

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA ENDOTOKSİNLE OLUŞTURULAN
SEPSİS MODELİNDE TOLL-LİKE RESEPTÖR-4
ANTAGONİSTİNİN (ERİTORAN)
RETİNOKOROİDAL İNFLAMATUAR HASARA
ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. FEYZAHAN EKİCİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MERAL OR**

**ANKARA
MAYIS 2011**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA ENDOTOKSİNLE OLUŞTURULAN
SEPSİS MODELİNDE TOLL-LİKE RESEPTÖR-4
ANTAGONİSTİNİN (ERİTORAN)
RETİNOKOROİDAL İNFLAMATUAR HASARA
ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. FEYZAHAN EKİCİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MERAL OR**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından
01/2007-75 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
MAYIS 2011**

TEŐEKKÜR

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim boyunca her aşamada desteğini, sevgisini ve ilgisini esirgemeyen, tez konumun seçimi, planlanması ve yürütülmesinde sonsuz katkıları olan hocam sayın Prof. Dr. Meral Or'a,

Tezimin planlanmasında, deney aşamasında ve sonuçların yorumlanması esnasında değerli katkıları için Gazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Sevim Ercan'a, Gazi Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Osman Yüksel'e, Dışkapı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalından sayın Doç. Dr. Murat Alper'e, Gazi Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem Gülbahar'a,

Başta anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Berati Hasanreisöglu olmak üzere uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan sayın hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışma fırsatı bulduğum, tanışmış olmaktan mutluluk duyduğum, uzman ve asistan arkadaşlarıma,

Hep yanımda olup sevgilerini ve desteklerini hiç esirgemeyen arkadaşlarıma ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	i
Kısaltmalar.....	v
Tabloların listesi.....	viii
Şekillerin listesi.....	ix
Resimlerin listesi.....	xi
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Doğal inflamatuvar yanıt ve sepsis patogenezi.....	5
2.1.1 Normal İnflamatuvar Süreç.....	6
2.1.2 Doğal İmmün Yanıt.....	7
2.1.3 Sepsiste İnflamasyon.....	7
2.1.3.1 Proinflamatuvar sitokinler.....	8
2.1.3.2 Proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar denge.....	9
2.1.4 Sepsiste hücre hasarı.....	10
2.1.4.1 Hipoksik hipoksi.....	11
2.1.4.2 Direkt sitotoksisite.....	11

2.1.4.3 Apoptoz.....	12
2.2 Sepsis Patogenezinde Toll-like Reseptörler (TLR).....	12
2.2.1 TLR ve Doğal İmmünite.....	12
2.2.2 TLR moleküler yapısı.....	14
2.2.3 TLR4 sinyal sistemi.....	15
2.2.4 TLR aracılı NFκB aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokin salınımı.....	19
2.2.5 TLR aracılı reaktif oksijen radikali ' <i>reactive oxygen species</i> ' (ROS) üretimi ve DNA hasarı.....	21
2.2.6 TLR ve apoptoz regulasyonu.....	22
2.2.7 TLR4 antagonistleri.....	23
2.2.7.1.Eritoran (E5564).....	24
2.3 Sepsise Mikrovasküler Yanıt.....	27
2.4 Oküler İmmünite.....	28
2.4.1. Retinal mikrovasküler yapı ve Kan-Retina Bariyeri (KRB).....	30
2.4.2 İnflamasyon durumunda kan retina bariyeri.....	32
2.5 Deneysel sepsis modellerinde retinokoroidal değişiklikler.....	33
2.6 İnflamatuvar Göz hastalıklarının immunopatogenezinde TLR'nin rolü...36	

3	MATERYEL- METOD.....	40
4	BULGULAR.....	45
4.1	Serum ve Doku TNF-α, Serum ve Doku MDA ve NFκB Sonuçları.....	45
4.1.1	12. saatte Serum ve Doku TNF- α , Serum ve Doku MDA ve NF κ B değerlendirilmesi.....	46
4.1.1.1	12. saatte Serum TNF- α	47
4.1.1.2	12. saatte Doku TNF- α	48
4.1.1.3	12. saatte Serum MDA.....	49
4.1.1.4	12. saatte Doku MDA.....	50
4.1.1.5	12. saatte NF κ B.....	51
4.1.2	24. saatte Serum ve Doku TNF- α , Serum ve Doku MDA ve NF κ B değerlendirilmesi.....	52
4.1.2.1	24. Saatte Serum TNF- α	53
4.1.2.2	24. saatte Doku TNF- α	54
4.1.2.3	24. saatte Serum MDA.....	55
4.1.2.4	24. saatte Doku MDA.....	56
4.1.2.5	24. saat NF κ B.....	57

4.1.3	12. saat ve 24. saat Serum ve Doku TNF- α , Serum ve Doku MDA ve NF κ B değerlerinin karşılaştırılması.....	58
4.2	Histopatoloji Sonuçları.....	59
5	TARTIŞMA.....	66
6	SONUÇ.....	80
7	KAYNAKLAR.....	81
8	ÖZET.....	97
9	SUMMARY.....	99
10	EKLER.....	101
11	ŐZGEMİŐ.....	102

Kısaltmalar

ACAID (*Anterior chamber associated immune deviation*): Ön kamara ilişkili

immün sapma

ANOVA: Tek yönlü varyans analizi

APC: Antijen sunan hücreler

BPI: Bakteriyel permeabilite arttırıcı protein

CD14: Cluster of Differentiation-14

CRP: C-reaktif protein

EIU: Endotoksin ile indüklenen üveit

ELISA: Enzim Linked Immunoabsorbant Assay

GM-CSF: Granülosit-monosit koloni stimüle eden faktör

HMGB1: High Mobility Group B1

ICAM: Hücre içi adezyon molekülü

IFN- β : İnterferon-beta

IFN- γ : İnterferon- gamma

IKK: Nükleer faktör κ B inhibitör kompleksi

IL-1: İnterlökin-1

IL-1Ra: İnterlökin-1 reseptör antagonisti

IRAK-4: İnterlökin-1 Reseptör asosiye kinaz 4

IQR '*Interquartile Range*': Çeyreklikler Arası Genişlik

KRB: Kan-Retina Bariyeri

LBP: Lipopolisakkarid bağlayan protein

LPS: Lipopolisakkarit

MCP: Monosit kemoatraktan protein

MD-2: Myeloid diferansiasyon faktörü

MDA: Malondialdehide

MHC: Major histocompatibility kompleksi

MIF: Makrofaj migrasyon inhibe edici faktör

Myc88: Myeloid diferansiasyon primer yanıt-88

NF-κB: Nükleer faktör-κB

NO: Nitrik oksit

PAF: Trombosit aktive eden faktör

PAMP: Patojen asosiye moleküler patern

PDGF: Trombositten açığa çıkan büyüme faktörü

PMNL: Polimorfonükleer lökositler

PRR '*pattern-recognition receptors*': Patern tanıyıcı reseptörler

ROS '*reactive oxygen species*': Reaktif oksijen radikali

RPE: Retina pigment epiteli

SS: Standart sapma

sIL-2r: Solubl IL-2 reseptör

sTNFr: Solubl TNF reseptör

TGF-β: Transforming büyüme faktörü

TIR: Toll- IL-1 reseptör

TLR: Toll-like reseptörler

TNF- α : Tümör nekrosis faktör- α

TRAF-6: TNF reseptör asosiye faktör 6

TXA2: Tromboksan A2

VCAM: Damar hücre adezyon molekülü

Tabloların Listesi

Tablo 1: Sepsiste inflamatuvar mediyatörler ve hücre kaynakları.....	9
Tablo 2: TLR Ligandları.....	16
Tablo 3: Sepsis patogenezinde mediyatörler ve etkileri.....	20
Tablo 4: TLR 4 ile etkileşen moleküller.....	23
Tablo 5: Sham grubu TNF- α , MDA ve NF κ B değerleri.....	45
Tablo 6: Çalışmanın 12. saatinde Kontrol ve Deney grubu değerleri.....	46
Tablo 7: Çalışmanın 24. saatinde Kontrol ve Deney grubu değerleri.....	52
Tablo 8: Çalışma gruplarına göre 12. ve 24. saat değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	59
Tablo 9: Deney ve kontrol gruplarında retina histopatoloji sonuçları.....	60
Tablo 10: Deney ve kontrol gruplarında retina histopatoloji (kodlanmış) sonuçları.....	61

Şekillerin Listesi

Şekil 1: TLR molekülü şematik çizimi.....	14
Şekil 2: TLR4- MD2- CD14 kompleksi.....	17
Şekil 3: TLR4 sinyal sistemi, Myc 88 bağımlı ve bağımsız yollar.....	18
Şekil 4: Eritoran moleküler yapısı.....	24
Şekil 5: Eritoran etki mekanizması.....	25
Şekil 6: Retina tabakaları ve kan retina bariyeri.....	30
Şekil 7: İnflamasyon durumunda retinaya lökosit infiltrasyonu.....	33
Şekil 8: Göz dokularında TLR ekspresyonu.....	37
Şekil 9: Çalışma gruplarına göre 12. saat Serum TNF- α ortalamaları.....	47
Şekil 10: Çalışma gruplarına göre 12. saat Doku TNF- α ortalamaları.....	48
Şekil 11: Çalışma gruplarına göre 12. saat Serum MDA ortalamaları.....	49
Şekil 12: Çalışma gruplarına göre 12. saat Doku MDA ortalamaları.....	50
Şekil 13: Çalışma gruplarına göre 12. saat NF κ B ortalamaları.....	51
Şekil 14: Çalışma gruplarına göre 24. saat Serum TNF- α ortalamaları.....	53
Şekil 15: Çalışma gruplarına göre 24. saat Doku TNF- α ortalamaları.....	54
Şekil 16: Çalışma gruplarına göre 24. saat Serum MDA ortalamaları.....	55

Şekil 17: Çalışma gruplarına göre 24. saat Doku MDA ortalamaları.....56

Şekil 18: Çalışma gruplarına göre 24. saat NFκB ortalamaları.....57

Resimlerin Listesi

Resim 1: Grup 1'e ait histopatolojik görünüm.....	62
Resim 2: Grup 2'ye ait histopatolojik görünüm.....	63
Resim 3: Grup 4'e ait histopatolojik görünüm.....	63
Resim 4: Grup 3'e ait histopatolojik görünüm.....	64
Resim 5: Grup 5'e ait histopatolojik görünüm.....	65

1.GİRİŞ

Sepsis, gelişen tedavi yöntemlerine karşın yüksek mortalite ile seyreden bir hastalık olma özelliğini korumaktadır. Sepsis patofizyolojisi son yıllarda yapılan araştırmalarla önemli oranda aydınlatılmış olmakla birlikte bu konuda açıklanamayan pek çok durum halen mevcuttur. Sepsis seyrinde enfeksiyona yanıt olarak, anti-inflamatuar mekanizmalar ile dengelenemediğinde uzak doku veya organ hasarına neden olan endojen inflamatuvar mediyatörlerin salındığı gösterilmiştir. Sepsis, enfeksiyon durumunda kontrolsüz ve abartılı sistemik inflamatuvar yanıtı neden olan malign, intravasküler, otodestruktif inflamasyon süreci olarak tanımlanmaktadır. (1, 2)

Tüm mikroorganizmalar patojen ile ilişkili moleküler paternler (*pathogen associated molecular pattern*) (PAMP) olarak adlandırılan özgün, oldukça korunmuş hücre duvarı moleküllerine veya nükleik asit dizilerine sahiptir. PAMP başta antijen sunan hücreler olmak üzere doğal immün sistem içerisinde yer alan hücrelerin yüzeyinde bulunan patern tanıyıcı reseptörler (*pattern recognition receptors* [PRR]) tarafından tanınır, bu reseptörlere bağlanır ve mikrobiyal yapıyı tanıyan sistemi aktive ederek doğal immün yanıtı başlatırlar. Sepsis ile ilişkili en önemli PRR ailesi Toll-like reseptörlerdir (TLR). Her bir TLR tipi farklı PAMP tanıyabilmekte ve gram negatif bakterilerin PAMP yapısını oluşturan lipopolisakkarit (LPS) ise TLR4 ile bağlanmaktadır. TLR4 sinyal sistemi aktivasyonu ile hücre içinde gerçekleşen çeşitli reaksiyonlar sonucunda sitoplazmada inaktif olarak bulunan Nükleer faktör kappa B (NFκB) serbestleşmekte ve proinflamatuvar mediyatörleri (sitokinler, kemokinler, adezyon

molekülleri, reaktif oksijen radikalleri ve reaktif nitrojen radikalleri gibi) üreten genleri stimüle etmektedir. NFκB aktivasyonu neticesinde salınan sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri ile nötrofil aktivasyonu ve migrasyonu gerçekleşmekte ve bunun sonucunda reaktif oksijen radikalleri ve litik enzimler salgılanarak endotelde lizis ve membran bütünlüğünün bozulmasına yol açmakta ve bu da endotel hücre hasarına, mikrovasküler permeabilite artışına ve doku içine nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır. (3) Malondialdehid (MDA) lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkar ve inflamatuvar yanıt sürecinde üretilen serbest oksijen radikalleri ve araşidonik asit yolağı metabolitlerinin yıkım ürünüdür. Dokudaki oksidatif stresin bir belirteçidir.

