/kg Rosuvastatin	0(0-1)	0(0-1) ^d	0(0-1) ^b	0.5(0-2) ^b
CLP + 20 mg/kg Rosuvastatin	0(0-0)	0(0-1) ^e	0(0-0) ^b	1(0-1) ^b
^a p=0.000; Sham grubuna karşı ^b p=0.000; CLP grubuna karşı ^c p=0.004; CLP grubuna karşı ^d p=0.002; CLP grubuna karşı ^e p=0.001; CLP grubuna karşı Kruskal Wallis/ Tamhane T2 test				

Alveolar septum kalınlığına ve Matute--Bello ve ark.'nın çalışmasına göre hesaplanan skora baktığımızda da sepsis grubunda değerler anlamlı olarak daha yüksekti. Septik sıçanlara rosuvastatin verildiğinde bu değerler önemli ölçüde azaldı. Ancak bu azalmada istatistiksel olarak doz farkını göremedik.

Tablo 13. Alveolar septum kalınlığı

Grup	Alveolar duvar kalınlığı (µm) (Aritmetik ortalama+Standart sapma)	Alveolar septal kalınlık (uygulama grubu/sağlıklı kontrol grubu oranı)	(Matute-Bello ve arkadaşlarının Alveolar septal duvar kalınlığı skorlarması)
Sham	8.06±1.68	1	0 (<X2)
Sham + 10 mg/kg Rosuvastatin	9.91±2.15 ^b	1.22	0 (<X2)
Sham + 20 mg/kg Rosuvastatin	9.71±1.81 ^b	1.2	0 (>X2)
CLP	23.75±7.87 ^a	2.94	2 (≥X2)
CLP + 10 mg/kg Rosuvastatin	12.05±2.38 ^b	1.50	0 (<X2)
CLP + 20 mg/kg Rosuvastatin	12.93±2.85 ^b	1.60	0 (<X2)
Sham grubundaki farelerden alınan alveolar septal kalınlık oranı 1 olarak belirlendi. ^a p=0.000; Sham grubuna karşı ^b p=0.000; CLP grubuna karşı Tek Yönlü ANOVA testi/ Tukey HSD test			

3.1.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

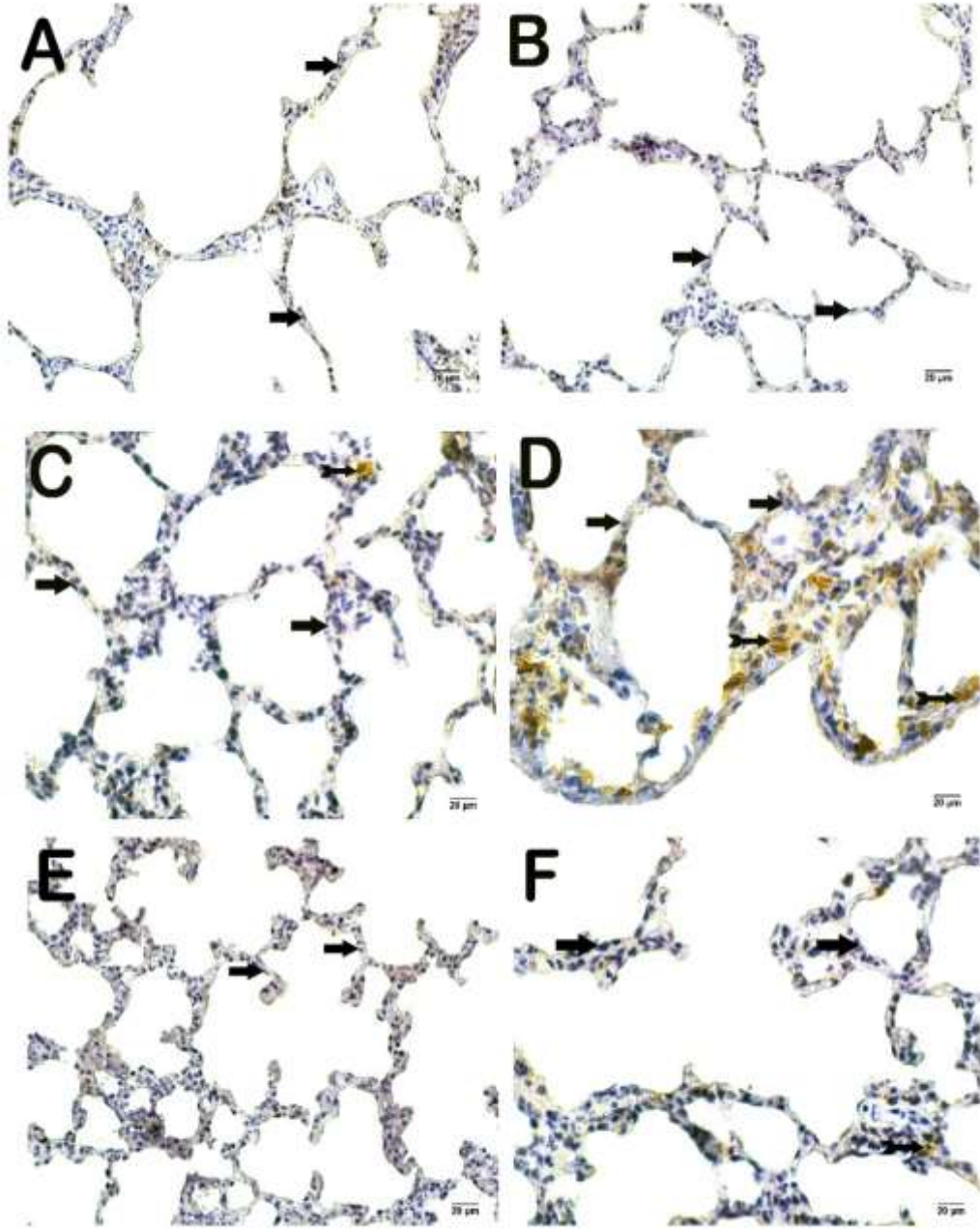
Kullanılan antikorlar için gruptaki immünohistokimya pozitiflik derece skorunu Tablo 15’de gösterilmiştir. CLP grubunda her antikorun skoru diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksekti. Septik hayvan modellerine rosuvastatin uygulandığında bu skorlar azaldı. NF-κβ/p65, kaspaz-3 ve 8-OHdG için anlamlı bir doz farkı gözlemlenmedi.

Tablo 14. IHC Pozitiflik Derecesi Puanı (%25 ve %75 çeyrekler arası aralıkla ortanca)

Grup	Kaspas-3 Pozitiflik Puanı	NF-k β /p65 Pozitiflik Puanı	8-OHdG Pozitiflik Puanı
Sham	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
Sham + 10 mg/kg Rosuvastatin	0(0-0)	0(0-0)	0(0-1)
Sham + 20 mg/kg Rosuvastatin	0(0-0)	0(0-1)	0(0-1)
CLP	3(3-3) ^a	3(3-3) ^a	3(2-3) ^a
CLP + 10 mg/kg Rosuvastatin	0.5(0-1) ^b	0(0-1) ^b	0(0-1) ^b
CLP + 20 mg/kg Rosuvastatin	0(0-1) ^b	1(0-1) ^b	0(0-1) ^b
^a p=0.000; Sham grubuna karşı ^b p=0.000; CLP grubuna karşı Kruskal Wallis/Tamhane T2 test			

3.1.2.1. Kaspaz-3 Antikor Boyama Bulguları

Şekil 13, kaspaz-3 ile inkübe edilmiş akciğer dokusu bölümlerinin temsili ışık mikroskopik görüntüleridir. Pozitif hücreler kuyruklu bir okla ve normal hücreler normal bir okla gösterilir. CLP grubuna ait kesitlerde alveolar septal duvar yapılarında kaspas-3 eksprese eden çok sayıda pnömosit (kuyruklu ok) gözlenir. Rosuvastatin ile tedavi edilen septik sıçanlar, apoptotik hücrelerde bir azalma gösterdi.

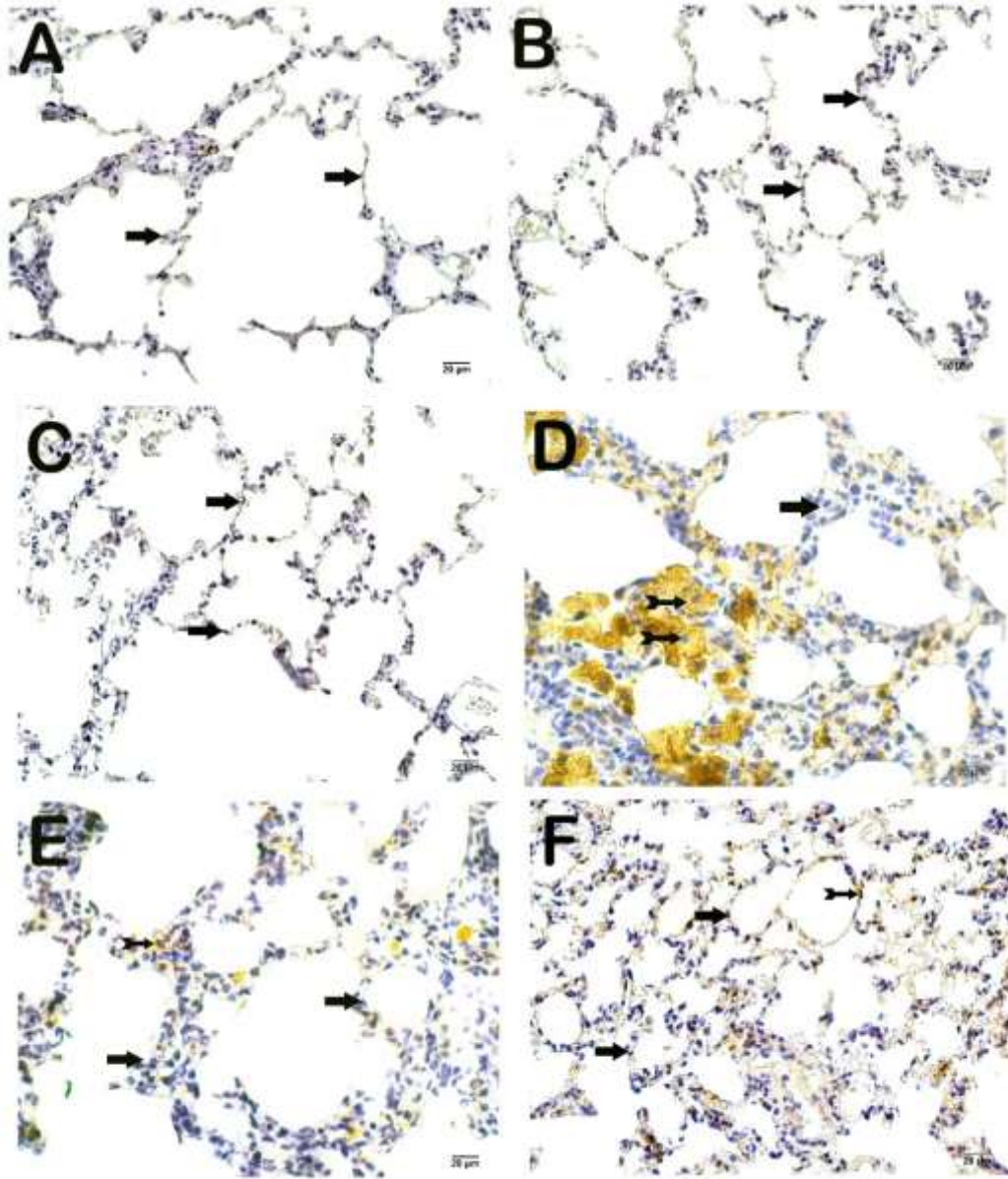


Şekil 10. Kaspas-3 ile inkübe edilmiş akciğer dokusu bölümlerinin ışık mikroskopik görüntüsü

- A: Sham,
B: Sham + 10 mg/kg Rosuvastatin,
C: Sham + 20 mg/kg Rosuvastatin,
D: CLP,
E: CLP + 10 mg/kg Rosuvastatin,
F: CLP + 20 mg/kg Rosuvastatin olarak gösterilmiştir.