TLR'lerin doğal immün yanıtta ve sepsis patogenezindeki öneminin anlaşılmasıyla birlikte inflamatuvar süreçlerin rol oynadığı pek çok farklı hastalık patogenezi ile TLR arasında ilişki bulunmuş ve TLR fonksiyonlarının modulasyonu ile farklı tedavi alternatifleri gündeme gelmiştir. Eritoran, E5564, *Rhodobacter sphaeroides* endotoksininden elde edilen sentetik lipid A analogudur. Eritoranın etki mekanizması tam net olmamakla birlikte Myeloid diferansiyasyon faktörü-2 (MD-2) molekülünün hidrofobik iç cebine bağlanıp LPS'nin TLR4 molekülünü aktive etmesini önleyerek antagonistik etki sağladığı düşünülmektedir. (4,5)

Oküler inflamatuvar hastalıkların patogenezinin aydınlatılması amacıyla TLR ve göz dokusu ilişkisi ile ilgili de pek çok çalışma yapılmıştır. TLR4 molekülünün kornea epitel hücreleri (6), korneal stromal fibroblastlar (7), silier cisim, iris

endotel hücreleri (8), üveal yerleşik antijen sunucu hücreler (APC) (9) ve retina pigment epitelinde (RPE) (10) de eksprese edildiği gösterilmiştir.

Göz dokusu vizyonu her durumda koruma amacıyla oküler immün korunak olarak da adlandırılan çeşitli mekanizmalar ile lokal immün ve inflamatuvar yanıt sınırlandırır. Retinadaki immün aracılı inflamasyon da kan retina bariyeri (KRB) olarak adlandırılan anatomik, fizyolojik ve immün regülatuar komponentleri olan bir sistem tarafından düzenlenir. Retinayı inflamatuvar yanıt sırasında immün sistemden korumayı ve doku hasarını önlemeyi amaçlayan tüm bu mekanizmalara rağmen üveoretinit, diabetik retinopati ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi hastalıkların patogenezi sırasında KRB bütünlüğü bozulmakta, retina içine lökosit infiltrasyonu gerçekleşmekte ve doku hasarı oluşmaktadır.(11)

Endotoksin ile indüklenen üveit (EIU) modeli en önemli oküler inflamasyon modellerinden biridir. EIU modeli ilk tariflendiği yayında ön kamara, iris, silier cismi tutan ön üveit modeli olarak tanımlanmış (12,13) olsa da sonradan yapılan çalışmalarda retinal ve koroidal tutulum gösterilmiştir. (14,15) EIU modelinin retina ve retinal mikrovasküler sistemde en belirleyici özellikleri endotel hücre hasarı ve endotel hasarına sekonder KRB bütünlüğünde bozulma, damar duvarına polimorfonükleer lökosit (PMNL) adezyonu, migrasyonu ve infiltrasyonu, doku içine protein ve sıvı kaçıışı ve retina hücre hasarıdır. (16) LPS tarafından indüklenen TLR yolağının son ürünü olan tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) , interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-4, adezyon molekülleri ve kemokinler gibi proinflamatuvar mediyatörlerin salınması ile dokuda inflamatuvar süreç başlatılır. EIU modelinde özellikle TNF- α etkisiyle KRB'nin bozulduğu ve bu bozulmanın

PMNL adezyonu, endotelyal apoptoz ve mikrovasküler hasar ile korele olduğu gösterilmiştir. (17)

Bu çalışmada;

1. Sistemik sepsis yoluyla oluşturulan oküler inflamasyon modelinde serum ve retinokoroidal dokuda TNF- α , MDA ve NF κ B düzeylerindeki ve retinadaki histopatolojik değışikliklerin,
2. TLR4 antagonisti Eritoran ile bu biyokimyasal ve histopatolojik değışikliklerin düzelme durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Sepsis enfeksiyöz bir ajan ile indüklenen, çeşitli biyokimyasal ve immün yanıtların devreye girmesiyle tüm vücutta genel bir immün yanıt oluşturan yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili ciddi bir klinik durumdur. (1)

2.1 Doğal inflamatuvar yanıt ve sepsis patogenezi

Sepsis malign intravasküler inflamasyon süreci olarak tanımlanmaktadır.(2)

- Malign olmasının nedeni kontrolsüz, düzensiz ve kendi dokularına hasar verici olmasıdır.
- İntravasküler olmasının nedeni kan yoluyla yayılıp interstisyel aralıkta hücre- hücre etkileşiminde etki göstermesidir.
- İnflamatuvar olarak adlandırılmasının nedeni de septik yanıtın konakçı normal inflamatuvar yanıtının abartılmış şekli olmasıdır.

Doku hasarı veya enfeksiyon durumunda eş zamanlı salınan proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar moleküller arasındaki denge sağlıklı doku onarımı ve iyileşmeye olanak verir. İnflamatuvar süreçteki bu denge kaybolduğu zaman uzak doku veya organ hasarı oluşmaktadır (18). Sistemik proinflamatuvar reaksiyonun en önemli sonuçları arasında endotelial hasar, mikrovasküler disfonksiyon, doku oksijenizasyonunda bozulma ve organ hasarı sayılabilmektedir. Aşırı anti-inflamatuvar yanıt durumunda ise anerji ve immüsupresyon oluşabilmektedir. Aynı zamanda bu aşırı proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar yanıtlar birbirine karışarak destrüktif immünolojik uyumsuzluğa sebebiyet vermektedir. (19)

Sepsis, dokunun enfeksiyona olan normal patofizyolojik yanıtının uzaması, abartılı hale gelmesi ve diğer normal dokuları etkilemeye başlaması şeklinde tanımlanan otodestrüktif bir süreçtir.

2.1.1 Normal İnflamatuar Süreç

Enfeksiyöz ajanlar çok çeşitli yapıda olsa da dokuda oluşturulan inflamatuvar yanıt genellikle benzerdir. Hasarlı bölgede lökosit göçünü başlatabilme amacıyla endotel hücreleri adezyon molekülleri eksprese etmeye başlamaktadırlar. Aynı zamanda PMNL aktive olmakta ve sonrasında agregasyon ve vasküler endotele migrasyona neden olacak adezyon moleküllerini salgılamaktadırlar. İnvazyon gösteren ajanın ve oluşan hasarlı dokunun fagositozu için diapedez ve PMNL'in doku içine migrasyonu şarttır. (20) Hasar bölgesinde PMNL'in sitokin salgılaması, inflamasyonun kardinal bulgularından olan lokal vazodilatasyon, hiperemi ve proteinden zengin ödemin eşlik ettiği mikrovasküler permeabilite artışı ile sonuçlanmaktadır. Adezyon, kemotaksi, fagositoz ve bakteriyel öldürme gibi lokal inflamatuvar süreçler makrofajlardan salınan sitokinler ile çeşitli üretim basamaklarında sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Makrofajlar doku içine mikroorganizma invazyonu ile uyarıldıklarında başta TNF- α ve IL-1 olmak üzere proinflamatuvar mediyatörleri hücre mikroçevresine salgılamaktadır (parakrin etki). TNF- α ve IL-1 salınımı diğer inflamatuvar mediyatörlerden olan IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, interferon ve eicosanoidler tarafından daha da arttırılır. Bu durum PMNL, makrofaj ve lenfosit aktivasyonunu sürdürmeye yardımcı olur. Eş zamanlı salınan anti-inflamatuvar mediyatörler ile de inflamasyon kontrol altına alınır. Net

etki mikroorganizmanın eliminasyonu, hücre debrisinin uzaklaştırılması ve sonrasında da doku onarımının teminidir.

2.1.2 Doğal İmmün Yanıt

Doğal immün sistem patojene karşı konakçı savunma sistemini oluşturur. Doğal immün yanıt mikroorganizma yüzeyindeki spesifik yapıları tanıyan PRR'ların aktive olması ile başlar. TLR ailesi hücre yüzeyinde bulunan pek çok farklı PRR ailesinden biridir. Doğal immün sistem tarafından tanınan mikroorganizma motiflerine patojen ile ilişkili moleküler paternler (PAMP) adı verilmektedir. PAMP'lar immün sistemde görev yapan hücrelerin yüzeylerindeki PRR'a bağlanarak mikrobiyal yapıyı tanıyan sistemi aktive ederler. Bu aktivasyon inflamatuvar yanıt sürecini de başlatmış olur. (21)

2.1.3 Sepsiste İnflamasyon

Normal inflamasyon yanıtında PMNL yuvarlanması, adezyon, diapedez, kemotaksi, fagositoz ve bakteriyel öldürme sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki sıkı kontrol sepsis durumunda bozulmakta ve uzak doku ve organ hasarı oluşmaktadır. (22,23)

Enfeksiyöz ajan yüzeyindeki PAMP immün hücrelerin yüzeyindeki PRR ile etkileşir. Örnek olarak PAMP, gram pozitif bakteriler için peptidoglikan, gram negatif bakteriler içinse lipopolisakkarittir. Bu PAMP'lar sırasıyla hücre yüzeyindeki TLR2 ve TLR4'e bağlanır. Bu bağlanma sitozolik NFκB aktivasyonuna neden olur. Aktive NFκB sitoplazmadan nükleusa hareket ederek ilgili transkripsiyon bölgelerine bağlanır ve konakçı immün yanıtında rol oynayan

proinflamatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 gibi), kemokinlerin ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen radikallerinin üretiminde görevli genleri aktive eder.

2.1.3.1 Proinflamatuar sitokinler

Bakteri hücre duvarında yer alan endotoksin, dolaşımdaki mononükleer fagositler, endotel hücreleri ve diğer hücrelerden birçok güçlü mediyatörlerin salınımını başlatmaktadır. Tablo 1’de bu mediyatörler ve hücre kaynakları izlenmektedir. Bu proinflamatuar mediyatörlerin en önemlileri; TNF- α , IL-1, 2, 6, 8 ve platelet aktive eden faktör (PAF)’dür (24). En önemli proinflamatuar sitokinlerden olan TNF- α ve IL-1 ateş, hipotansiyon, lökositoz, fibrinolitik sistem ve koagülasyon sistemi aktivasyonu, endotelial permeabilite artışı gibi ortak etkilere sahip olduğu gibi TNF- α ve IL-1 aynı zamanda diğer mediyatörlerin salınması için de aktive edici role sahiptir. Sepsiste dolaşımdaki TNF- α seviyesi artmaktadır. Endotoksinin LPS bağlayıcı proteine (LBP) bağlanarak çeşitli ko-reseptörler aracılığıyla TLR4 sistemini uarması ve NF κ B’nin aktivasyonu sonucu diğer mediyatörlerle birlikte TNF- α salınımı da oluşmaktadır. (25) Sepsiste araşidonik asit metabolitleri de önemli rol oynar. Siklooksijenaz yolla prostoglandinler ve tromboksan A₂; lipooksijenaz yolla ise lökotrienler açığa çıkar. Endotoksinin direkt etkisi ve TNF- α , IL-1 gibi mediyatörler araşidonik asit metabolitlerinin açığa çıkmasını ve sentezini aktive etmektedirler. Araşidonik asit metabolitleri, ateş, taşikardi, takipne, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu ve laktik asidoz oluşumunda rol alırlar. En önemli araşidonik asit metabolitlerinden biri olan Tromboksan A₂ (TXA₂) kuvvetli vazokonstriktör etkiye sahiptir ve dokuda yıkımı ile malondialdehid (MDA) oluşur. IL-1 ve IL-6’nın diğer bir görevi de T

hücrelerini aktive etmektedir. Bu aktivasyon ise doğal immün sistem ile adaptif immün sistem arasında bir köprü oluşturur. T hücreleri aktivasyonu ile interferon- γ (IFN- γ), IL-2, IL-4 ve granülosit-monosit koloni stimule eden faktör (GM-CSF) oluşur. Bu esnada koagulasyon kaskadı ve kompleman sistemi de aktive olur (18).

Tablo 1: Sepsiste inflamatuvar mediyatörler ve hücre kaynakları

Konak hücre	Proinflamatuvar mediyatörler	Düzenleyici mediyatörler	Anti-inflamatuvar mediyatörler
Monosit/makrofaj	TNF- α , IL-1, IL-8, IFN- γ , doku faktörü, prostanooidler, lökotrienler, PAF, NO	IL-6 IL-12	IL-1Ra sTNFr TGF- β
Nötrofiller	integrin ekspresyonu, süperoksit, TNF- α , IL-1		BPI, defensinler, asikloksiasilhidrolaz
Lenrositler	IFN- γ , TNF- α	IL-12	IL-4, IL-10, sIL-2r
Endotel hücresi	selektin, VCAM, ICAM, NO, doku faktörü		
Trombositler	serotonin, prostanooidler	PDGF	
Plazma komponentleri	koagulasyon kaskadı, kompleman aktivasyonu, bradikinin	CRP, LBP	

(BPI, bakteriyel permeabilite arttırıcı protein; CRP, C-reaktif protein; ICAM, hücre içi adezyon molekülü; IFN- γ , interferon γ ; IL-1Ra, interlökin-1 reseptör antagonisti; LBP, lipopolisakkarid bağlayan protein; NO, nitrik oksit; PAF, trombosit aktive eden faktör; PDGF, trombositten açığa çıkan büyüme faktörü; sIL-2r, solubl IL-2 reseptör; sTNFr, solubl TNF reseptör; TGF-b, transforming büyüme faktörü; TNF, tümör nekroz faktörü; VCAM, damar hücre adezyon molekülü)

(tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/.../Mehmet_Doganay/2/SEPSIS.pdf – kaynağından alınmıştır)

2.1.3.2 Proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar denge

Normal inflamatuvar cevap sırasında proinflamatuvar mediyatörlerle eş zamanlı olarak anti-inflamatuvar mediyatörler de salınmaktadır. (Tablo 1 de anti-inflamatuvar mediyatörler izlenmektedir.) Proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar mediyatörler arasındaki denge inflamasyona neden olan ajanın ortadan kaldırılması ve inflamasyonun doku hasarı oluşmadan sonlandırılması açısından hayati öneme sahiptir (19). Eğer uygun denge sağlanabildiyse enfeksiyöz ajan

ortadan kaldırılır ve hasar oluşmaksızın immün homeostazis sağlanmaktadır. Enfeksiyonun ortadan kaldırılamadığı durumlarda ise sitokin yükü artar, doku ve organ hasarına neden olan sistemik inflamatuvar yanıt sendromu oluşmaktadır. Yine dengenin kurulamadığı başka bir durumda anti-inflamatuvar yanıt baskın gelebilir ve anti-inflamatuvar reaksiyon sonucu immün yetmezlik de izlenebilmektedir.

2.1.4 Sepsiste hücre hasarı

Sepsiste hücre hasarı neticesinde gerçekleşen organ disfonksiyonu mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan otopsi çalışmalarında çoklu organ disfonksiyonuna genellikle yaygın endotel ve parankimal hücre hasarının eşlik ettiği izlenmiştir. Olası hücre hasarı mekanizmaları arasında;

- İskemi (Oksijen ihtiyacına göre relatif oksijen yetmezliği),
- Sitopatik hasar (proinflamatuvar mediyatör ve diğer inflamasyon ürünleri ile direkt hücre hasarı),
- Artmış apoptoz (programlanmış hücre ölümü),

sayılabilir. (26)

2.1.4.1 Hipoksik hipoksi

Sepsiste izlenen mikrodolaşım bozukluğuna mikrovasküler ve endotelial disfonksiyon neden olmaktadır. Mikrodolaşımdaki septik lezyon, dokudaki oksijen aktarım metabolizmasını bozmakta ve doku kanlanmasını engellemektedir. Endotel hücresi-PMNL etkileşimi sepsisin özellikle kontrolsüz inflamasyon safhasında inflamasyon sürecine direkt katılmaktadır. Aktive lökosit ve plateletler kapiller yatakta tıkanıklıklara neden olmaktadır. PMNL ve endotel adezyonu; reaktif oksijen radikalleri, litik enzimler ve vazoaktif moleküllerin (NO, endotelin, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), PAF gibi) salınımına neden olmaktadır. Takip eden mikrovasküler hasar sonucunda doku oksijen değişimi için gereken alan azalmakta ve hücrel oksijen difüzyonu bozulmaktadır.

Sepsiste dolaşım bozukluğuna neden olan diğer bir faktör de eritrositlerin normalde mikrosirkulasyondaki normal bükülme fonksiyonlarını kaybetmeleridir. Rigid eritrositler septik mikrosirkülasyonda rahat hareket edememekte ve bu da gaz değişimi için gereken yüzey alanını daraltmakta ve doku oksijenizasyonu azalmaktadır. (27)

2.1.4.2 Direkt sitotoksisite

Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda hem direkt endotoksinin kendisinin hem de sepsis sırasında açığa çıkan başta TNF- α ve NO olmak üzere sitokinlerin mitokondrial transport sistemini bozarak sitotoksik etki ettiği gösterilmiştir. Mitokondri ultrastrüktüründe bozulma neticesinde hücrenin enerji

metabolizmasında disfonksiyon oluşmakta ve dolayısıyla membran ve matrix proteinleri hasarlanmaktadır. (28)

2.1.4.3 Apoptoz

Apoptoz hücre ölümüne neden olan bir takım fizyolojik ve morfolojik değişimi ifade etmektedir. Apoptoz yaşlanmış veya fonksiyonunu kaybetmiş hücreleri normalde ortadan kaldıran başlıca mekanizmadır. Apoptoz ayrıca enfeksiyon tablosu sakinleştikten sonra inflamasyonu kontrol altına almak için devreye giren en önemli süreçtir. Proinflamatuvar sitokinlerin kontrolsüz artışı aktive makrofaj ve PMNL'lerde apoptozu geciktirmekte ve bu da inflamatuvar yanıtı uzatarak uzak doku veya organ hasarına neden olabilmektedir. (29)

2.2 Sepsis Patogenezinde Toll-like Reseptörler (TLR)

2.2.1 TLR ve Doğal İmmünite

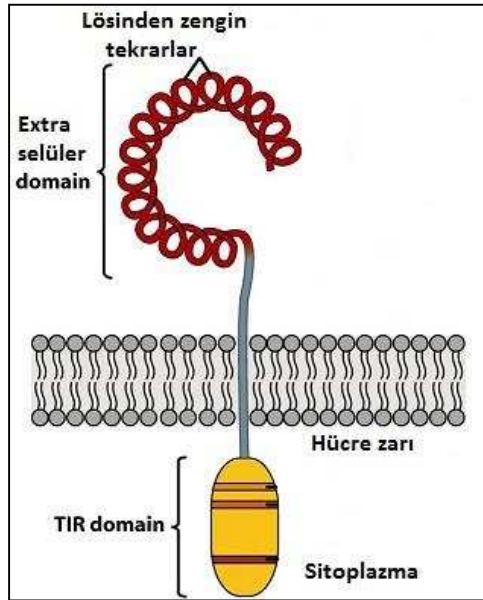
Son yıllarda yapılan çalışmalarda TLR'in doğal immün sistem hücreleri yüzeyindeki patojeni tanıyan ilk yapı olduğu, immün yanıtı başlattığı ve doğal ve adaptif immünite arasında bağlantıyı sağladığı tespit edilmiştir. (3) TLR aktivasyonu normalde günlük hayatta karşılaşılan tüm patojenlere karşı konakçıyı korumak için gerçekleşen bir doğal immünite yanıtıdır. Doğal immünite antijene özgü T ve B hücre yanıtlarından oluşan adaptif immünite başlamadan önce patojen ile karşılaşıldığında hemen aktive olarak mikroorganizmaların çoğalma ve yayılmasını önlemeye çalışır. (30,31). Doğal bağışıklık sistemi monositler,

makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, kompleman, akut faz proteinleri ve sitokinlerden oluşur. (30) Tüm mikroorganizmalar patojen ile ilişkili moleküler paternler (PAMP) olarak adlandırılan özgün, oldukça korunmuş hücre duvarı moleküllerine veya nükleik asit dizilerine sahiptir. Bu moleküler paternler örnek olarak gram negatif bakterilerde lipopolisakkarit (endotoksin), gram pozitif bakterilerde peptidoglikan veya lipoteikoik asit, maya hücrelerinde ise mannanlardır (30,31). Mikroorganizmalardaki PAMP başta antijen sunan hücreler olmak üzere doğal immün sistem içerisinde yer alan hücrelerin yüzeyinde bulunan PRR'ler tarafından tanınır ve bu reseptörlere bağlanır (30-32). Mikroorganizmalardaki PAMP doğal immün sistem hücrelerindeki PRR'ler tarafından tanındığında doğal immün sistem cevabı gelişir. PRR'ler yapısal olarak farklı proteinlerdir ve birkaç reseptör ailesini oluşturmaktadırlar. Sepsis ile ilişkili en önemli PRR ailesi Toll like reseptörlerdir. Farklı mikrobiyal yapılar, farklı TLR'lere bağlanmaktadır (31). PAMP bu paterni tanıyan reseptöre bağlandığında bazı hücre içi sinyal yollarını aktive eder bu da transkripsiyon faktörlerinin (NF κ B gibi) aktivasyonu ile sonuçlanır. Transkripsiyon faktörleri immün cevap genlerinin ekspresyonunu indüklemekte ve sonuçta sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri gibi çeşitli efektör moleküllerin salınımına neden olmaktadır. Ancak sepsis durumunda TLR aracılı inflamatuvar kaskad aşırı tetiklenmekte ve sitokin salınımı immün sistem homeostasisini aşmaktadır. Doğal immün sistemde patojen-konakçı etkileşim mekanizmasının anlaşılabilmesi ve bu etkileşime yönelik potansiyel tedavi

ajanlarının söz konusu olabilmesi açısından TLR yapısının aydınlatılması hayati öneme sahiptir. (1)

2.2.2 TLR moleküler yapısı

Toll like Reseptörler, 1996 yılında ilk kez *Drosophila melanogaster*'da fungal enfeksiyonlara karşı immünette rolü olduğu keşfedilen Toll molekülünün (33) homologudur. İnsanda bulunan ilk TLR molekülü TLR4'dür. (34) Toll molekülüne benzer bir şekilde insan TLR'ü ekstraselüler lösinden zengin domain ve sitoplazmik karboksi terminal Toll- IL-1 reseptör (TIR) domain içeren tip-1 transmembran proteindir. (Şekil 1)



Şekil 1: TLR molekülü şematik çizimi

(Kuby IMMUNOLOGY, sixth edition, 2007 W.H. Freeman and company kaynağından değiştirilmiştir.)

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda insanda değişik mikrobiyal yapıları tanıyan 11 farklı protein keşfedilmiş ve bunlar TLR ailesi adı altında incelenmiştir (3). TLR10 haricindeki tüm TLR'lerin ligandları bilinmektedir. TLR2 ve 4'ün çok sayıda ligandı tanımlanmıştır. TLR'ler amino asit sıralarında benzerlikler ve intrasellüler sinyallerine göre TLR2 ailesi (TLR1, TLR2, TLR6), TLR3 ailesi, TLR4 ailesi, TLR5 ailesi ve TLR 9 ailesi (TLR7, TLR8, TLR9) olarak gruplanırlar. TLR'lerin ligandları Tablo 2'de gösterilmiştir. TLR4 gram negatif bakterilerdeki LPS'lerin sinyal reseptörüdür. TLR2 lipoprotein, lipopeptid, peptidoglikan, lipoteikoik asit, lipoarabinomannan, glikoinositolfosfolipid, glikolipid ve zimosan gibi farklı hücre yapılarındaki molekülleri tanır. En son tanımlanan TLR, TLR11'dir. TLR11 defektli farelerin üropatojenik bakteriler ile oluşturulan böbrek enfeksiyonlarına yatkın olduğu izlenmiştir. İnsanlarda TLR11 fonksiyonel değildir. İnsanlarda üropatojenik bakterileri yakalamak için alternatif bir yol olup olmadığı ise bilinmemektedir. (35)

2.2.3 TLR4 sinyal sistemi

TLR4' ün keşfi ile özellikle gram negatif sepsis patogenezi konusunda pek çok soru aydınlatılabildiği görülmüştür. TLR4 için ilk ligand 1998 yılında bulunmuş ve TLR4 proteininin primer olarak gram negatif bakteri hücre duvarındaki lipopolisakkaridi tanımaya yönelik olduğu keşfedilmiştir. (36) LPS; lipid A, merkezde kısa oligosakkarit ve O-antijen polisakkarit içeren üç parçalı bir yapıdır. Lipid A kısmı biyolojik aktif kısmı olup insan immün sistemi tarafından tanınan parçadır. Ancak TLR4 LPS'yi direkt olarak tanıyamamakta ve LPS bağlayıcı