3.1.2.2. NFkB/p65 Antikor Boyama Bulguları

Şekil 14, NF- κ B/p65 ile inkübe edilmiş akciğer dokusu bölümlerinin temsili ışık mikroskopik görüntüleridir. CLP grubuna ait bölümlerde NF- κ B/p65 ifade eden kuyruklu oklu çok sayıda pnömosit gözlenir. Rosuvastatin ile tedavi edilen septik sıçanlar, NF- κ B/p65 pozitif pnömosit sayısında bir azalma gösterdi.



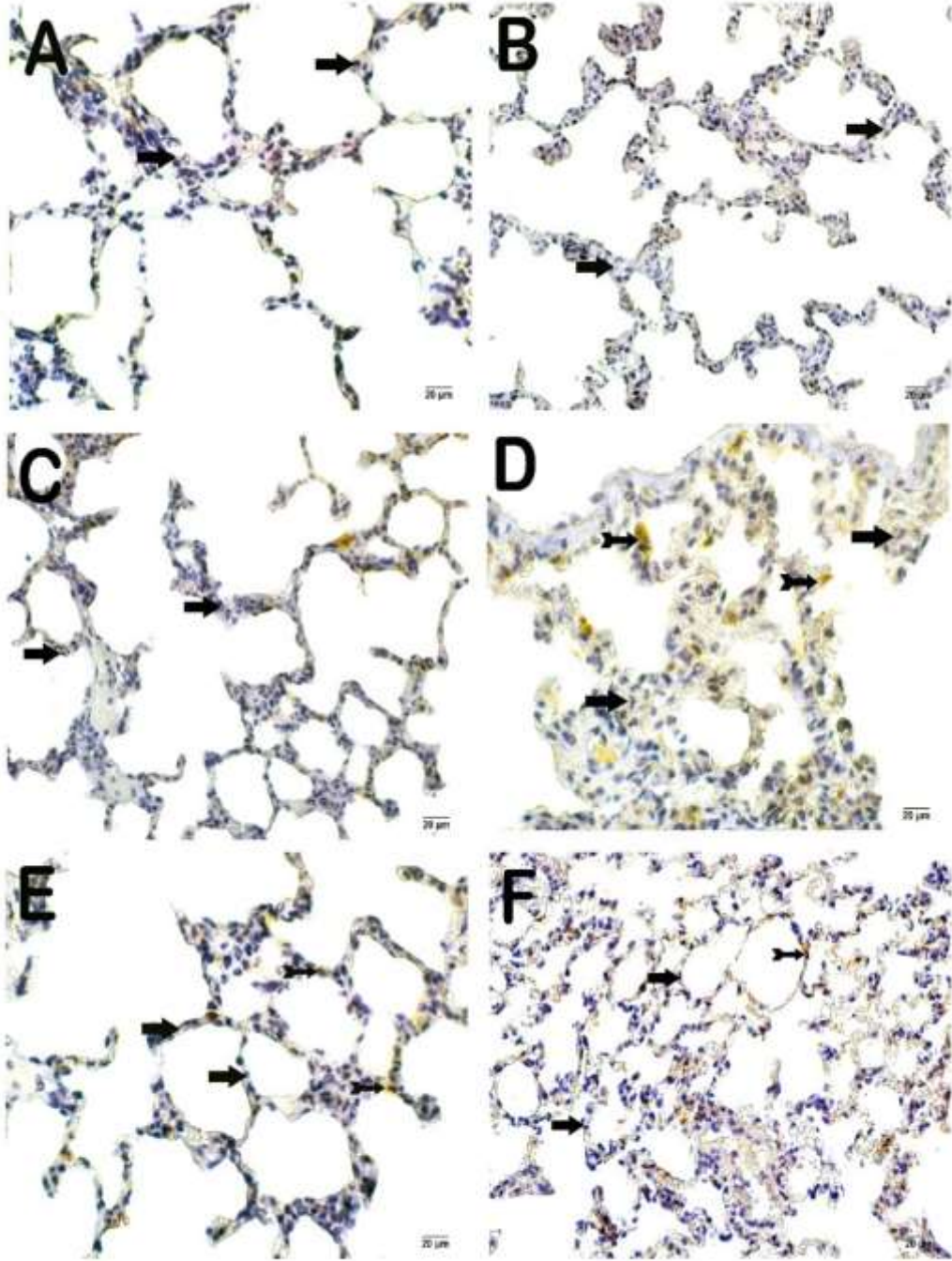
Şekil 11. NF- κ B/p65 ile inkübe edilmiş akciğer dokusu bölümlerinin temsili ışık mikroskopik görüntüsü.

A: Sham
B: Sham + 10 mg/kg Rosuvastatin
C: Sham + 20 mg/kg Rosuvastatin
D: CLP, **E:** CLP + 10 mg/kg Rosuvastatin
F: CLP + 20 mg/kg Rosuvastatin olarak gösterilmiştir.

3.1.2.3. Anti-8-OHdG Antikor Boyama Bulguları

Şekil 15, 8-OHdG ile tedavi edilen akciğer dokusu kesitlerinin görüntüsüdür. 8-OHdG ifade eden hücreler, görüldüğü gibi CLP grubunda önemli ölçüde daha yüksekti. Rosuvastatin ile tedavi edilen septik sıçanlar, 8-OHdG pozitif pnömosit sayısında bir azalma gösterdi.





Şekil 12. 8-OHdG ile tedavi edilen akciğer dokusu kesitlerinin görüntüsü.

- A: Sham
B: Sham + 10 mg/kg Rosuvastatin
C: Sham + 20 mg/kg Rosuvastatin
D: CLP, E: CLP + 10 mg/kg Rosuvastatin
F: CLP + 20 mg/kg Rosuvastatin olarak gösterilmiştir.

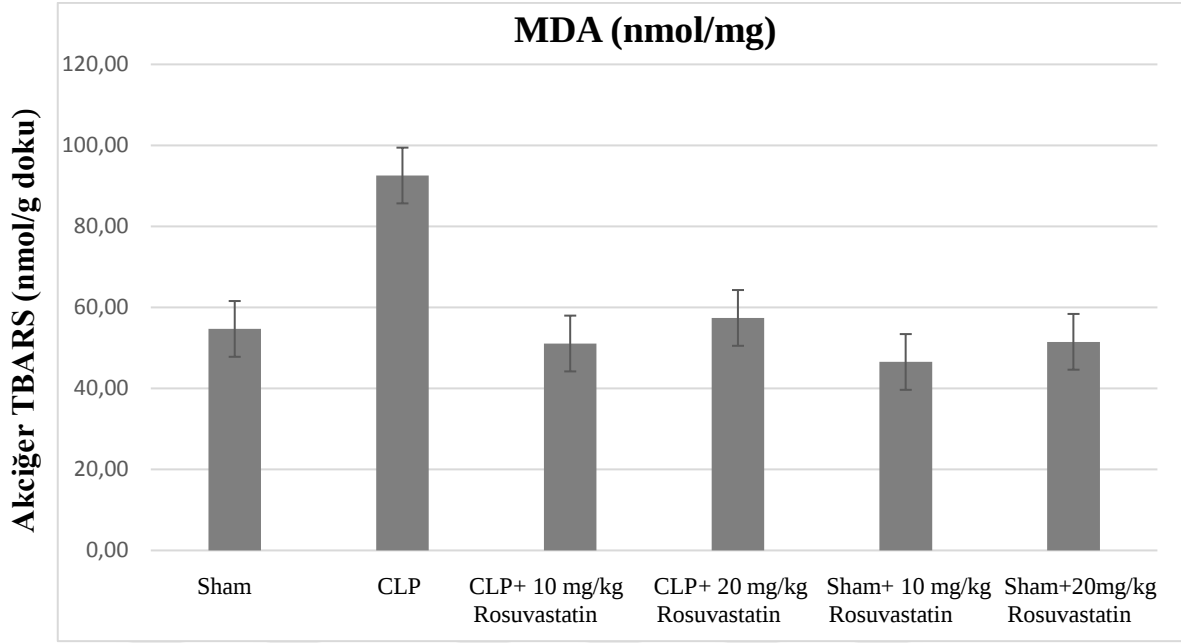
3.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları

3.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi Bulguları

Biyokimyasal sonuçlara ilk baktığımızda MDA düzeyleri CLP grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bu artış, rosuvastatin uygulanan CLP gruplarında önemli ölçüde azaldı. Uygulanan dozlar arasında istatistiksel bir fark yoktu.

Tablo 15. Malondialdehit (MDA) Bulguları

MDA (nmol/mg)	
Sham	54.68 $\pm$ 1.6
CLP	92.56 $\pm$ 14.7 ^a
CLP+10 mg/kg Rosuvastatin	51.08 $\pm$ 6.5 ^b
CLP+20 mg/kg Rosuvastatin	57.40 $\pm$ 10.6 ^b
Sham+10 mg/kg Rosuvastatin	46.53 $\pm$ 3.2
Sham+20 mg/kg Rosuvastatin	51.50 $\pm$ 4.7
İstatistiksel anlamlılık medyan + standart sapma olarak gösterilmiştir. Tek yönlü ANOVA/Tukey HSD Testi ^a p<0.05; sham grubuyla karşılaştığında ^b p<0.05; CLP grubuyla karşılaştığında	