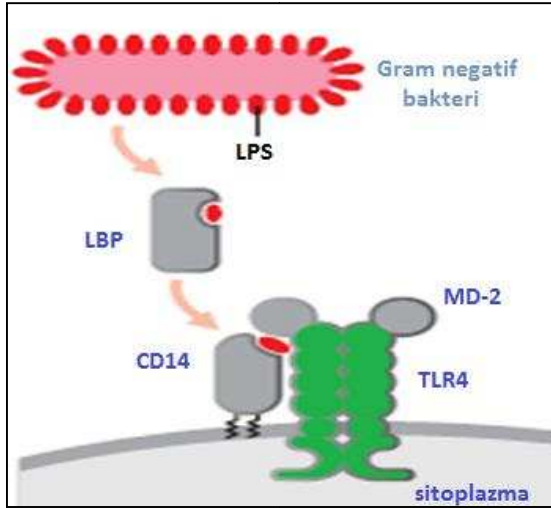
Tablo 2: TLR Ligandları

TRL	Ligandları
TLR1	Tri-açıl lipopeptidler (bakteria, mikobakteri) Solubl faktörler (N. meningitis)
TLR2	Lipoprotein/lipopeptidler Peptidoglikan (Gram (+) bakteri) Lipoteikoik asit (Gram (+) bakteri) Lipoarabinomannan (Mikobakteri) Fenol solubl modulin (S. epidermidis) Glikoinositolfosfolipidler (Trypanosoma cruzi) Glikolipidler (Treponema maltophilum) Porinler (Neisseria) Zimosan (fungi)
TLR3	Çift sarmal RNA (virus)
TLR4	Lipopolisakaritler (Gram (-) bakteri) Taxol Füzyon ve proteinleri Fibronektin EDA domain Hycluronik asit oligosakaritleri Heparan sülfatın polisakarit fragmanları Fibrinojen
TLR5	Flagellin
TLR6	Di-açıl lipopeptidler (mycoplasma) – Isı-labil solubl faktör (grup B streptokoklar) Fenol-solubl modulin (stafilokoklar)
TLR7	Tek sarmal viral RNA Imidazokinolinler (sentetik bileşikler) Loxoribin (sentetik bileşikler) Bropirimin (sentetik bileşikler)
TLR8	Tek sarmal RNA
TLR9	CpG DNA (bakteri) Kromatin-IgG bileşikler
TLR10	? bilinmiyor
TLR11	Üropatojenik bakteriye ait faktörler

(Adışen E, Önder M. Dermatolojide Toll Like Reseptörler. Dermatose. 2006;1: 14-21'dan alınmıştır) (37)

proteine (LPB) ihtiyaç duymaktadır. LPB plazmada bulunan bir akut faz proteini olup LPS molekülünün lipid A kısmına bağlanmaktadır. LPS ve LPB kompleksi özellikle monosit, makrofaj ve nötrofillerin hücre zarında eksprese olan CD14 (*Cluster of differentiation*) molekülü ile bağlanır ve LPS, CD14'e transfer edilir. TLR4 ve LPS sinyalleşmesi için kesin gerekli olan diğer bir molekül de MD2 (*Myeloid differentiation factor*)'dir. (38) MD2, TLR4'ün ekstraselüler domaini ile ilişkilidir. CD14, LPS'nin MD2'ye bağlanmasını kolaylaştırmakta, bu da stabil bir

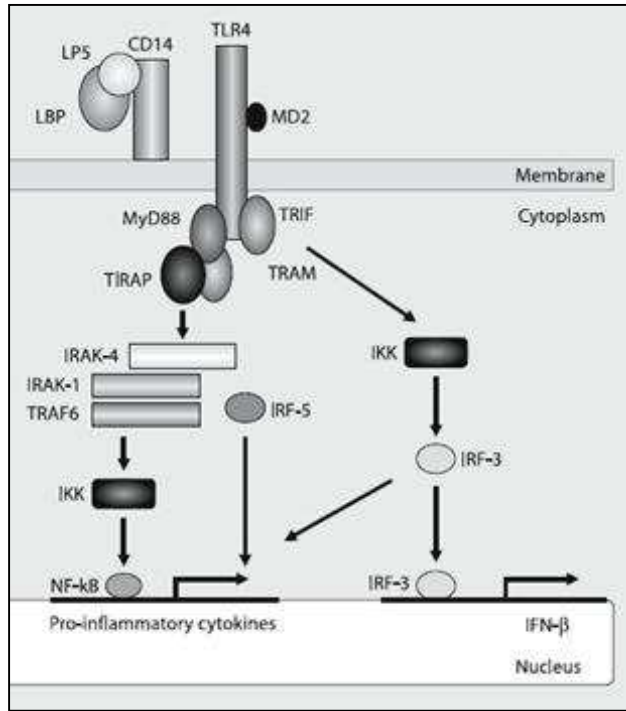
TLR4-LPS bağlantısını olanaklı kılmaktadır. Şekil 2’de TLR4-MD2-CD14 kompleksi izlenmektedir. TLR aktivasyonu sonrası myeloid diferansiasyon primer yanıt-88 (Myc88) proteini devreye girmekte ve IL-1R- asosiye kinaz 4 (IRAK4) ile bağlanmakta, bu bağlanma da TNF reseptör asosiye faktör 6 (TRAF6) ve onunla bağlı bulunan IRAK1’ i fosforile etmektedir. Bu kompleks NFκB inhibitör kompleksini (IKK) aktive etmekte ve bu fosforilasyon sonucunda sitoplazmada inaktif olarak bulunan NFκB serbestleşmekte ve IL-1, TNF-α, IL-6 veya IL-8 gibi inflamatuvar sitokinleri ve diğer proinflamatuvar mediyatörleri üreten genlerin transkripsiyonuna neden olmaktadır.



Şekil 2: TLR-4-MD-2-CD-14 kompleksi

(Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease, ed: Anthony L. DeFranco, Richard M. Locksley, and Miranda Robertson Chapter 3-10 2007 New Science Press Ltd. kaynağından alınmıştır) (39)

Myc88 bağımlı yolak sonucunda proinflamatuvar mediyatörler salınmaktadır. Ayrıca sadece TLR4 ve TLR3'ün kullandığı Myc88 bağımsız yolak bulunmakta ve bu yolağın aktivasyonu ile İnterferon- β (IFN- β) üretilmektedir. IFN- β ise T lenfosit aktivasyonu ve farklılaşmasını düzenleyerek doğal immün sistem ile adaptif immün sistem arasında bağlantıyı sağlamakta ve apoptoz inhibe edici etkisi ile inflamatuvar yanıtın daha uzun ve etkin olmasını sağlamaktadır. Myc88 bağımlı ve bağımsız yollar Şekil 3'te görülmektedir. (3)



Şekil 3: TLR4 sinyal sistemi, Myc 88 bağımlı ve bağımsız yollar
(Wiersinga WJ, Van der Poll T. *The Role of Toll-like Receptors in Sepsis* Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, 2006, Volume 2006, Part 1, 3-13 kaynağından alınmıştır.)

2.2.4.TLR aracılı NFκB aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokin salınımı

NFκB, hücre içinde transkripsiyondan sorumlu NFκB/Rel ailesine ait bir proteindir. NFκB immün ve inflamatuvar yanıt oluşumunda rol oynayan en önemli proteinlerden biridir. NFκB, doğal immünette makrofaj ve PMNL gelişimi, maturasyonu ve patojene karşı inflamatuvar yanıtın başlatılması reaksiyonlarında hayati öneme sahip olup aynı zamanda adaptif immün sistemin uyarılması ve T ile B lenfosit farklılaşmasında da görevlidir.

LPS ile TLR aracılı yolak başlatılır ve inflamatuvar kaskad devreye girer ve en sonunda NFκB inhibitör kompleks (IKK) fosforile edilir. Bu fosforilasyon ile normal şartlarda sitoplazmada inaktif bir şekilde bulunan NFκB aktive olur ve inflamasyondan sorumlu mediyatörleri (sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, reaktif oksijen radikalleri ve reaktif nitrojen radikalleri gibi) üreten genleri uyarır (40). Normal bir inflamatuvar yanıt için NFκB aktivasyonu gereklidir. NFκB inhibisyonu ile patojeni ortadan kaldırmaya yönelik reaksiyonların önlenebileceği ve doğal immün sistem ile adaptif immün sistem arasındaki bağlantının bozulabileceği (41) öne sürülmüş olsa da yapılan çalışmalarda septik hastalarda aşırı NFκB aktivasyonu izlenmiş olup, NFκB aktivitesi ile mortalite arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur. (42, 43)

NFκB aktivitesi ile pek çok farklı proinflamatuvar mediyatör sentezlenir. Tablo 3’de bu mediyatörlerin etkileri izlenmektedir. Bu mediyatörlerin üretimi normal immün yanıt için gereklidir ve lokal enfeksiyonun üstesinden gelinmesi için hayatidir ancak mediyatörlerin büyük miktarlarda sentezlenmesi ve

proinflamatuvar ile anti-inflamatuvar mediyatörler arasındaki dengenin kaybolması ile yaygın endotel hücresi harabiyeti sonucunda uzak doku ve organ hasarı gerçekleşir. NFκB aktivasyonu ile sentezlenen en önemli sitokinler; TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 ve IFN-γ'dır. Bu sitokinler başlıca ateş, lökositoz, hipotansiyon ve nötrofil migrasyonundan sorumludur. NFκB aktivasyonu neticesinde salınan adezyon molekülleri ile nötrofil aktivasyonu ve migrasyonu gerçekleşmekte ve bunun sonucunda reaktif oksijen radikalleri salgılanarak endotelde enzimatik lizise ve membran hasarına yol açmakta ve bu da endotelial permeabilite artışına ve doku içine nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır. Yine NFκB aktivasyonu ile üretilen prokoagulan faktörler yaygın damar içi koagülasyona ve doku hipoperfüzyonu ile hipoksisine neden olmaktadır. Hem endotel hasarı hem de doku perfüzyon bozukluğu doku ve organ hasarına sebebiyet vererek mortalite ile sonuçlanmaktadır. (40)

Tablo 3: Sepsis patogenezinde mediyatörler ve etkileri (44)

Sitokinler TNF-α, IL-1, IL-6, IL-18, IL-12, IL-15, MIF, HMGB-1	→	Nötrofil, lenfosit, endotel aktivasyonu, koagülasyon/kompleman sistemi aktivasyonu, adezyon molekülleri, prostaglandin, nitrik oksid sentetaz, akut faz proteinleri, ateş
Kemokinler IL-8, MIP-1 _α , MIP-1 _β , MCP-1, MCP-3	→	İnflamatuvar hücrelerin mobilizasyonu ve aktivasyonu, makrofaj aktivasyonu
Lipid Mediyatörler Tromboksan A ₂ , PAF, Prostaglandinler, Lökotrienler Doku faktörü (TF)	→	Vasküler endotel ve ekstrinsek koagülasyon yolunun aktivasyonu, vazokonstriksiyon/vazodilatasyon
Oksijen Radikalleri Süperoksit ve hidroksil radikaller NO	→	Antimikrobik etki, vazokonstriksiyon/vazodilatasyon

(Karaali R, Tabak F. Sepsis patogenezi. Klinik gelişim, 2009, cilt no:22, No:3 kaynağından alınmıştır)

2.2.5. TLR aracılı reaktif oksijen radikali '*reactive oxygen species*' (ROS) üretimi ve DNA hasarı

Normal bir inflamatuvar yanıtta hücrelerin oksidatif hasardan korunması için bakteriyel öldürme amacıyla ROS üretimi ile bu ROS'ların endojen antioksidan bileşikler ile ortadan kaldırılması arasında bir denge olması çok önemlidir. (45) Bu dengenin ROS yönüne kayması ile hücrede oksidatif stres oluşmakta ve inflamatuvar süreçte aşırı üretilen ROS; hücre ve DNA hasarı ile ilişkili olmaktadır. (46) NFκB akut inflamatuvar yanıt sırasında sitokin ve diğer inflamatuvar mediyatörlerin üretiminde rol oynadığı gibi ROS üretimi ile de yakın ilişkilidir. (47) TLR4 aracılı NFκB aktivasyonu hücre içinde ROS üretimini indüklemektedir.(48) Yapılan bir çalışmada yüksek NFκB ve TNF-α seviyelerinin hücre içinde antioksidan aktiviteden sorumlu proteinleri kodlayan genin transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör eritroid-2 ilişkili faktör-2 (Nrf2)' yi inhibe ettiği gösterilmiştir. (49) Bu inhibisyon sonucunda hücre içindeki ROS'ni ortadan kaldıracak antioksidan yanıt engellenmiş olur ve ROS'leri hücre içinde aşırı birikerek hücre hasarı oluşur. ROS metabolizması sırasında açığa çıkan çoklu doymamış yağ molekülleri malondialdehide (MDA) dönüşür. (50) MDA bir lipid peroksidasyon ürünüdür. Bu bileşik hücre içinde toksik stres oluşturan reaktif bir aldehiddir ve hücre içinde proteinlerle kovalan bağlar yaparak ileri lipoksidasyon son ürünleri oluşturur (51). MDA'in organizmada oksidatif stres belirteci olarak kullanılabileceğine dair yayınlar mevcuttur. (52) MDA, DNA yapısında bulunan deoksiadenozin ve deoksiguanozin ile etkileşerek mutajenik anormal DNA bağları oluşmasına neden olur. (53) DNA içindeki bu kovalan modifikasyon, ilgili

genlerde disfonksiyon veya inaktivasyona neden olacak yapısal değişikliklere yol açar. MDA ayrıca normal yaşlanma süreci, mutagenез, karsinogenез ve radyasyon hasarı ile de ilişkilidir. (53)

2.2.6 TLR ve apoptoz regulasyonu

Nötrofil apoptozu, inflamatuvar yanıtın çözülmesi sürecinde nötrofillerin proinflamatuvar etkinliklerinin azaltılması amacıyla doku makrofajlarına nötrofilleri tanıtarak fagosite edilmelerine neden olan başlıca mekanizmadır. (54,55) İmmün yanıt sırasında nötrofillerin inflamasyon bölgesinde tutulması ve yaşam sürelerinin uzatılması patojene immün cevap açısından önemlidir. Ancak nötrofil apoptozunun dengesi immün sistem homeostasisi için çok önemlidir. Erken apoptoz konakçı savunmasını yetersiz kılacak, gecikmiş apoptoz ise proinflamatuvar mediatörlerin doku maruziyetini uzatacak ve nekrotik hücrelerin uzaklaştırılmamasına bağlı hücre hasarı görülecektir. (56) Yapılan çalışmalarda TLR sinyal sisteminin apoptoz regulasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. Farklı hücre tiplerinde TLR4 uyarılması farklı apoptotik etkiye sahiptir. Bir çalışmada (57) TLR4 üzerinden endotel hücrelerinde apoptozun uyarıldığı gösterilse de doğal immün sistem hücrelerinde LPS ile TLR4 aktivasyonunun apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. (58,59) NFκB de nötrofil apoptozu regulasyonunda etkin bir moleküldür. (60) Bazı çalışmalarda da LPS'nin direkt etkisi ile apoptozun bloke edildiği gösterilmiştir. (61) LPS hem direkt olarak hem de TLR4 yolağını aktive ederek apoptozu inhibe etmekte ve böylelikle nötrofillerin yaşam süresi ve

patojene karşı immün yanıt uzatılmaktadır. Ancak sepsis durumunda bu normal savunma yanıt abartılı hale gelmekte ve biriken proinflatuar mediyatörler ve nekrotik hücreler hem lokal hem de uzak doku ve organ hasarına neden olmaktadır. Sentetik lipid A analogları ile yapılan çalışmalarda LPS ile indüklenmiş TLR4 yolağının inhibe edilmesinin endotoksinin etkilerini önlediği (62) ve kritik septis hastalarında mortaliteyi azalttığı (63) gösterilmiş olsa da apoptozun inhibe edilmesinin patojene karşı savunma sisteminin blokajına neden olup olmayacağı konusunda çalışmalar devam etmektedir.

2.2.7 TLR4 antagonistleri

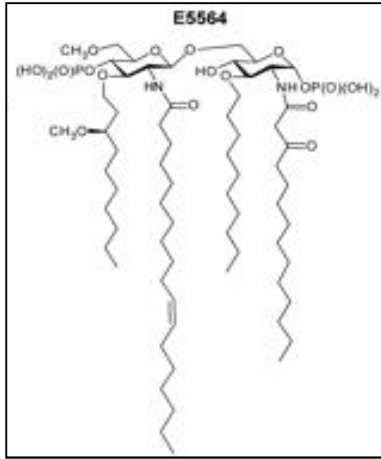
LPS ile başlatılan ve TLR4 yolağı üzerinden NFκB aktivasyonuna neden olan reaksiyonlar zincirinin sepsis patogenezindeki yerinin keşfi sonrasında bu reaksiyon basamaklarının antagonize edilmesine yönelik pek çok farklı ajan gündeme gelmiştir. (4) Tablo 4’te bu ajanlar görülmektedir.

Tablo 4: TLR 4 ile etkileşen moleküller

TLR4 ve TLR4 mRNA ekspresyonu antagonistleri	<ul style="list-style-type: none"> • Klorokin • Ketamin • GTS21(nikotirik analog) • Statinler 	<ul style="list-style-type: none"> • Lidokain • Glisin • Vitamin D3 (?)
TLR4 hücre içi sinyal sistemi antagonistleri	<ul style="list-style-type: none"> • Eritoran • Resatorvid • Ketamin 	<ul style="list-style-type: none"> • Opioidler • Vitamin D3 • Lansoprazol

2.2.7.1 Eritoran (E5564)

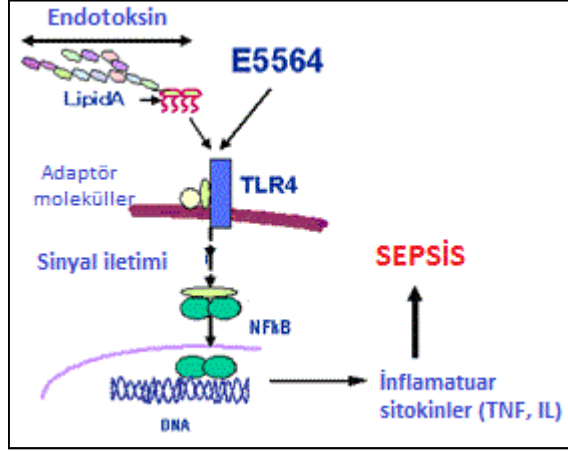
Eritoran, E5564, patojenik olmayan *Rhodobacter capsulatus* 'tan elde edilen ilk nesil TLR4 antagonisti olan E5531 molekülünden sonra geliştirilen ve *Rhodobacter sphaeroides* endotoksininden elde edilen ikinci nesil sentetik lipid A analogudur. (4) (Şekil 4) E5564, E5531 molekülüne göre daha yavaş metabolize edilmekte ve plazma lipoproteinlerine daha az bağlanarak biyolojik etkisini daha uzun süre sürdürebilmektedir. Eritoran büyük oranda intravasküler aralıkta dağılır ve düşük hacim dağılımına (41-64 ml/kg) sahiptir. Plazmadan yavaş bir şekilde elimine edilir (0.7-1.4 ml/kg/h) ve uzun plazma yarı ömrüne sahiptir. (41-64 saat) (64)



Şekil 4: Eritoran moleküler yapısı

Eritoranın etki mekanizması tam net olmamakla birlikte eritoran tarafından bağlanan TLR4-MD2 kompleksinin kristalize olduğu gösterilmiş ve etkisini MD2 molekülünün hidrofobik iç cebine bağlanarak gösterdiği düşünülmüştür. (5)

Böylelikle Eritoran LPS antagonisti gibi davranmakta ve NFκB'nin transkripsiyona neden olacak hücre içi sinyal iletim kaskadını başlamadan engellemektedir. (Şekil 5)



Şekil 5: Eritoran etki mekanizması (<http://www.eisai.com> kaynağından değiştirilmiştir.)

İn vitro çalışmalarda eritoranın hücre kültüründe endotoksin benzeri aktivite göstermeden LPS'i bloke ettiği gösterilmiştir. (64) Yine başka bir in vitro çalışmada eritoran insan myeloid hücre ve makrofaj kültürlerinde sitokin üretimini bloke etmekte (62) ve hücre içi proinflamatuvar sitokin üretiminde down regülasyona neden olmaktadır. (65) Sağlıklı deneklerle yapılan çalışmalarda eritoranın endotoksinin neden olduğu inflamatuvar yanıtı ve klinik semptomları azalttığı gösterilmiştir. (66) Yine aynı çalışmada eritoranın serum TNF-α ve IL-6 seviyesini azalttığı, hipotansiyon, taşikardi gibi dolaşım ile ilgili bulguları hafiflettiği izlenmiştir. Sepsis hastalarında yapılan Faz 2 randomize kontrollü klinik çalışmada da eritoranın mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir. (63) Farmakodinamik çalışmalarda da 12 saatte bir yapılan eritoran infüzyonu ile

devamlı etkinlik sağlanabildiği gösterilmiştir. (67) Eritoran ile ilgili Faz 3 klinik randomize çalışma da halen devam etmektedir.

TLR ekspresyonu ve fonksiyonu enfeksiyon sırasında doğal immün yanıt sistemi için çok önemlidir. TLR molekülünün aynı zamanda konakçının mikroorganizmalara karşı savunma sisteminde de görev alması nedeniyle TLR antagonizması iki yüzü keskin bıçak gibidir. Literatürde bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada TLR4 mutasyonu bulunan ve mikroorganizmalara doğru TLR4 yanıtı veremeyen ratların gram negatif enfeksiyonlara yatkın olduğu izlenirken (68), bir başka çalışmada da TLR4 ve Myc88 bulunmayan ratların LPS'e yanıt vermedikleri (69) ve LPS enjeksiyonu sonrasında normal ratlara göre hayatta kalma oranlarının daha yüksek olduğu izlenmiştir. (70) TLR4 bulunmayan ratların hayatta kalması normal immün yanıt ve mikrobiyal tanıma için başka mekanizmaların da devreye girmiş olabileceğini ve hatta TLR4 yolu ile başlatılan aşırı inflamatuvar mediyatör salınımı inhibe edildiğinde surveyin arttığının bir kanıtı olabilmektedir. Normal immün yanıtta önemli role sahip olan TLR4 molekülünü antagonize edecek ajanlar, mikroorganizmaya karşı savunmada gereken cerrahi veya antimikrobiyal tedavi uygulandıktan sonra organ veya doku hasarına yol açabilecek aşırı immün yanıtı baskılamak için devreye sokulmalıdır. (71)

2.3 Sepsise Mikrovasküler Yanıt

Sepsiste en önemli hedef dokulardan biri mikrosirkülasyondur. Sepsis patogeneğinde mikrovasküler disfonksiyon merkezi bir noktada bulunmaktadır. Endotel hücreleri, hem normal immün yanıtta görev aldıkları için hem de aşırı proinflamatuvar mediyatör maruziyetinde disfonksiyonel hale geldikleri için normal yanıtın sepsise dönüşme sürecinde çok önemli role sahiptirler. (72) Normalde transvasküler sıvı hareketi çok sıkı bir şekilde kontrol edilir. Sepsis durumunda endotelial hasar sonucunda damar duvarındaki bariyer etkisi ortadan kalkar ve ekstravasküler aralığa sıvı kaçıışı başlar. Endotel hücresinin bariyer özelliğini kaybetmesinden hem salınan proinflamatuvar sitokinler (TNF- α gibi) hem de direkt LPS'in toksik etkisi sorumludur. (73) Sepsise ayrıca fonksiyonel kapiller sayısında azalma da eşlik etmekte ve dokuya oksijen transferi bozulmaktadır. (74) Reflektans spektrofotometre ile yapılan çeşitli çalışmalarda ciddi sepsiste toplam kapiller dansitesinde azalma ve kapiller disfonksiyon saptanmıştır. (75) Kapiller disfonksiyondan; kapiller damarlarının çevre dokudaki ödem tarafından sıkıştırılması, endotelial hücre şişmesi, kapiller lümeninin aktive lökosit, platelet ve eritrositler tarafından tıkanması sorumlu olabilmektedir. Sepsis hücreler arasındaki bağlantıları bozarak vasküler endotelde çeşitli değişikliklere neden olmaktadır. Endotelial disfonksiyon; lökositlerin litik mediyatör salgılaması, eritrositlerin normal bükülebilme özelliğini kaybetmeleri, platelet ve lökosit adezyonu ve glikokaliks yapısının yıkımı ile ilişkilidir. Ayrıca septik yanıt sırasında selektin ve hücre içi adezyon molekülü (ICAM) gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması ve ICAM-PMNL etkileşimi

transmigrasyona ve dolayısıyla bariyerlerde bozulmaya neden olmaktadır. Sepsiste izlenen panendotelyal aktivasyon neticesinde endotel hücreleri arasındaki bağlantılar zayıflamakta, hücreler arasındaki interstisyel aralık artmakta ve yaygın doku ödemi gelişmektedir. (76) Vücutta yaygın endotel disfonksiyonu, endotelyal permeabilite artışı ve interstisyel aralığa sıvı kaçıışı başta kardiovasküler sistem, santral sinir sistemi, karaciğer, böbrekler olmak üzere tüm dokuları etkilemekte, uzak doku ve organ hasarı geliştirmekte ve çoklu organ yetmezliğine gidiş sürecini başlatmaktadır. (77)