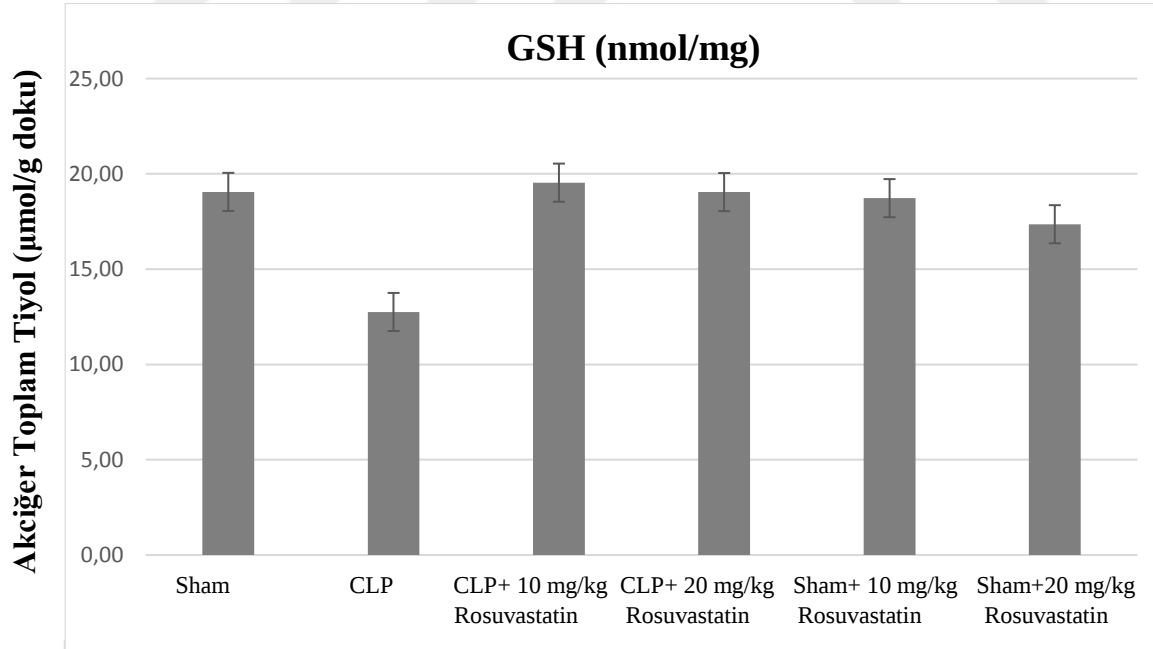
Şekil 13. TBARS (Malondialdehit (MDA)) analiz

3.2.2. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analiz Bulguları

Düşen glutasyon sonuçlarına baktığımızda (tablo 15), CLP grubundaki antioksidan seviyeleri diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktü. Rosuvastatin uygulanan CLP gruplarında azalan glutasyon seviyeleri, sahte grup seviyelerine önemli ölçüde yükseldi. Uygulanan dozlar arasında istatistiksel bir fark yoktu.

Tablo 16. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) bulguları

GSH (nmol/mg)	
Sham	19.05±2.8
CLP	12.75±1.7 ^a
CLP+10 mg/kg Rosuvastatin	19.53±3.4 ^b
CLP+20 mg/kg Rosuvastatin	19.04±3.8 ^b
Sham+10 mg/kg Rosuvastatin	18.72±3.6
Sham+20 mg/kg Rosuvastatin	17.35±3.5
İstatistiksel anlamlılık medyan + standart sapma olarak gösterilmiştir. Tek yönlü ANOVA/Tukey HSD Testi ^a p<0.05; sham grubuyla karşılaştığında ^b p<0.05; CLP grubuyla karşılaştığında	

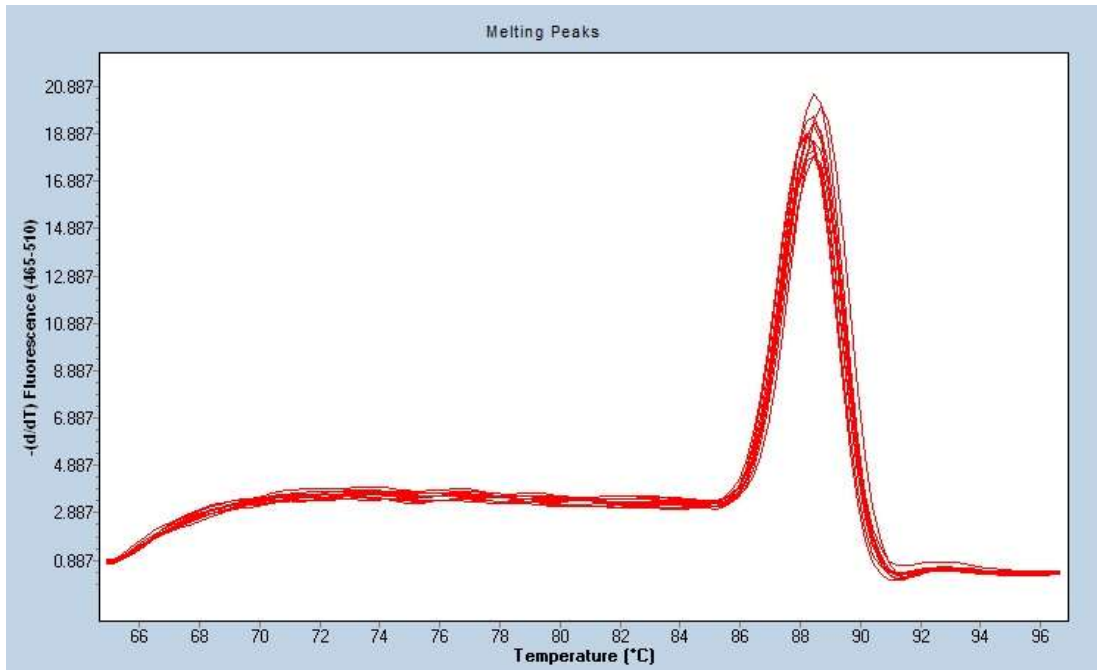


Şekil 14. Toplam tiyo tayini (İndirgenmiş Glutasyon (GSH)) analiz

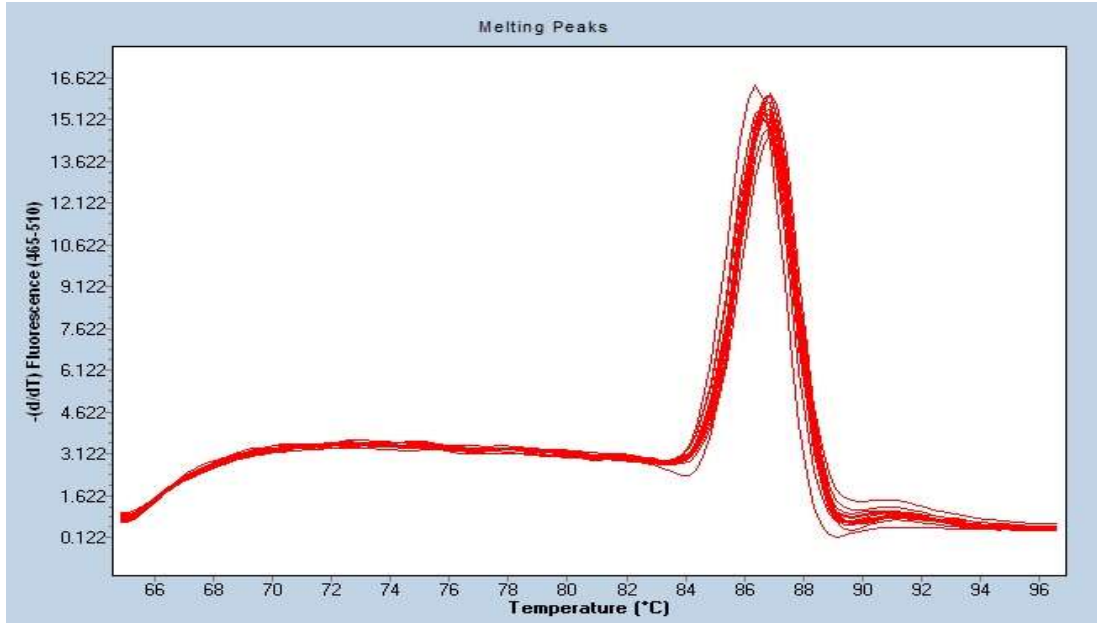
3.3. Moleküler Genetik Analiz Bulguları

3.3.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analiz Bulguları

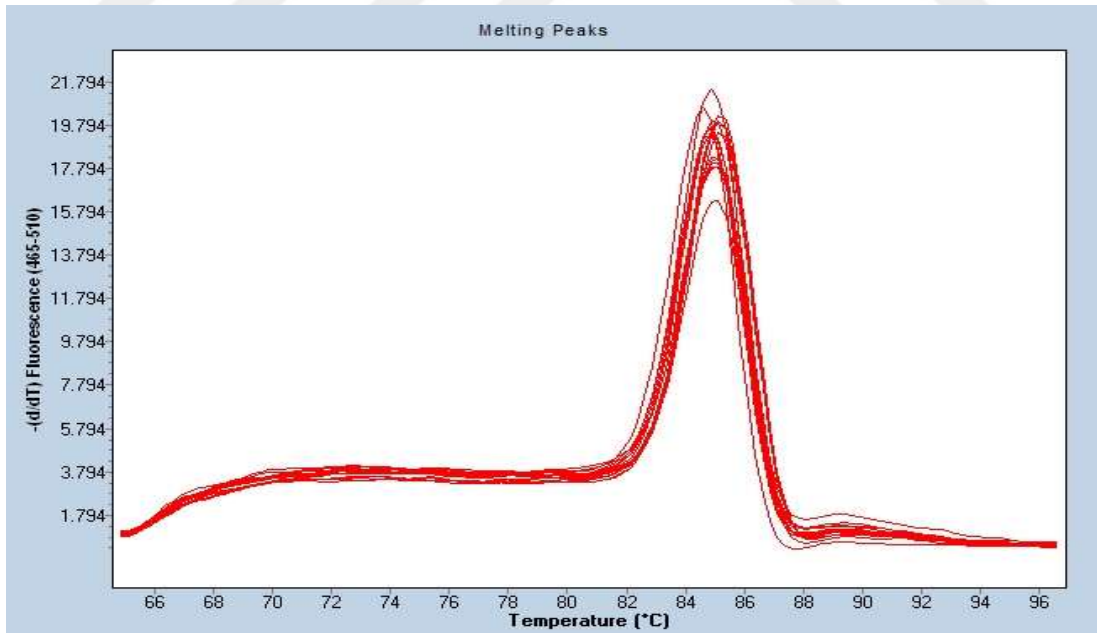
Yapılan kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; Beclin-1, LC-3, Bax, BCL-2 genlerinin gen anlatım düzeyleri Actb genine göre normalize edilerek karşılaştırılmıştır. Ekspresyonu yapılan genlerin Tm ve Ct değerlerine ait grafikler şekil 16, 17, 18 ve 19’ da verilmiştir.



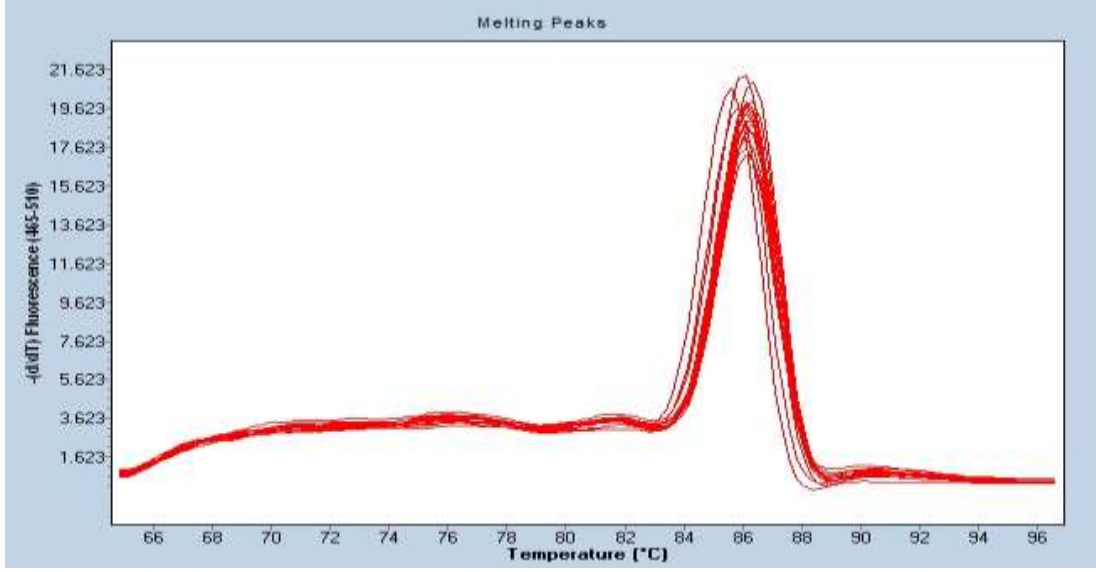
Şekil 15. Bax/98 bç geninin Tm grafiği



Şekil 16. Bcl-2/102 bç geninin Tm grafiği

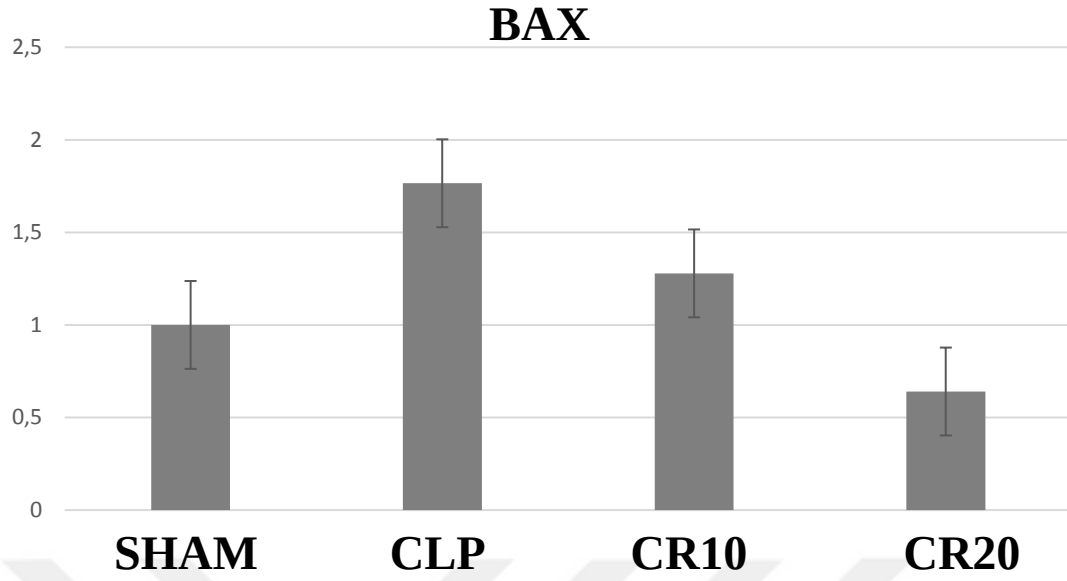


Şekil 17. LC-3/83 geninin Tm grafiği



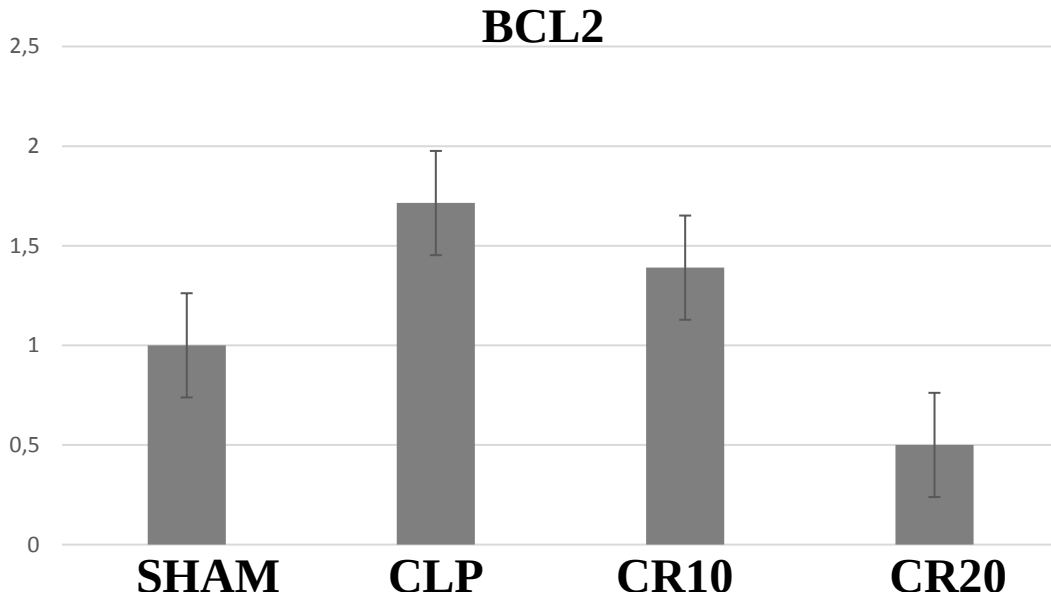
Şekil 18. Beclin-1/142 bç geninin Tm grafiği

Beclin-1,LC-3,Bax, BCL-2 genlerinin ifade düzeylerinin kat cinsinden artış oranları hesaplanarak gen anlatımlarının normalize edilmesi için Actb geni referans gen olarak kullanılmıştır.



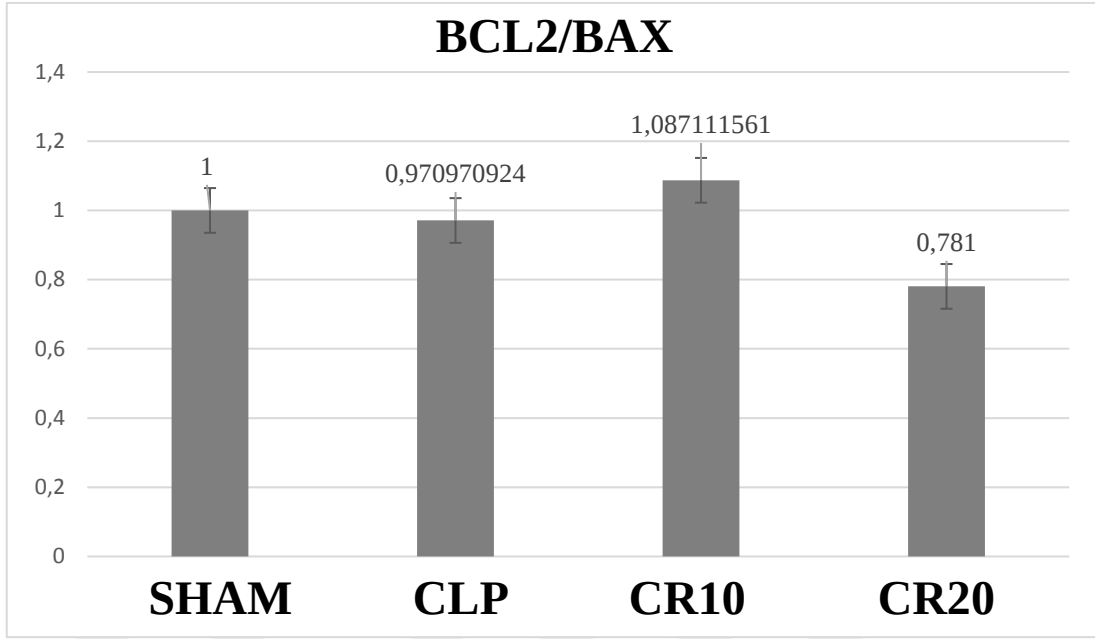
Şekil 19. Akciğer dokularında Bax geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine göre değişimi.

* $p < 0.05$; sham grubuyla karşılaştığında,
** $p < 0.05$; CLP grubuyla karşılaştığında



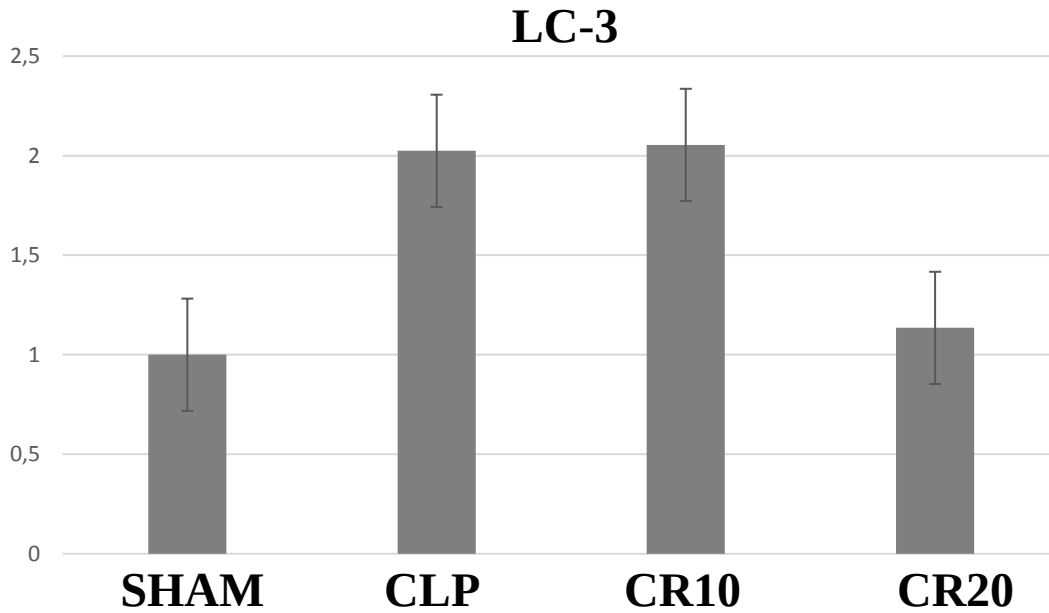
Şekil 20. Akciğer dokularında Bcl-2geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine göre değişimi.