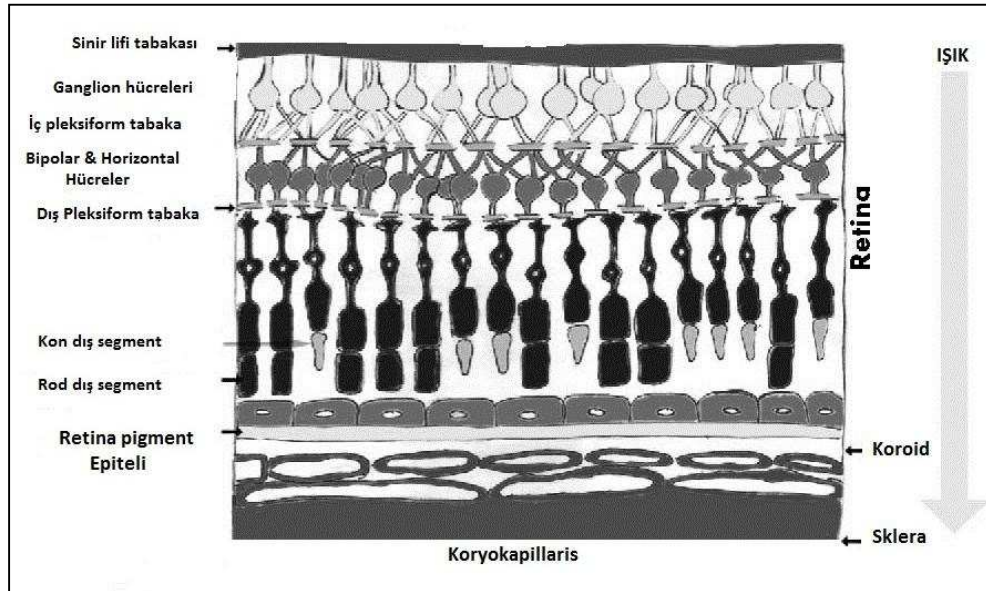
2.4 Oküler İmmünite

Göz dokusu vizyonu her durumda koruma amacıyla çeşitli mekanizmalar ile lokal immün ve inflamatuvar yanıtı sınırlandırır. Bu fenomen oküler immün korunak (*ocular immune privilege*) olarak adlandırılır ve bu sistemin gözü inflamatuvar saldırılardan korumaya yönelik olduğu düşünülse de mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. 1940' larda Sir Peter Medawar tarafından yapılan bir çalışmada yabancı bir dokunun gözün ön kamarasına yerleştirildiğinde dokunun reddedilmediği izlenmiş ve oküler immün korunak konsepti ortaya atılmıştır. Günümüze dek bu konuda pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen bu korunak mekanizması tam olarak netleşmemiştir. Bu sistem ile ilişkili çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür: 1) Fiziksel bariyerlerin varlığı: Kan oküler bariyerler (kan-retina, kan-aköz) kan yoluyla gelen granülosit, monosit, lenfosit gibi immün sistem hücrelerinin ve α -2 makroglobulin, kompleman faktörleri gibi plazma

proteinlerinin intraoküler hareketini büyük ölçüde sınırlar. 2) Efferent lenfatiklerin bulunmaması 3) Göz mikroçevresinde immünsüpresif faktörlerin varlığı: hem membrana bağlı hem de sitoplazmada çözülmüş halde bulunan immünsüpresif faktörler gözün immün korunak mekanizmasına katkıda bulunurlar. Çözülmüş faktörler arasında TGF- β , alfa melanosit stimüle edici faktör ve vazoaaktif intestinal peptid sayılabilir. TGF- β aynı zamanda membrana bağlı olarak da bulunabilmektedir. Oküler resident antijen sunucu hücrelerin in vitro deneylerde çözülmüş faktörlerin salınımı ile immün sistem hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Retina glial Müller hücreleri de bu hücre gruplarından biridir. RPE hücreleri ve iris/silier cisim epitel hücreleri de hem T hücrelerini direkt inhibe ederler hem de T regulatuar hücre yönünde farklılaşmaları için uyarıcı faktörler salgırlar. İmmün sistem inhibitörü olarak çalışan diğer membrana bağlı moleküller arasında CD86, FasL, trombospondin ve galectin sayılabilir. 4) ACAID (*Anterior chamber associated immune deviation*) : ACAID olarak adlandırılan ön kamara ile ilgili bağışık sapma ön kamaranın kendine özgül anatomik özelliklerinden kaynaklanmakta ve göz içinde oluşan bağışık yanıtın gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Oluşabilecek inflamatuar hasarı önlemek için ön kamaraya özgü normal bağışık yanıtın by-pass edilerek ön kamaradaki antijenlerin trabeküler ağ yoluyla direkt olarak kana karışması sağlanmaktadır. ACAID başlatıcı sinyal kan yoluyla dalağa ulaşmakta ve regulatuar lenfositleri uyararak sistemik immün yanıtı aktive etmektedir. Gözdeki mikroçevre by-pass edilerek lokal hasar önlenmiş olmaktadır. (78,79)

2.4.1. Retinal mikrovasküler yapı ve Kan-Retina Bariyeri (KRB)

Retina; sinir lifi tabakası, ganglion hücre tabakası, iç pleksiform tabaka, iç nükleer tabaka, dış pleksiform tabaka, dış nükleer tabaka ve fotoreseptör dış segmentleri tabakasından oluşan vitreus ile retina pigment epiteli arasında uzanan transparan nöral dokudur. (Şekil 6) Retina kanlanması santral retinal arter ve koroidal damarlar aracılığıyla RPE tabakasından difüzyon ile sağlanır. Santral retinal arter tüm retina kanlanmasının %15'ini sağlamakta ve iç retina katmanları ile optik diski beslemekte iken koroidal damarlar dolaşımının %85'ini sağlamaktadırlar. (80)



Şekil 6: Retina tabakaları ve kan retina bariyeri

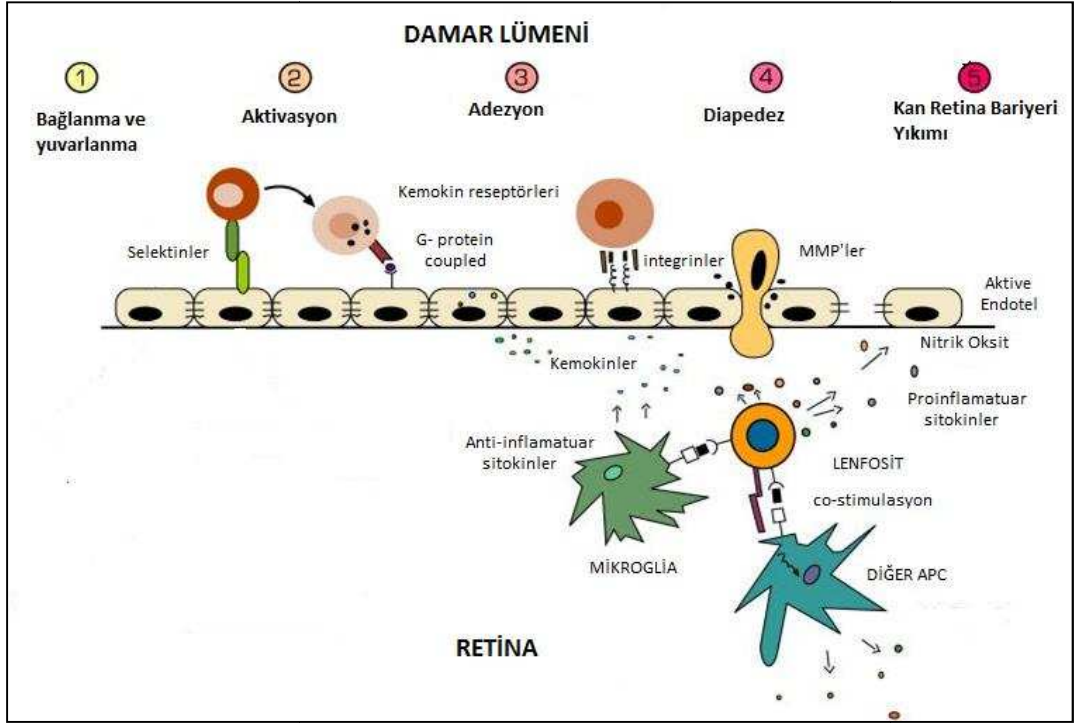
(Sharma NK, Prabhakar S, Anand A. Age related macular degeneration - advances and trends. *Annals of Neurosciences*, Volume 16, Number 2, 2009) (81)

KRB, kan beyin bariyerine benzer bir mekanizma ile nöral retinanın lokal mikroçevresini düzenleyici selektif bir bariyer vazifesi görür. KRB'nin bu fonksiyonu retina bütünlüğünü ve homeostasisini sağlama açısından hayatidir. KRB'nin dış tabakasını retina pigment epiteli oluştururken iç tabakası ise retinal kan damarlarının endoteli tarafından oluşturulur. RPE koroid ile nöroretina arasında tek sıralı pigmente hücre grubundan oluşur. RPE nöroektodermal kökenli olduğu için retinanın bir parçası olarak değerlendirilmektedir. RPE hücrelerinin apikal yüzü fotoreseptör dış segmentlerine bakarken, bazolateral kenarı ise kendisini koryokapillarisin fenestre endotelinden ayıran Bruch membranına bakar. Komşu RPE ve koryokapillaris hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar sayesinde kontrollü bir şekilde sıvı ve çözülmüş madde geçişi sağlanır ve toksik maddeler ile plazma proteinlerinin retinaya geçişi engellenir. (82) RPE'nin besin, iyon ve su transportu, ışık absorpsiyonu ve fotooksidasyona karşı koruma, vizüel siklus için önemli olan all-trans-retinal'in 11-cis-retinal'e reizomerizasyonu, dış fotoreseptör segment fagositozu, retina için esansiyel faktörlerin sekresyonu gibi görevlerinin yanı sıra KRB yapısına katılarak ve immünsüpresif faktörler salgılayarak oküler immün korunak mekanizmasına katkıda bulunduğu da gösterilmiştir. RPE hücreleri aynı zamanda MHC (*major histocompatibility complex*) molekülleri, adezyon molekülleri, FasL eksprese ederek ve sitokin cevabı oluşturarak retinanın immün yanıtı sırasında majör rol almaktadır. (83) RPE hücrelerinin inflamasyona karşı yanıt oluşturma sürecinde TLR moleküllerinin etkin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. (84, 10)

2.4.2 İnflamasyon durumunda kan retina bariyeri

Retinadaki enfeksiyöz veya immün sistem aracılı inflamasyon kan retina bariyeri olarak adlandırılan anatomik, fizyolojik ve immün regülatuar komponentleri olan bir sistem tarafından düzenlenir. Retinayı inflamatuvar yanıt sırasında immün sistemden korumak ve doku hasarını önlemeye yönelik tüm bu mekanizmalara rağmen üveoretinit, diabetik retinopati ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi hastalıkların patogenezi sırasında KRB bütünlüğü bozulmakta ve retina içine lökosit infiltrasyonu gerçekleşmekte ve doku hasarı oluşmaktadır.(11)

İnflamasyon başlatıcı bir etken varlığında endotel aktive edilmekte ve lökositler ile endotel arasında selektinlerin aracılık ettiği endotel yüzeyinde adezyon ve yuvarlanma başlamaktadır. Endotel yüzeyinde bulunan G protein aracılı reseptörler ile bağlantıya geçen lökositler aktive olarak integrin molekülleri ile endotel yüzeyine sıkı adezyon sağlarlar ve güçlü proinflamatuvar mediyatörleri salgılamaya başlarlar. Endotel hücrelerinin aktivasyonu ve salgılanan sitokin, kemokin ve matrix metalloproteinazların etkisiyle hücreler arası sıkı bağlantılar gevşemekte ve bariyer bozulmaktadır. KRB'nin bütünlüğünün bozulmasıyla aktive olan lökositler diapedez yoluyla iç retina katmanlarına doğru ilerlerler ve retina infiltrasyonu gerçekleşmiş olur. (85) Şekil 7'de inflamasyon durumunda retinaya lökosit infiltrasyonu şematize edilmiştir.



Şekil 7: İnflamasyon durumunda retinaya lökosit infiltrasyonu

(Crane JJ, Liversidge J. Mechanisms of leukocyte migration across the blood–retina barrier *Semin Immunopathol* (2008) 30:165–177 kaynağından değiştirilmiştir.) (85)

2.5 Deneysel sepsis modellerinde retinokoroidal değişiklikler

Sistemik sepsis durumunda uzak doku ve organ hasarını açıklayabilmek için literatürde pek çok farklı hayvan modeli kullanılmıştır. Bu hayvan modelleri, oküler inflamasyon modeli olarak da kullanılmış olup hastalık patogenezinin daha iyi anlaşılmasına, yeni terapötik ajanların geliştirilmesine ve test edilmesine imkan sağlamıştır.