* $p < 0.05$; sham grubuyla karşılaştığında,
** $p < 0.05$; CLP grubuyla karşılaştığında



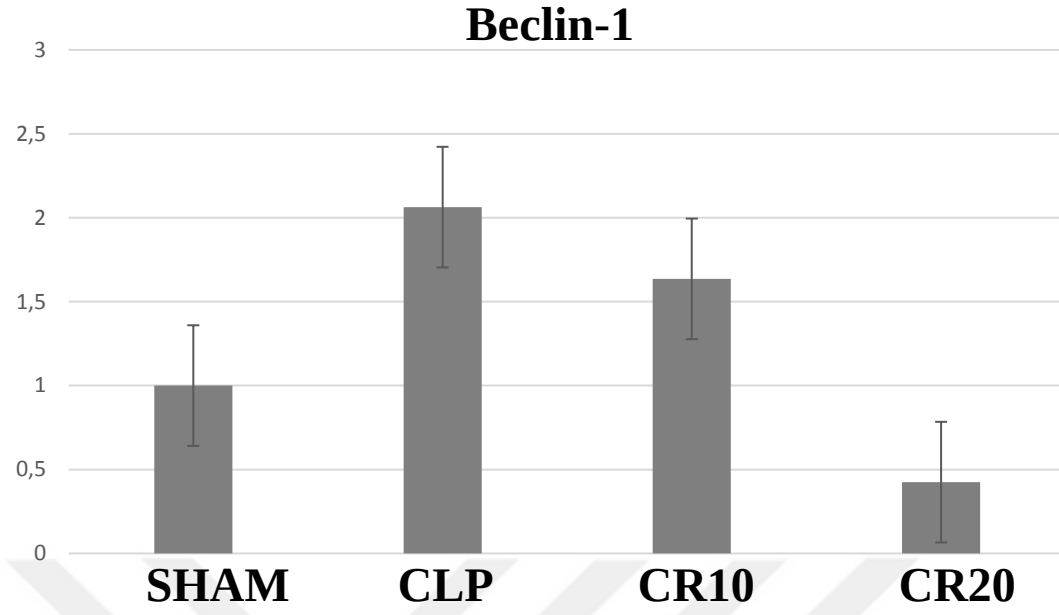
Şekil 21. Akciğer dokularında Bcl-2/Bax genlerinin Actb kontrol genine göre değişimi

*p<0.05; sham grubuyla karşılaştığında,
 **p<0.05; CLP grubuyla karşılaştığında



Şekil 22. Akciğer dokularında LC-3 geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine göre değişimi

*p<0.05; sham grubuyla karşılaştığında,
 **p<0.05; CLP grubuyla karşılaştığında,

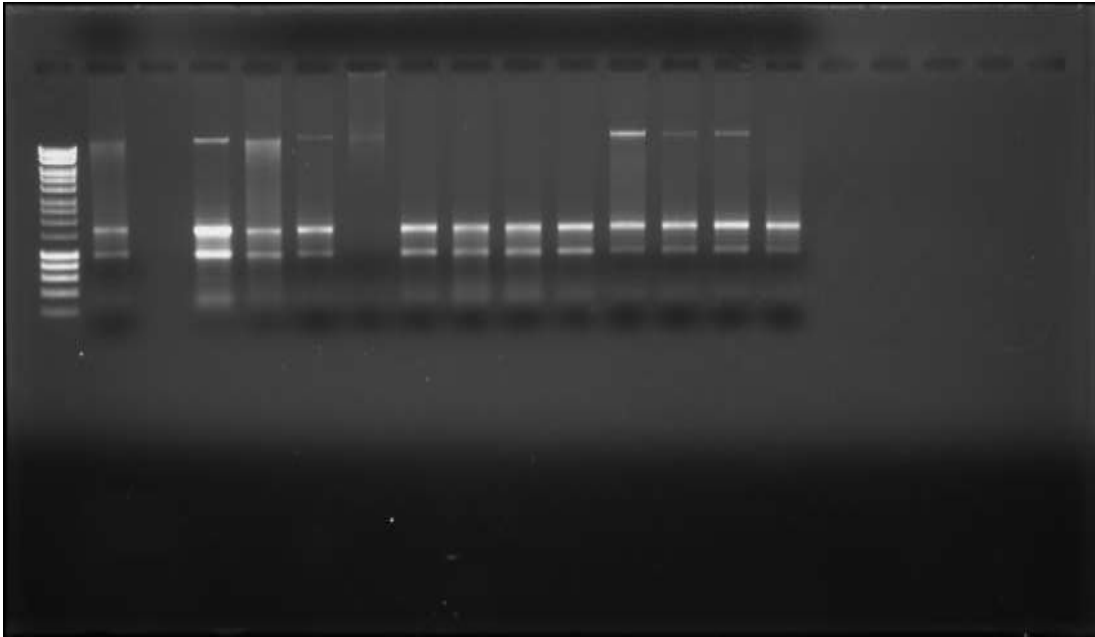


Şekil 23. Akciğer dokularında Beclin-1 geninin anlatım düzeyinin Actb kontrol genine göre değişimi.

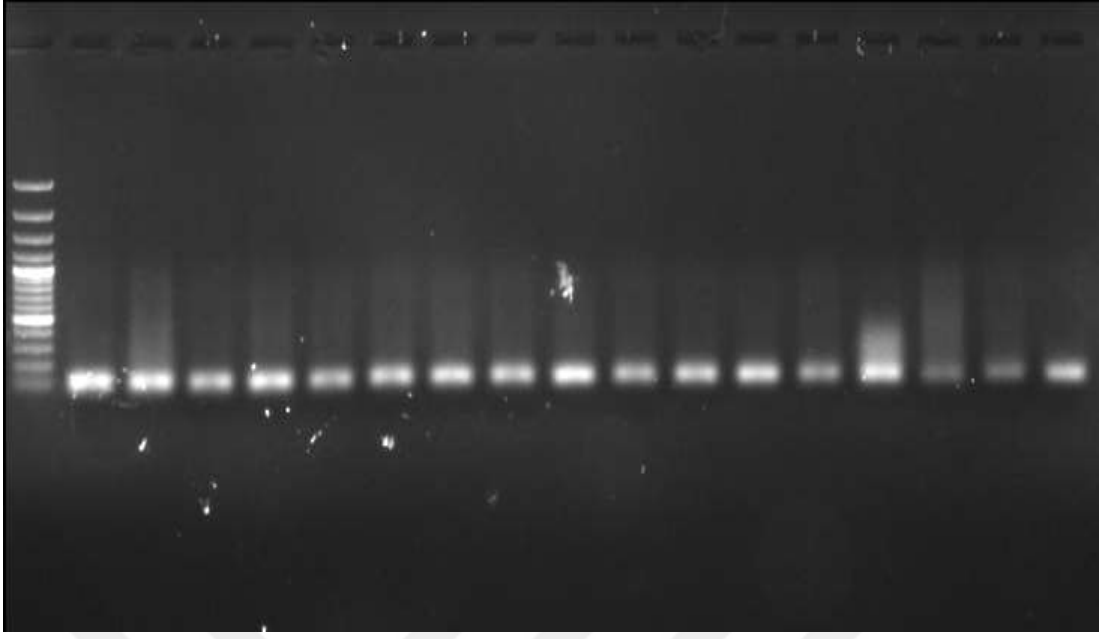
* $p < 0.05$; sham grubuyla karşılaştırıldığında,

** $p < 0.05$; CLP grubuyla karşılaştırıldığında

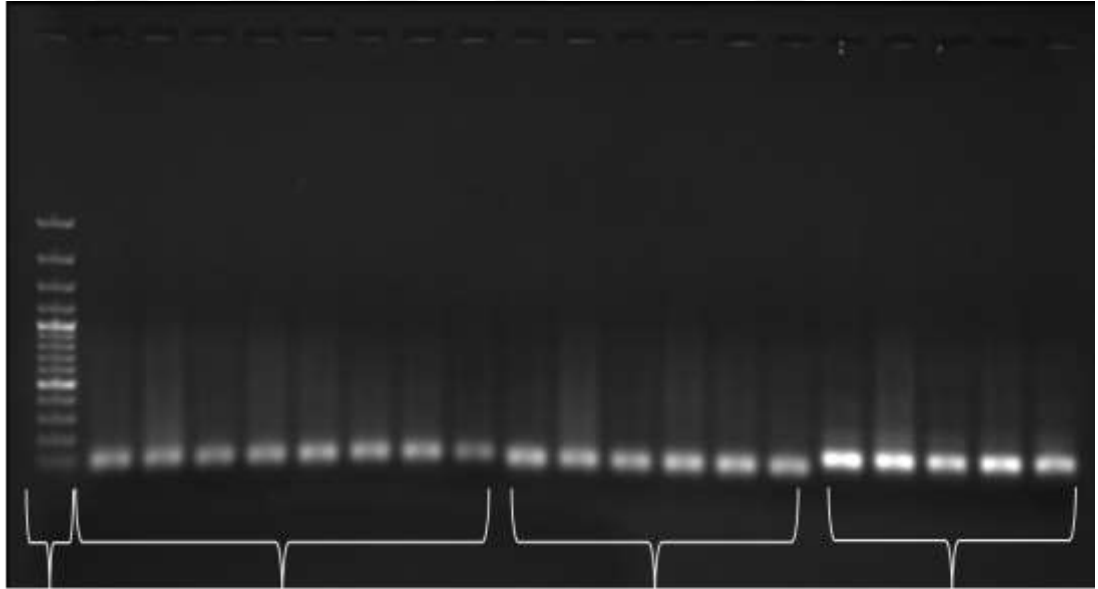
3.3.2. Agaroz Jel Elektroforez Bulguları



Şekil 24. % 0.8'lik Agaroz jele yüklenmiş RNA örnekleri



Şekil 25. % 1'lik Agaroze jele yüklenmiş PCR ürünleri



100 bç

Bcl-2/102 bç

LC3/83 bç

LC3/142 bç

Şekil 26. % 1'lik Agaroze jele yüklenmiş PCR ürünleri

4. TARTIŞMA

Sepsis, klinikte ve özellikle yoğun bakım ünitesine yatırılan hastalarda ortaya çıkan, uzamış inflamasyona bağlı olarak terapötik açıdan zorlayıcı, karmaşık ve hatta yaşamı tehdit eden bir durumdur (Lee, Medzikovic, Eghbali, Eltzschig, & Yuan, 2020). Birçok organın potansiyel katılımına rağmen, akciğerler sepsis ile ilişkili inflamasyon ve doku hasarı için ana hedef organı temsil etmektedir. Enfekte bireylerde morbidite ve mortaliteyi azaltmak için etkili antimikrobiyal tedaviler kullanılmasına rağmen, bu ilaçların kullanımı antibiyotik direnç, kemoterapötik ajanların istenmeyen etkileri ve diğer eşlik eden koşullar nedeniyle tedavide başarısızlığa yol açabilmektedir (Yildiz et al., 2021).

İleri sürülen sayısız mekanizmaya rağmen sepsisin patofizyolojik mekanizması henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, sepsise karşı kontrolsüz bir şekilde oluşan bağışıklık yanıtının doku hasarına neden olduğu bilinmektedir. İnflamasyon bölgesine göç eden bağışıklık hücreleri, proinflamatuvar sitokinlerin miktarını ve sentezini arttırarak organlarda hücresel hasara yol açar (Gyawali, Ramakrishna, & Dhamoon, 2019). Proinflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunda artışa neden olarak oksidatif stresi indükler ve doku hasarı oluşturur. Doku düzeyindeki oksidatif stresin en önemli biyobelirteçlerinden olan MDA'nın sepsis indüksiyonunu takiben akciğerde artış gösterdiği bildirilmiştir (Kumar, 2020). Hücrelerde bulunan enzimatik olmayan en önemli antioksidan indirgenmiş glutatyondur (GSH). GSH, esas olarak GPx aktivitesi yoluyla peroksitleri azaltır, süperoksit ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırır ve oksitlenmiş C vitaminini yeniden üretir (Hu, Wang, Han, & Yang, 2020).

Lipid düşürücü ilaç sınıfının bir üyesi olan statinler, 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleridir. Statinlerin tespit edilmiş antioksidan, antiinflamatuvar ve immünomodülatör gibi özellikleri kronik hastalıkların alternatif tedavilerinde kullanılabilmesine imkan tanımaktadır. Statinlerin özellikle immünomodülatör yönleri yaygın kullanımlarına bağlantılı olarak, bu ilaçların potansiyel etkilerinin incelenmesinin önemini göstermektedir (P. Bradbury, D. Traini, A. J. Ammit, P. M. Young, & H. X. Ong, 2018). Rosuvastatin, HMG-CoA redüktazın aktif bölgesi için yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu özellik

sayesinde diğer statinlere göre in vitro olarak enzim aktivitesini ve kolesterol sentezini inhibe etmede daha büyük potansiyel sergilemektedir (S. Saadat, Mohamadian Roshan, Aslani, & Boskabady, 2020).

Rosuvastatinin antioksidan özelliğinin araştırıldığı bir çalışmada toksik bir madde olan fipronil ile sıçanlar da oksidatif hasar oluşturulmuş, karaciğer ve böbrekteki bu hasara rosuvastatinin etkisi analiz edilmiştir. Abdel-Daim ve ark. bu çalışmalarında sıçanlara oral yolla 15 gün boyunca 10 mg/kg rosuvastatin uygulamışlar, oksidatif stres ve antioksidan belirteçlerini analiz etmişler. Fipronil uygulaması ile karaciğer ve böbrekte artan MDA seviyelerini rosuvastatinin anlamlı derecede düşürdüğünü, azalan GSH seviyelerini ise anlamlı derecede artırdığını tespit etmişlerdir. Fipronilinin ayrıca karaciğer ve böbrek dokularında kaspaz-3 ekspresyonunu artırdığını, oral yolla rosuvastatin alımının vitamin E ile birlikte apoptozun indüklenmesiyle artan bu ekspresyon artışını düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Abdel-Daim & Abdeen, 2018). Böylelikle sıçanlarda oral yolla alınan idame 10 mg/kg rosuvastatin dozunun karaciğerde ve böbrekte oksidatif stresin azaltılmasında, kaspaz ekspresyonunun düşürülmesinde etkili olduğu görülmektedir. Rosuvastatinin apoptoz mekanizmasında tek başına anlamlı etkisinin olup olmadığı bu çalışmada netlik kazanmamıştır.

Rosuvastatinin koruyucu aktivitesinin araştırıldığı farklı bir çalışmada ise geniş spektrumlu bir antibiyotik ile kalp dokusunda oluşturulan oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoza etkisi bildirilmiştir. Miyokardiyal dokuda azitromisin uygulamasıyla artan MDA seviyeleri rosuvastatin idame dozu (2 mg/kg) ile düşüş göstermiş, GSH seviyeleri ise artış göstermiştir. Azitromisin, kalp dokusunda ROS üreterek apoptoza neden olmuş, kaspaz-3 ekspresyonunu artırmıştır. Azitromisinin oluşturduğu yüksek kaspaz-3 ekspresyonu, rosuvastatin uygulaması ile anlamlı şekilde düşüş göstermiştir. Bu sonuç, rosuvastatinin bağımsız anti-apoptotik aktivitesini desteklemektedir (Mansour, Salem, Kader, Abdel-Alrahman, & Mahmoud, 2021).

Otofaji, doku hasarı sonucu oluşan sitotoksik protein agregatlarını ve hasarlı organelleri lizozomal degradasyon yoluyla ortadan kaldıran veya geri dönüştüren, hücrenin hayatta kalmasını sağlayan sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir süreçtir. Beclin-1, otofajik veziküller ve lokalize otofajik proteinlerin oluşumunu sağlayarak otofaji

ve hücre ölümünün düzenlenmesinde rol oynar (Kang, Zeh, Lotze, & Tang, 2011). Artmış otofaji aktivitesi doku hasarının deneysel modellerinde tespit edilmiştir. Çalışmaların sonuçları otofajik veziküllerin varlığının, hasarlı hücrenin ölmekten ziyade strese uyum sağlama ve hayatta kalma girişimini temsil ettiğini göstermektedir. Sepsiste otofaji, hücre hasarı ve hücre ölümünü sınırlayarak hücrenin hayatta kalma yanıtı olarak kabul edilmektedir (Karagiannidis et al., 2016). Bununla birlikte, hücre stresi diğer ölümcül mekanizmaları aktive ederek hücre ölümüne de yol açabilir. Otofajinin sepsis patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. CLP ile indüklenen sepsis modelinde LC3 ve Beclin-1 ekspresyonlarının anlamlı şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Su et al., 2015). Farklı bir çalışmada ise indüklenen sepsis sonrası birden fazla organda LC3 ekspresyonunun artış gösterdiği bildirilmiştir (Lo et al., 2013).

Kaspaz-3 apoptozun başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynayan bir proteindir. Aktif kaspaz-3, apoptozun uygulanmasında en önemli faktör olduğundan, aktif kaspaz-3 seviyeleri apoptozun durumunu yansıtmaktadır (Wang, Yang, Zhao, & Zhang, 2018).

Zhang ve ark. rosuvastatinin antiinflamatuvar etkisine bağlı olarak kardiyakta koruyucu etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Rosuvastatin, adriamisin uygulanan sıçanların kalp dokusundaki hasar sonucu artış gösteren nükleer bir protein olan HMGB1 (High mobility group box-1) ve onun reseptörünün (receptors for advanced glycation end products, RAGE) protein ekspresyon seviyelerini düşürücü bir etki göstermiştir. Bu sonuç; rosuvastatinin HMGB1/RAGE ilişkili inflamatuvar yanıt mekanizması ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Zhang, Lu, Liu, & Du, 2018).

Diğer bir çalışmada ise Saadat ve ark. astım ve hiperlipidemi sıçan modellerinde rosuvastatinin sitokin üretimini ve akciğer inflamasyonunu baskılayıcı etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. Sıçanların akciğer dokuları histopatolojik değişiklikler bakımından analiz edildiğinde, astım ve hiperlipidemi gruplarında peribronşiyal ve perivaskülerde inflamatuvar hücre infiltrasyonu alanlar, hava yolu epitel kalınlaşması, bronş genişlemesi ve hava boşluğu genişlemesi gözlemlendi. Ayrıca, astım ve hiperlipidemi gruplarında inflamasyon ile birlikte kas hipertrofisi ve amfizem kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Rosuvastatin uygulanan

sıçanların peribronşiyallerinde azalmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve perivasküler alanlar tespit edildi (S. Saadat et al., 2020).

Marginean ve ark. rosuvastatin ile simvastatinin antiinflamatuvar etkilerini CLP yöntemi ile indükledikleri sepsis modellerinde analiz etmişlerdir. Sıçanlara oral yolla 20 µg/g rosuvastatin uyguladıkları çalışmalarında IL-1β (Interleukin 1-beta), IL-6 (Interleukin 6) ve TNFα (Tumour Necrosis Factor – alpha) değerlerini gruplar arasında karşılaştırdıklarında rosuvastatinin simvastatin ile birlikte benzer seviyelerde antiinflamatuvar etkiye sahip olduklarını belirlemişlerdir (Mărginean M et al., 2014)

Statinler, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktaz inhibitörleri, birincil ve ikincil kardiyovasküler hastalıkları önlemek için dislipideminin tedavisinde kanıtlanmış ilaçlardır. Statinlerin yararları genellikle aterojenik lipoprotein düzeylerinin düşürülmesinden kaynaklanır. Lipid düzeylerini modüle etmeye ek olarak, klinik ve deneysel çalışmalar, statinlerin antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antifibrotik etkiler de dahil olmak üzere pleiotropik etkileri olduğunu göstermiştir (Nam et al., 2013). Bax ve Bcl-2 ile ilişkili proteinlerin apoptoza katılımı gözlemlenmiştir. Bcl-2 proteini, hücreleri apoptozu indükleyen çeşitli uyaranlardan korurken, Bcl-2'nin ölümü baskılayan aktivitesi, Bax ile dimerizasyon yoluyla etkisiz hale getirilebilir. Bax ve Bcl-2'nin nispi oranının apoptoz sonrası hücre sağkalımını belirlediği öne sürülmüştür (Nam et al., 2013).

Neredeyse %30'a varan ölüm oranları ve yüksek mali yük taşıyan bu hastalık, dünya genelinde sağlık hizmetleriyle ilgili pek çok kaygıyı gündeme getiriyor. Hastalık, konakçı organizma için zararlı olduğu nihai olarak kanıtlanmış bazı enflamatuvar yolların tetiklenmesi ile karakterize edilir. Antibiyotikler, sıvı uygulaması, vazopresör tedavisi ve enfeksiyöz kaynak kontrolü önerilen yöntem stratejileri var olsada, ortaya çıkan bilimsel veriler statinleri yeni bir tedavi yöntemi olarak önermektedir. Bu ilaçlar ilk olarak kolesterol düşürücü etkileri nedeniyle klinik uygulamaya girmiştir, ancak HMG-CoA redüktaz ve kolesterol biyosentetik yolunun inhibisyonu, genellikle pleiotropik olarak adlandırılan daha az çalışılmış bazı etkileri de ortaya çıkmıştır (Marginean et al., 2014).

Rosuvastatin, çeşitli farmakolojik etkiler sergileyen yeni nesil bir statindir. İlaç, HMG-CoA redüktazın aktif bölgesi için yüksek bir afiniteye sahiptir ve diğer

statinlere göre enzim aktivitesini ve in vitro kolesterol sentezini inhibe etmede daha büyük bir potansiyel sergiler. rosuvastatinin diğer statinlerden daha güçlü pleiotropik etkileri olduğu da bilinmektedir (Saadat & Boskabady, 2021).

Son zamanlarda rosuvastatinin ilaca bağlı nefrotoksisiteye ve kalp, bağırsak ve omurilikte iskemi reperfüzyon hasarına karşı serbest radikallerin azaltılması ve antioksidan enzimlerin düzenlenmesi yoluyla koruma sağladığı bildirilmiştir. Ancak bugüne kadar rosuvastatinin insektisit kaynaklı oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkileri araştırılmamıştır (Abdel-Daim & Abdeen, 2018).

Rosuvastatin, statinlerin en güçlüsüdür, çünkü HMG-CoA redüktazın aktif bölgesi için en büyük afiniteye sahiptir ve protein-ligand etkileşimleri en fazladır. Rosuvastatinin hepatik enzimler tarafından metabolize edilmesi yavaş olduğundan plazmadaki etki süresi ve yarı ömrü diğer statinlere göre daha yüksektir (Abdolmaleki, Zahri, & Bayrami, 2020).