Rosenbaum ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (12) intravenöz, intraperitoneal veya subkutan yolla gram negatif bakteri endotoksini verilen hayvanlarda bilateral oküler inflamasyon geliştiği ilk kez gösterilmiştir. Bu model endotoksin ile indüklenen üveit (EIU) modeli olarak adlandırılmıştır. EIU modeli ilk tariflendiği yayında ön kamara, iris, silier cismi tutan ön üveit modeli olarak tanımlanmış (12,13) olsa da sonradan yapılan çalışmalarda retinal ve koroidal tutulum gösterilmiştir. (14, 15) Bir çalışmada LPS enjeksiyonu sonrası 24. saatte ön ve arka segmente inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada koroidit, retinal vaskülit, vitreus hemorajileri, değişik retina katmanlarına PMNL infiltrasyonu ve fotoreseptör hücre hasarı izlenmiştir. Retina katmanları içinde yoğun PMNL ve mononükleer hücre infiltrasyonu izlenmesi inflamatuvar yanıt sırasında retina kan bariyerinin bozulduğunun bir göstergesidir. Başta TNF- α ve IL-1 olmak üzere proinflamatuvar mediyatör salınımı ile vasküler endotele PMNL migrasyonu ve adezyonu izlenmekte ve endotelial permeabilite artışı ile retinada inflamatuvar yanıt oluşmaktadır. (15)

EIU modelinde retinokoroidal değişiklikler ile ilgili yapılan başka bir çalışmada LPS enjeksiyonu sonrası 4. saatte retina kan damarları duvarına monositlerin yapışmaya başladığı 16. saatte ise damar duvarı içine monosit migrasyonu izlendiği gösterilmiştir. Bu çalışmada retinanın iç tabakalarının etkilenip dış fotoreseptör tabakasının etkilenmemiş olması ve silier cisme komşu retina alanları ile diğer alanlar arasında inflamasyon derecesi açısından fark olmaması oluşan immün yanıtın direkt LPS etkisi ile oluştuğu ve ön segment

inflamasyonundan bağımsız olduğunun göstergesi olabileceği ifade edilmiştir.
(14)

LPS enjeksiyonu sonrasında retinada izlenen inflamasyon bazı yönlerden ön segment inflamasyonundan farklılık arzeder. Retinal değişiklikler ön segment değişikliklerine göre daha geç ortaya çıkar. Retinadaki inflamasyon 48. saatte pik yaparken ön kamaradaki inflamatuvar yanıt 24. saatte en ileri düzeydedir. Bu farklılığın nedenleri arasında silier cismin fenestre kapiller yataktan daha zengin olması ve ön üveadaki makrofaj yoğunluğunun retinadan daha fazla olması sayılabilir. (86, 87)

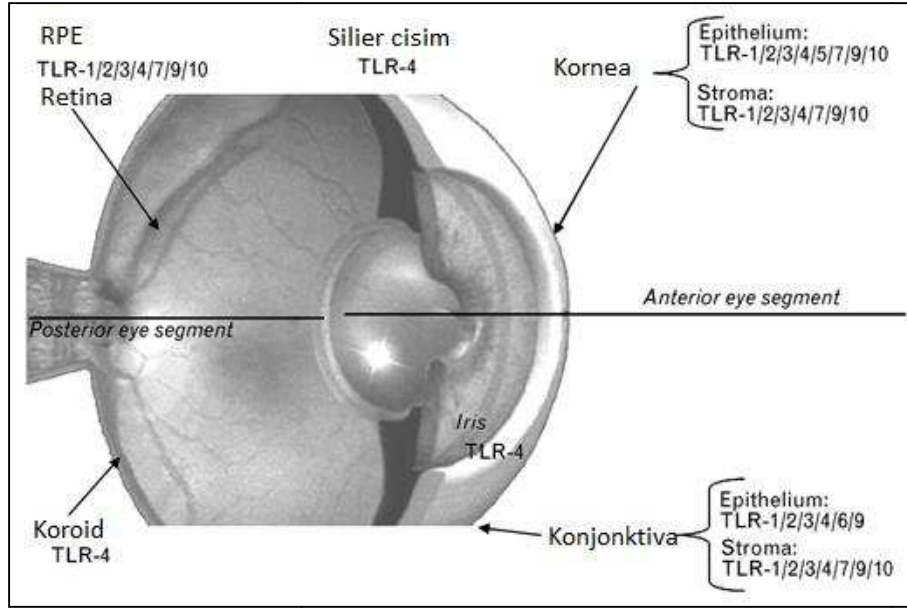
EIU modellerinde stereoanjiografi kullanılarak retinadaki mikrovasküler değişiklikler ve inflamatuvar doku hasarı ile ilgili yapılan in vivo çalışmalarda da LPS enjeksiyonu sonrasında retinal damarlarda dilatasyon, multipl segmental perivasküler sızıntılar ve doku içine lökosit infiltrasyonu izlenmiştir. (88) Başka bir in vivo çalışmada da LPS ile indüklenen oküler inflamasyon modelinde PMNL ile endotel etkileşimi çalışılmış ve endotel hasarı gösterilmiştir. (89)

EIU modeli en önemli oküler inflamasyon modellerinden biridir. EIU modelinin retina ve retinal mikrovasküler sistemde en belirleyici özellikleri damar duvarına PMNL adezyonu ve infiltrasyonu, doku içine protein ve sıvı kaçıışı ve retina hücre hasarıdır. (16) LPS tarafından indüklenen TLR yolağının son ürünü olan TNF- α , IL-1, IL-6, IL-4, adezyon molekülleri ve kemokinler gibi proinflamatuvar mediyatörlerin salınması ile dokuda inflamatuvar süreç başlatılır. Yapılan bir çalışmada LPS ile başlatılan lökosit yuvarlanması, adezyonu, doku infiltrasyonu ve retina-kan bariyeri yıkılmasında özellikle TNF- α 'nın etkili olduğu

gösterilmiştir. Ayrıca endotel hücrelerinde apoptozun indüklendiği ve bunun da vasküler sızıntıyı arttırdığı izlenmiştir. EIU modelinde retina-kan bariyerinin bozulduğu ve bu bozulmanın PMNL adezyonu, endotelyal apoptoz ve mikrovasküler hasar ile korele olduğu gösterilmiştir. (17)

2.6 İnflamatuar Göz hastalıklarının immunopatogeneğinde TLR'nin rolü

İnflamatuar göz hastalıkları oküler yüzeyden, retina, optik sinirden orbital yapılara kadar gözün herhangi bir kısmını tutabilmektedir. İnflamatuar göz hastalıkları hafif ortam opasitesinden vizyonu ciddi şekilde tehdit eden derecelere kadar farklı tutulumlar göstermektedir. Göz normalde inflamasyonun vizyon tehdit edici etkilerinden sakınmak için immün korunaklılık göstermektedir. İmmün korunak, kan-oküler bariyer ve hümor aközde immünsüpresif faktörler gibi çeşitli anatomik ve hücrel bileşenlerden oluşmaktadır. Tüm bu mekanizmalara rağmen bazı inflammatuar durumlarda bu bariyerler yıkılarak üveit, keratit gibi klinik tablolar oluşmaktadır. (90) TLR'in PMNL, monosit, makrofaj ve dendritik hücreler gibi immün sistem hücrelerinde ekspresyonu bilinmektedir. (91) TLR4 molekülünün kornea epitel hücreleri (6), korneal stromal fibroblastlar (7), silier cisim, iris endotel hücreleri (8), üveadaki resident antijen sunan hücreler (9) ve RPE'de (10) ekspresyonu edildiği gösterilmiştir. Diğer TLR tipleri ve ekspresyonu edildiği oküler dokular Şekil 8'da gösterilmektedir. (92)



Şekil 8: Göz dokularında TLR ekspresyonu

(Micera A, Stampachiacchiere B, Aronni S, dos Santos MS, Lambiase A. Toll-like receptors and the eye. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005 Oct;5(5):451-8. kaynağından değiştirilmiştir.)

Üvea:

Üveit en sık izlenen ve vizyon tehdit edici intraoküler inflamatuvar bir hastalıktır. Üveit enfeksiyöz veya non-enfeksiyöz olabilmektedir. Her iki durumda da göz dokularının mikroçevresinde mikrobiyal veya otoimmün uyarı neticesinde TLR aktivasyonu ile başlatılan ve ileri doku hasarına kadar varabilen inflamatuvar cevabı anlamak bu hastalığın patogenezini aydınlatmak ve yeni bir tedavi seçeneği sunmak açısından önemlidir. (93)

EIU modeli iyi bir insan üveit modeli olarak çalışmalarda kullanılmaktadır. TLR4 geninde nokta mutasyonu olan ve TLR4 sinyal sisteminde fonksiyon

bozukluğu olan C3H/HeJ farelerinde yapılan çalışmalarda bu farelerin LPS'e az duyarlı oldukları görülmüş ve EIU modeli oluşturulamamıştır. Böylece EIU patogenezi ile TLR4 sinyal sisteminin bağlantılı olduğu gösterilmiştir. (36) Bir başka çalışmada da üveadaki resident APC'lerin TLR4 eksprese ettiği gösterilmiştir. (9) İris ve silier cisim epitel ve endotelinde normal şartlarda TLR4 ve MD2 molekülünün eksprese edilmediği ancak kan yoluyla iletilen enfeksiyon durumlarında veya LPS enjeksiyonu sonrasında TLR4 ekspresyonunun başladığı izlenmiştir. Bu sistem gözün immün korunaklılığı ile de uyumludur. (9) İn vitro bir çalışmada da iris endotel hücrelerinin in vivo TLR4 eksprese etmediği halde LPS ile uyarılması sonucu TLR4 ekspresyonuna başladığı gösterilmiştir. (8) LPS-TLR4 bağlanması ile aktive olduklarında üveal APC'lerin perivasküler alana göç ettikleri ve proinflamatuvar sitokin salgılamaya başladıkları gösterilmiştir.

Retina:

RPE hücreleri yüksek oranda TLR2, 3 ve 4, CD14, MD2 moleküllerini eksprese etmektedir. (84) Nöral retina ile vasküler koroid arasındaki stratejik konumu nedeniyle ve kan retina bariyeri yapısına katılmasıyla RPE tabakası hasarı pek çok oküler inflamatuvar hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. (94) RPE hücreleri retinanın immün yanıtında aktif rol almakta ve stimule edildiklerinde antijen sunucu hücre gibi davranarak sitokin ve kemokin üretimine katkıda bulunmaktadır. RPE hücrelerinin aynı zamanda dış fotoreseptör segment fagositozu ile ilişkili olduğu ve bu fagositozu başlatmak için TLR4 bağlantılı hücrel sinyal sistemini kullandığı gösterilmiştir. RPE hücrelerindeki TLR4 aktivasyonunun üveit, retinokoroidit, yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi

proinflamatuvar patofizyolojik değişikliklerin eşlik ettiği farklı retina hastalıklarında rol oynadığı düşünölmüştür. (10)

RPE hücrelerinin kan-retina bariyerinde önemli immünolojik görev alması, bu hücrelerde eksprese edilen TLR fonksiyonu ile çeşitli inflamatuvar retina hastalıklarına verilen immün cevap arasında ilişki olabileceğini düşöndürmektedir. TLR eksprese eden RPE hücreleri enfeksiyöz ajan ile karşılaştığında hızla yanıt vermekte ve nörosensöriyel retina hasarına engel olmaya çalışmaktadır. Ancak kan retina bariyerinin bozulduğu durumlarda hem dolaşımdaki immün sistem hücrelerinde hem de RPE hücrelerinde inflamatuvar yanıt proinflamatuvar yöne kayarak immün yanıtta ki denge bozulmakta ve retinokoroidit tablosuna neden olan retina hücre hasarı oluşmaktadır. (93)

TLR ile ilgili araştırmalar derinleştikçe oküler immünitede ve inflamasyondaki rolü açıklığa kavuşacaktır. TLR'lerin oküler immünoloji alanında pek çok çalışmaya konu olması gibi korneal transplantasyon ve intraoküler tümör patogenezi ile de ilgili olabileceği düşünölmektedir. Vizyonu koruma amaçlı gözde normalde bulunan immün korunak sisteminin inflamatuvar bir atakta nasıl bir moleküler mekanizma ile bozulduğu net olarak bilinmemektedir. Mikrobiyal ajan veya PAMP ile TLR etkileşiminin gözde inflamatuvar süreci başlatan kritik bir nokta olduğu ve bu etkileşimin aydınlatılmasının oküler inflamatuvar hastalıklarının tanı ve tedavisinde yol gösterici olabileceği düşünölmektedir. (93)

3. MATERYEL- METOD

Bu çalışmada 8 haftalık ortalama ağırlıkları 240-310 gram arasında değişen 50 adet Wistar-albino erkek rat kullanılmıştır. Ratlar standart kafeslere 2 rat bir kafeste olacak şekilde konularak standart laboratuvar şartları sağlanmıştır. (22⁰C, %40-60 nem, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü). Hayvanlar Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden elde edilmiş olup çalışma da yine aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Etik kurul onayı Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Sepsis modeli intraperitoneal olarak 1.5 mg/kg lipopolisakkarid (LPS) (Sigma-Aldrich, Germany) enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. TLR-4 antagonisti olarak eritoran (E5564, Onicon Chemical Co, China) kullanılmıştır.

100 mg/kg ketaminin (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) intramüsküler verilmesi ile oluşturulan anesteziyi takiben biyokimyasal parametreler için vena cavadan 4-5 ml kan örneği alınmıştır. Takiben konjonktiva açılıp, kaslar ekarte edildikten sonra göz nazikçe öne çekilip optik sinir çok kısa güdük kalmayacak şekilde kesilerek enükleasyon yapıldıktan sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Her grupta 10 hayvan olmak üzere hayvanlar 5 grupta incelenmiştir:

Grup I (sham): Sepsis oluşturulmayan ve tedavi edilmeyen ancak enükleasyon yapılarak bazı değerlerin alındığı grup.