Abdolmaleki ve ark. yaptığı bir çalışmada erkek wistar sıçanlarda siyatik sinir ezilme yaralanmasında nöroprotektif özelliklerini araştırmışlardır. Her grupta 14 sıçan olacak şekilde rastgele dört gruba ayrıldı. İki deney grubu, postoperatif yedi gün boyunca günlük olarak 5 veya 10 mg/kg rosuvastatin ile tedavi edildi. Rosuvastatin dozları daha önceki çalışmalarda merkezi sinir sistemi (MSS) yaralanmalarında nöroprotektif etki gösterdiği için seçilmiştir. Sıçanlara 30 saniye boyunca bir damar klemp kullanılarak sol siyatik sinir ezilme yaralanması uygulandı. Kontrol grubuna da aynı şekilde uygulama yapıldı. İyileşme sürecinde davranışsal, elektrofizyolojik, morfolojik ve moleküler parametreler incelendi. Siyatik sinir ezilmesinden sonra tüm dozlarda kronik rosuvastatin uygulaması, sinir rejenerasyonunu önemli ölçüde destekledi ve motor fonksiyon iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırdı. Kontrollere kıyasla rosuvastatin tedavi gruplarında elektrofizyolojik, morfolojik ve moleküler parametreler de iyileşti. Bu bulgular, rosuvastatinin nöroprotektif etkilerinin, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu bulguları doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu açıktır (Abdolmaleki et al., 2020).

Wang ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada sepsisli sıçanlarda HMGB1 proteinin miyokardiyal hücrelerin immün fonksiyonu ve otofaji düzeyi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla sıçanlarda sepsis modellerini oluşturmak için çekal

ligasyon ve perforasyon (CLP) yöntemi kullanıldı. Toplam 60 sprague dawley sıçan kullanıldı. Her bir grupta 20 sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Sepsisli sıçanlarda serum HMGB1 seviyesi, inflamatuvar faktörlerin ekspresyon seviyeleri, otofaji ile ilgili protein; LC3 ve Beclin-1 ve apoptoz ile ilgili protein B lenfoblastoma-2 (Bcl-2) ekspresyon seviyeleri ölçüldü. Spesifik olarak. Sepsiste serum HMGB1 seviyesinin artması hücrel immün disfonksiyon üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Sepsis, miyokardiyal otofajiyi etkili bir şekilde aktive edebilir ve otofaji seviyesi artan bir eğilim gösterir. İnflamatuvar faktörler sepsis patogeneğinde, sistemik inflamatuvar yanıtta ve çoklu organ disfonksiyonunda hayati rol oynar. Ayrıca hücre apoptozunda indükleyici faktörlerdir. Hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar faktörler tüm vücut üzerinde belirgin bir etki yaratır (Wu, Wang, Yang, & Dong, 2021).

YunJie Su ve ark. septik sıçanların hipokampusundeki otofaji sürecini ve NF- κ B/p65'nin rolünü araştırmışlardır. Beyin disfonksiyonlu sepsis, morbidite ve mortalite riskinin artmasına katkıda bulunmuştur. Patofizyolojisinde hem otofaji hem de nükleer faktör κ B (NF- κ B) önemli roller oynadığı öne sürülmüştür. Erkek wistar sıçanlarına çekal ligasyon ve ponksiyon (CLP) veya sahte operasyon uygulandı. NF- κ B/p65 sinyal yolunun bir inhibitörü olan pirolidin ditiyokarbamat (PDTC), CLP operasyonundan 2 saat önce sıçanlarla tedavi etmek için kullanıldı. Sahte ameliyat edilen farelerle karşılaştırıldığında, CLP fareleri azalan ortalama arter basıncı, artan kalp hızı ve patolojik histolojik değişiklikler gösterdi. CLP uygulanan sıçanlarda LC3-II'de artış, Beclin1 seviyelerinde azalma görülmüştür. Sonuç olarak CLP uygulanan sıçanlarının hipokampusu sırasındaki otofaji süreci, NF- κ B/p65 sinyal yolunun aktivasyonu ile bloke edilebilir. NF- κ B/p65 sinyal yolunun inhibisyonu, septik beyinlerde nöroprotektif bir işlevle otofajinin tamamlanmasını artırabilir (Su et al., 2015).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1) Rosuvastatin, CLP yöntemi ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde akciğer dokusundaki oksidatif hasarı istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürücü etki göstermiştir.

2) Rosuvastatin, CLP yöntemi ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde belirgin şekilde azalan antioksidan seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırmıştır.

3) Deneysel sepsis modelinde histopatolojik olarak hasara uğradığı tespit edilen akciğer dokusunun hasar oranı rosuvastatin uygulanması ile anlamlı seviyelere düşmüştür.

4) Deneysel sepsis modelinde immünohistokimyasal olarak analiz edilen inflamatuvar basamaklarında, rosuvastatinin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde baskılayıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir.

5) Analiz edilen bütün parametrelerin bulguları, rosuvastatinin sepsis sonucu oluşan akciğer doku hasarına karşı koruyucu etkisinin varlığını göstermiştir.

6) Farklı dozların etkinliği analiz edilip değerlendirildiğinde sepsis sonucu oluşan akciğer hasarına karşı en etkin dozun 10 mg/kg olduğu belirlenmiştir.

7) Teropatik açıdan zorlayıcı, karmaşık ve yüksek orandaki mortalite özellikleri olan sepsise rosuvastatin gibi yaygın kullanılan bir ilacın tedavi edici etkisi önemli bir bulgudur. Çalışmamızın bulguları rosuvastatinin farklı potansiyel etkilerinin ortaya çıkarılmasına ışık tutacak, yeni tedavi stratejilerinin oluşmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

Abdel-Daim, M.M., & Abdeen, A. (2018). Protective effects of rosuvastatin and vitamin e against fipronil-mediated oxidative damage and apoptosis in rat liver and kidney. *Food Chem Toxicol*, 114, 69-77. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.055

Akker, M., & Utku, T. (2020). Sepsis and lipid metabolism. *Türk Yogun Bakim Dergisi*, 18(2), 63.

Akşit, H., & BİLDİK, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 55-63.

Al-Khafaji, A.H., Sharma, S., & Eschun, G. (2017). Multiple organ dysfunction syndrome in sepsis. *Drugs & Diseases> Infectious Diseases*. Updated: Mar, 7.

Alkurt, G. *Otofaji ve apoptoz ilişkisinin bag-1, bcl-2 ve beclin 1 üzerinden incelenmesi*. Fen Bilimleri Enstitüsü.

Arslan, D.Ö., Korkmaz, G., & GÖZÜAÇIK, D. (2011). Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*(4), 184-194.

BAŞLILAR, Ş., & AYDIN, M. Evaluation of long-term effect of tuberculosis chemoprophylaxis in patients using anti tumor necrosis factor alpha agents. *Anatolian Current Medical Journal*, 3(2), 115-119.

Bodur, M., & Ünal, R.N. (2019). Kronik hastalıklar ekseninde diyetle yüksek fruktoz ve doymuş yağ asitlerinin kronik düşük derece inflamasyon üzerine etkisi. *Cukurova Medical Journal*, 44(2), 685-694.

Bosmann, M., & Ward, P.A. (2013). The inflammatory response in sepsis. *Trends in immunology*, 34(3), 129-136.

Bradbury, P., Traini, D., Ammit, A.J., Young, P.M., & Ong, H.X. (2018). Repurposing of statins via inhalation to treat lung inflammatory conditions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 133, 93-106.

Bradbury, P., Traini, D., Ammit, A.J., Young, P.M., & Ong, H.X. (2018). Repurposing of statins via inhalation to treat lung inflammatory conditions. *Adv Drug Deliv Rev*, 133, 93-106. doi: 10.1016/j.addr.2018.06.005

CAN, N.K. Erkek üreme sistemi ve otofaji. *Uluslararası Modern Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 10-14.

Chakraborty, R.K., & Burns, B. (2019). Systemic inflammatory response syndrome.

Cortese, F., Gesualdo, M., Cortese, A., Carbonara, S., Devito, F., Zito, A., . . . Ciccone, M.M. (2016). Rosuvastatin: Beyond the cholesterol-lowering effect. *Pharmacological research*, 107, 1-18.

ÇALANGU, S. Septik şok.

ÇETİN, T., & ÖZGÜNEŞ, H. (2017). Statinlerin toksikolojik açıdan değerlendirilmesi. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*(1), 18-28.

Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E., & Libert, C. (2011). Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in microbiology*, 19(4), 198-208.

Demirbilek, S., Sızanlı, E.E., Karaman, A., Karadağ, N., Bayraktar, N., Türkmen, E., & Ersoy, M.Ö. (2004). Septik ratlarda metilen mavisinin akciğer hasarı üzerine etkileri. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 11(4).

Duman, M., Şevketoğlu, E., Arslanköylü, A.E., Köroğlu, F., Yılmaz, H.L., Saz, U., . . . Besli, G.E. (2018). Çocuklarda sepsis ve septik şok protokolü. *Çocuk Acil Tıp ve Yoğun Bakım Derneği*, 1-22.

ERKAYMAN, B. (2020). Sepsis oluşturmak İçin kullanılan deneysel hayvan modelleri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15(2), 181-186.

EROĞLU, M.S., & KIRBAŞ, A. (2020). Sistemik İnflamatuvar yanıt sendromu ve sepsis. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 34(1), 61-67.

Ertaş, F.S. (2011). Birincil korumada dislipidemi tedavisi ve rosuvastatin.

Giridharan, S., & Srinivasan, M. (2018). Mechanisms of nf-kb p65 and strategies for therapeutic manipulation. *Journal of inflammation research*, 11, 407.

Gotts, J.E., & Matthay, M.A. (2016). Sepsis: Pathophysiology and clinical management. *Bmj*, 353.

Günel, Ö., & Barut, H. (2009). Sepsis ve prokalsitonin. *Cumhuriyet Medical Journal*, 31(4), 502-512.

Gürkan, Ö.U., & ÇOBANLI, B. (1999). Sepsis ve septik şok. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 52(1).

Gyawali, B., Ramakrishna, K., & Dhamoon, A.S. (2019). Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med*, 7, 2050312119835043. doi: 10.1177/2050312119835043

Hu, Q., Wang, Q., Han, C., & Yang, Y. (2020). Sufentanil attenuates inflammation and oxidative stress in sepsis-induced acute lung injury by downregulating kng1 expression. *Mol Med Rep*, 22(5), 4298-4306. doi: 10.3892/mmr.2020.11526

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., & Tang, D. (2011). The beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 18(4), 571-580. doi: 10.1038/cdd.2010.191

Karadağ, A. (2016). Otofaji: Programlı hücre ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15(2), 19-26.

Karagiannidis, I., Katakaki, A., Glustianou, G., Memos, N., Papalois, A., Alexakis, N., . . . Konstadoulakis, M.M. (2016). Extended cytoprotective effect of autophagy in the late stages of sepsis and fluctuations in signal transduction

pathways in a rat experimental model of kidney injury. *Shock*, 45(2), 139-147. doi: 10.1097/SHK.0000000000000505

Kelek, A.E. (2021). *Deneyssel diabet oluşturulan ratlarda finasteride'nin oksidatif stres ve apoptozis üzerine etkileri*. Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Kilit, C., Koçak, F.E., & Kilit, T.P. (2017). Comparison of the effects of high-dose atorvastatin and high-dose rosuvastatin on oxidative stress in patients with acute myocardial infarction: A pilot study. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 45(3), 235-243.

Kumar, V. (2020). Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury. *Front Immunol*, 11, 1722. doi: 10.3389/fimmu.2020.01722

Lamb, Y.N. (2020). Rosuvastatin/ezetimibe: A review in hypercholesterolemia. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 20(4), 381-392.

Lee, L.K., Medzikovic, L., Eghbali, M., Eltzschig, H.K., & Yuan, X. (2020). The role of micrnas in acute respiratory distress syndrome and sepsis, from targets to therapies: A narrative review. *Anesth Analg*, 131(5), 1471-1484. doi: 10.1213/ANE.00000000000005146

Levine, B., & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: An innocent convict? *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2679-2688.

Lo, S., Yuan, S.S., Hsu, C., Cheng, Y.J., Chang, Y.F., Hsueh, H.W., . . . Hsieh, Y.C. (2013). Lc3 over-expression improves survival and attenuates lung injury through increasing autophagosomal clearance in septic mice. *Ann Surg*, 257(2), 352-363. doi: 10.1097/SLA.0b013e318269d0e2

Lushchak, V.I. (2016). Contaminant-induced oxidative stress in fish: A mechanistic approach. *Fish physiology and biochemistry*, 42(2), 711-747.

Mansour, B.S., Salem, N.A., Kader, G.A., Abdel-Alrahman, G., & Mahmoud, O.M. (2021). Protective effect of rosuvastatin on azithromycin induced cardiotoxicity in a rat model. *Life Sci*, 269, 119099. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119099

Mărginean M, M., Trancă, S., Ardelean-Maghiar, A., Dîrzu, D., Huțanu, A., Platon, O., & Dobreanu, D. (2014). Comparing the anti-inflammatory effects of simvastatin and rosuvastatin by measuring il-1 β , il-6 and tnf- α levels using a murine caecal ligation and puncture induced sepsis model / compararea efectelor anti-inflamatoare ale simvastatinei și rosuvastatinei măsurând nivelele serice ale il-1 β , il-6 și tnf- α folosind un model de sepsis la șobolan indus prin ligatură și puncție cecală. *Romanian Review of Laboratory Medicine*, 22(4). doi: 10.2478/rrlm-2014-0037

Mayr, F.B., Yende, S., & Angus, D.C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5(1), 4-11.

Menna-Barreto, R.F.S. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.

Nagar, H., Piao, S., & Kim, C.-S. (2018). Role of mitochondrial oxidative stress in sepsis. *Acute and critical care*, 33(2), 65-72.

NEDİR, K.Y. Optimal statin tedavisi nedir? Hangi doz? *İÇİNDEKİLER* (devam), 49.

Ottaway, J. (1989). Mechanistic principles of enzyme activity: Edited by jf liebman and a. Greenberg; vch publishers, new york and weinheim, 1988; xii+ 404 pages;£ 69.00: Wiley Online Library.

Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L.M., Tozzi, G., & Federici, G. (2001). Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clinical chemistry*, 47(8), 1467-1469.

Patty, D.N.J., Safitri, T.A., & Saraswati, H. (2020). Specific primer for human bcl-2-protein expression analysis. *KnE Life Sciences*.

Porter, A.G., & Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death & differentiation*, 6(2), 99-104.

Quirk, J., Thornton, M., & Kirkpatrick, P. (2003). Rosuvastatin calcium. *Nat Rev Drug Discov*, 2(10), 769-770.

Saadat, S., Mohamadian Roshan, N., Aslani, M.R., & Boskabady, M.H. (2020). Rosuvastatin suppresses cytokine production and lung inflammation in asthmatic, hyperlipidemic and asthmatic-hyperlipidemic rat models. *Cytokine*, 128, 154993. doi: 10.1016/j.cyto.2020.154993

Saadat, S., Roshan, N.M., Aslani, M.R., & Boskabady, M.H. (2020). Rosuvastatin suppresses cytokine production and lung inflammation in asthmatic, hyperlipidemic and asthmatic-hyperlipidemic rat models. *Cytokine*, 128, 154993.

Su, Y., Qu, Y., Zhao, F., Li, H., Mu, D., & Li, X. (2015). Regulation of autophagy by the nuclear factor kappaB signaling pathway in the hippocampus of rats with sepsis. *J Neuroinflammation*, 12, 116. doi: 10.1186/s12974-015-0336-2

Tabakoğlu, E., & Durgut, R. (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *Avkæ Derg*, 3(1), 69-75.

TÜRKEL, Y., & TERZİ, M. (2009). Statinlerin nöroloji pratiğindeki yeri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 26(2), 55-61.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2' - deoxyguanosine (8-ohdg): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C*, 27(2), 120-139.

Wang, Y., Yang, W., Zhao, X., & Zhang, R. (2018). Experimental study of the protective effect of simvastatin on lung injury in rats with sepsis. *Inflammation*, 41(1), 104-113. doi: 10.1007/s10753-017-0668-4

Yildiz, I.E., Topcu, A., Bahceci, I., Arpa, M., Tumkaya, L., Mercantepe, T., . . . Yildiz, Y. (2021). The protective role of fosfomycin in lung injury due to oxidative stress and inflammation caused by sepsis. *Life Sci*, 279, 119662. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119662

Zhang, H., Lu, X., Liu, Z., & Du, K. (2018). Rosuvastatin reduces the pro-inflammatory effects of adriamycin on the expression of hmgb1 and rage in rats. *Int J Mol Med*, 42(6), 3415-3423. doi: 10.3892/ijmm.2018.3928

Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., . . . Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by atg14l and rubicon associated

with beclin 1–phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology*, 11(4), 468-476.

Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 1. Cilt, 3. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2001.

Kumar V., Abbas A. K., and Fausto N. 2009. Robbins ve Cotran, Hastalığın Patolojik Temeli, 7. ed.: 878 - 922. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri

Mis, L., & Yeltekin, A. Ç. (2014). Apoptosis. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(1), 102-112

Abdel-Daim, M. M., & Abdeen, A. (2018). Protective effects of rosuvastatin and vitamin e against fipronil-mediated oxidative damage and apoptosis in rat liver and kidney. *Food and chemical toxicology*, 114, 69-77.

Abdolmaleki, A., Zahri, S., & Bayrami, A. (2020). Rosuvastatin enhanced functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 882, 173260.

EROĞLU, M. S., & KIRBAŞ, A. (2020). Sistemik İnflamatuvar yanıt sendromu ve sepsis. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 34(1), 61-67.

Marginean, M. M., Tranca, S., Ardelean-Maghiar , A., Dirzu, D., Hutanu, A., Platon , O., & Dobreanu, D. (2014). Comparing the anti-inflammatory effects of simvastatin and rosuvastatin by measuring il-1 beta, il-6 and tnfr-alpha levels using a murine caecal ligation and puncture induced sepsis model. *REVISTA ROMANA DE MEDICINA DE LABORATOR*, 22(4), 439-450.

Nam, H. K., Lee, S. J., Kim, M. H., Rho, J. H., Son, Y. K., Lee, S. M., . . . An, W. S. (2013). Rosuvastatin attenuates inflammation, apoptosis and fibrosis in a rat model of cyclosporine-induced nephropathy. *American Journal of Nephrology*, 37(1), 7-15.

Saadat, S., & Boskabady, M. H. (2021). Anti-inflammatory and antioxidant effects of rosuvastatin on asthmatic, hyperlipidemic, and asthmatic-hyperlipidemic rat models. *Inflammation*, 44(6), 2279-2290.

Su, Y., Qu, Y., Zhao, F., Li, H., Mu, D., & Li, X. (2015). Regulation of autophagy by the nuclear factor κ b signaling pathway in the hippocampus of rats with sepsis. *Journal of neuroinflammation*, 12(1), 1-12.

Wu, Y., Wang, H., Yang, Y., & Dong, Q. (2021). Effect of serum high mobility group box 1 protein on immune function and autophagy level of myocardial cells in rats with sepsis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(4), 2065-2071.



ETİK KURUL KARARI

Ek-1 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı Araştırma Başvurusu Onay Formu

T.C. RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI (Republic of Turkey Recep Tayyip Erdogan University Local Ethics Committee for Animal Experiments)							
BAŞVURU BİLGİLERİ (Application Information)	ETİK KURUL DOSYA NO(REFERENCE):34						
	ÇALIŞMANIN ADI		Sıçanlarda Çekal Bağlama Ve Delme Yöntemi İle İndüklenen Sepsis Modelinde Rosuvastatinin Akciğer Dokusu Üzerine Etkisi				
	Title		The Effect Of Rosuvastatin On Lung Tissue In The Sepsis Model Induced By Cecal Ligation And Puncture In Rats				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (Director of Project)		Dr.Öğr.Üyesi Faruk SAYDAM				
	DİĞER GÖREVLİLER (Researchers)		Atilla TOPÇU, Safiye İnşira YILDIZ				
	BAŞVURULAN ETİK KURUL		Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		☒ Tek Merkez Ulusal		☐ Çok Merkezli Ulusal		☐ Çok Merkezli Uluslararası	
KARAR BİLGİLERİ		Karar No(Decision No):2020/32		Tarih (Date): 16.07.2020			
		R.T.E. Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden, Dr.Öğr.Üyesi Faruk SAYDAM 'ın sorumluluğunda yürütülen ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Hayvan Deneyleri Araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına katılan üyelerin oy birliğiyle karar verilmiştir.					
Decision Information		The study above has been approved by the Local Ethics Committee of R.T.E.University.					
		☒ Accepted		☐ Rejected			
ÜYELER (Members)							
Ünvanı/ Adı/ Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza	
Prof.Dr. Fikri BALTA (Başkan, Müdür)	Su Ürünleri (Veteriner Hekim)	R.T.E. Üniversitesi Su Ürünleri Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H		
Doç.Dr. Levent TÖMKAYA (Başkan Vekili)	Histoloji Embriyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H		
Doç.Dr. Ayşe ERTÜRK (Üye)	Enfeksiyon Hast. Ve Klinik Mikr.	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H		
Doç.Dr. Serkan GÜL (Üye)	Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI	
Doç.Dr.Kazım ŞAHİN (Üye)	Tıbbi Mikrobiyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H		
Doç.Dr. Hülya KILIÇ YILMAZ (Üye)	Tıbbi Biyokimya	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI	
Dr.Öğr.Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN (Üye)	Tıbbi Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H		
Dr.Öğr.Üyesi Murat ALKURT (Üye)	Protetik Diş Tedavisi	R.T.E. Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI	
Şenay ÇAKIROĞLU (Üye)	Veteriner Hekim	R.T.E. Üniversitesi Deney Hay.Üy.ve Arş.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H		
Şevket ÇAKMAKÇI (Üye)	Sağlık Çalışanı	Sendika Üyesi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H		
Rukiye ÜLGER (Üye)	Serbest Çalışan	Sivil Üye	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI	

*Araştırma ile ilişkili(Relation to the project, E: Yes, H: No)

**Toplantıda Bulunma(Attendance, E: Yes, H: No)