Grup II (12. saat kontrol grubu=12KG): Sepsis oluşturulmak üzere verilen LPS ile eş zamanlı olarak 0.5 mg/kg serum fizyolojik solüsyonunun kuyruk veninden

intravenöz olarak verildiği grup. 12. saatte kan örneği alınmış ve enükleasyon yapılmıştır.

Grup III (24. saat kontrol grubu=24KG): Sepsis oluşturulmak üzere verilen LPS ile eş zamanlı olarak 0.5 mg/kg serum fizyolojik solüsyonunun kuyruk veninden intravenöz olarak verildiği grup. 24. saatte kan örneği alınmış ve enükleasyon yapılmıştır.

Grup IV (12. saat çalışma grubu=12ÇG): Sepsis oluşturulmak üzere verilen LPS ile eş zamanlı olarak 0.5 mg/kg E5564'ün kuyruk veni kullanılarak intravenöz olarak verildiği grup. 12. saatte kan örneği alınmış ve enükleasyon yapılmıştır.

Grup V (24. saat çalışma grubu=24ÇG): Sepsis oluşturulmak üzere verilen LPS ile eş zamanlı olarak 0.5 mg/kg E5564'ün kuyruk veni kullanılarak intravenöz olarak verildiği grup. 24. saatte kan örneği alınmış ve enükleasyon yapılmıştır.

Her ratın her iki gözü de çalışmaya dahil edilmiştir. Bir gözde histopatolojik değerlendirme yapılırken, diğer göz de retinokoroidal dokuda TNF- α , MDA ve NF κ B ölçümleri için kullanılmıştır. Ratlardan Serum TNF- α (pg/ml), retinokoroidal dokuda TNF- α (ng/mg protein), Serum MDA (U/ml), retinokoroidal dokuda MDA (U/ml) ve yine retinokoroidal dokuda NF κ B (ng/mg protein) değerleri elde edilmiştir. Kan örneğinde TNF- α ve MDA düzeyleri ELİSA yöntemi ile çalışılmıştır. Retinokoroidal dokuda homojenizasyon sonrasında; TNF- α , MDA ve NF κ B ölçümü hazır kit kullanılarak ELİSA yöntemi ile yapılmıştır.

Retinadaki mikrovasküler ve parankimal hasarı ortaya koymak için histopatolojik inceleme hemotoksilen-eozin ile boyanarak değerlendirilmiş ve aşağıdaki skora göre skorlanmıştır:

Grade 0= Minimal (minimal hücre infiltrasyonu, pigment bozukluğu veya minimal dejenerasyon)

Grade 1= Zayıf (anterior retinada hücre infiltrasyonu ve iç limitan membranda kalınlaşma)

Grade 2 = Orta (retinada ileri hücre infiltrasyonu, retinal foldlar)

Grade 3 = Kuvvetli (belirgin retina dejenerasyonu)

Grade 4 = Çok kuvvetli (retinal doku izlenmiyor)

Bu ölçülen parametreler ile inflamasyona sekonder retinokoroidal hasarın değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma düzenine 12. ve 24. saat olarak iki grubun ilave edilmiş olmasının nedeni sistemik sepsisin zamanla retinokoroidal dokuda nasıl etki oluşturduğunu izlemek ve eritoranın zamana bağlı olarak etkinliğinin değişimini ortaya koymaktır.

Çalışma Deseni: Çalışma, prospektif randomize kontrollü hayvan deneyi olarak planlanmıştır. Ratların çalışma gruplarına atamasında Mahmood Saghaei tarafından geliştirilen Random Allocation Software (Ver. 1.0.0 © Mahmood Saghaei, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, msaghaei@yahoo.com, BMC Med Res Methodol. 2004; 4: 26) paket programı kullanılarak yapıldı.

Örneklem Büyüklüğü ve Güç: Çalışma için gereken örneklem büyüklüğü ve güç hesaplaması G*Power (Ver. 3.0.10, Franz FAUL, Universität Keil, Germany, www.psych.uni-duesseldorf.de/aap/projects/gpower/) programı ile yapıldı. Çalışmadan % 80 güç elde edebilmek için $f=0.30$ etki genişliğinde, $\alpha=0.05$ Tip I hata ve $\beta=0.20$ Tip II hata oranları ile 3 grupta 2 tekrar için her grupta her tekrar için en az 10 rat alınması gerektiği hesaplandı. Çalışma 10'u sham, 20'si kontrol ve 20'si de deney grubunda olmak üzere toplam 50 rat ile yürütüldü.

İstatistiksel Analizler:

Deneysel çalışma kapsamında 3 farklı gruptan 12. ve 24. saatte ölçülen serum ve doku TNF- α , serum ve doku MDA ve NF κ B değerlerinin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Serum TNF- α ve Doku MDA ölçümlerinin hem 12 hem de 24 saat değerlerinin normal dağılıma uydıkları, diğer ölçümlerin ise normal dağılıma uymadıkları görüldü. Tanımlayıcı istatistiklerin gösteriminde en küçük ve en büyük değer yanında normal dağılıma bağlı olarak ortalama \pm standart sapma (SS) ya da ortanca (Çeyreklikler Arası Genişlik, Interquartile Range – IQR) kullanıldı. 12. ve 24. saat ölçüm değerlerinin çalışma gruplarına göre karşılaştırılmasında Serum TNF- α ve Doku MDA için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc ikili karşılaştırmalar için ise Bonferroni testi kullanıldı. Diğer ölçüm değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması için ise ANOVA'nın non-parametrik karşılığı olan Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi uygulandı. Farklılık bulunduğu farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirleyebilmek amacı ile post-hoc ikili

karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testine başvuruldu. Çalışma gruplarına göre ölçüm değerlerindeki 12. saat – 24. saat değişimini incelemek amacı ile Serum TNF- α ve Doku MDA için paired sample t testi, diğer ölçüm değerleri için ise Wilcoxon işaretli sıralar testi uygulandı. Histopatoloji sonuçlarını değerlendirmek amacı ile ki-kare likelihood ratio (olabilirlik oranı) hesaplandı. Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar MS-Excel 2003 ve SPSS for Win. Ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programları ile yapıldı. İstatistiksel kararlarda $p \leq 0.05$ düzeyi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Serum ve Doku TNF- α , Serum ve Doku MDA ve NF κ B Sonuçları

Çalışma başlangıcında normal ratların (Sham) değerlerini belirleyebilmek amacı ile 10 rattan Serum TNF- α , Doku TNF- α , Serum MDA, Doku MDA ve NF κ B değerleri elde edildi (Tablo 5).

Tablo 5: Sham grubu TNF- α , MDA ve NF κ B değerleri

Değişken	En Az	En Çok	Ortalama \pm SD
			Ortanca (IQR)
Serum TNF- α (pg/ml)	15.00	24.00	19.90 \pm 2.89
Doku TNF- α (ng/mg protein)	0.30	1.00	0.75 (0.43)
Serum MDA (U/ml)	8.00	8.00	8.00 (0.00)
Doku MDA (U/ml)	7.70	12.10	9.94 \pm 1.71
NF κ B (ng/mg protein)	0.27	0.32	0.30 (0.02)

4.1.1 12. saatte Serum ve Doku TNF- α , Serum ve Doku MDA ve NF κ B değerlendirilmesi

Çalışmanın 12. saatinde Kontrol ve Deney grubu ratlardan elde edilen değerler Tablo 6'da, çalışma başlangıcındaki Sham grubu değerleri ile birlikte Şekil 9-13'de gösterilmiştir.

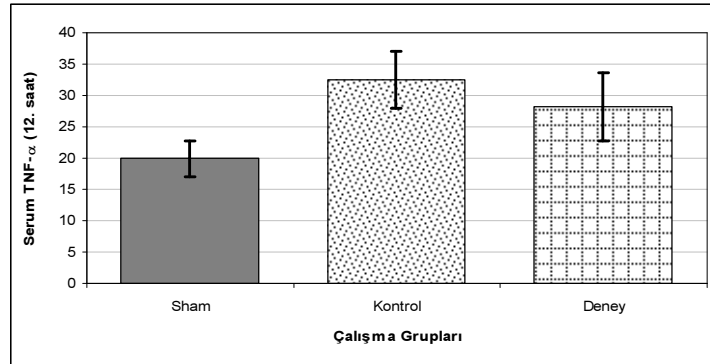
Tablo 6: Çalışmanın 12. saatinde Kontrol ve Deney grubu değerleri

		Ortalama\pmSD		
Değişken		En Az	En Çok	Ortanca (IQR)
Serum TNF- α	Kontrol	25.00	39.00	32.50 \pm 4.48
	Deney	19.00	36.00	28.20 \pm 5.43
Doku TNF- α	Kontrol	1.90	2.70	2.15 (0.53)
	Deney	1.70	2.40	2.15 (0.33)
Serum MDA	Kontrol	14.00	25.00	17.50 (5.50)
	Deney	11.00	20.00	15.50 (4.75)
Doku MDA	Kontrol	20.00	34.00	24.50 \pm 6.75
	Deney	16.00	30.00	22.50 \pm 4.62
NF κ B	Kontrol	0.32	0.77	0.38 (0.03)
	Deney	0.28	0.37	0.34 (0.05)

Şekil 9-13 hazırlanırken Sham grubundaki ratların çalışma başlangıcındaki değerlerinin çalışmanın 12. saatinde de değişmeyeceği kabul edilmiştir.

4.1.1.1 12. saatte Serum TNF- α

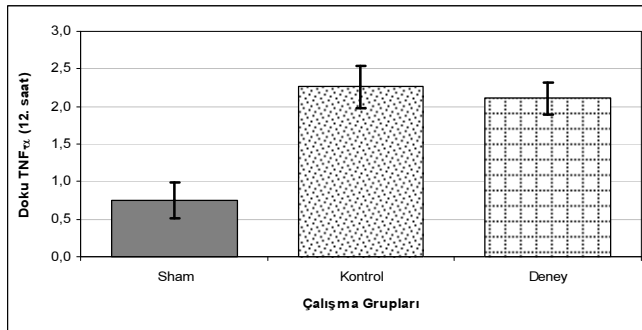
12. saat Serum TNF- α ortalamaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklılık göstermektedir (F=21.260; p<0.001). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki 12.60 birimlik fark istatistiksel olarak da anlamlıdır (p<0.001). Sham ve Deney grubu arasındaki 8.30 birimlik farklılık da istatistiksel olarak önemlidir (p=0.001). Kontrol ve Deney grubu arasındaki 4.30 birimlik farklılık ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.112). Serum TNF- α 12. saat ortalamaları büyükten küçüğe; Kontrol, Deney ve Sham grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 9). Deney hayvanlarında sepsis modeli tam olarak oluşmuştur. Sepsis modeli oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan Kontrol grubundaki ratlarda TNF- α ortalaması tedavi gören Deney grubundan daha yüksektir. Çalışmanın 12. saatinde tedavi gören deney grubunda tedavinin etkileri gözlenmeye başlamış ve TNF- α değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Ancak etkiler istatistiksel olarak anlamlı olmaya yeterli olacak kadar belirgin değildir.



Şekil 9: Çalışma gruplarına göre 12. saat Serum TNF- α ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte)

4.1.1.2 12. saatte Doku TNF- α

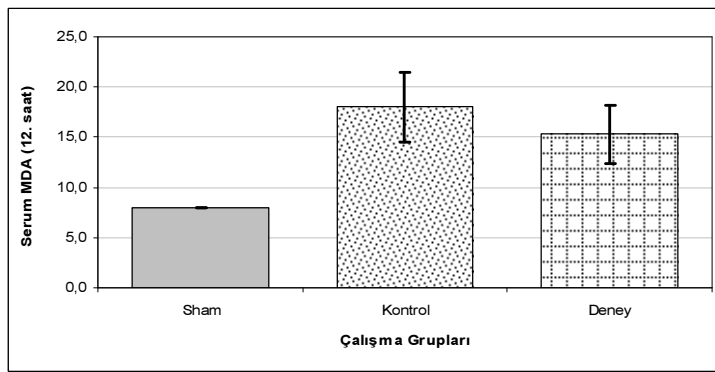
12. saat Doku TNF- α ortancaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklılık göstermektedir ($\chi^2=14.372$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlıdır ($Z=3.791$; $p<0.001$). Sham ve Deney grubu arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemlidir ($Z=3.791$; $p<0.001$). Kontrol ve Deney grubu arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($Z=0.952$; $p=0.353$). Doku TNF- α 12. saat ortancaları büyükten küçüğe; Kontrol, Deney ve Sham grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 10). Doku TNF- α değerlerinin Kontrol grubunda Sham grubuna göre yüksek olması deney hayvanlarında sepsis modelinin tam olarak oluştuğunu desteklemektedir. Sepsis modeli oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan Kontrol grubundaki ratlarda Doku TNF- α ortalaması tedavi gören Deney grubundan daha yüksektir. Çalışmanın 12. saatinde tedavi gören deney grubunda tedavinin etkileri gözlenmeye başlamış ve Doku TNF- α değerlerinde düşüş gözlenmiştir.



Şekil 10: Çalışma gruplarına göre 12. saat Doku TNF- α ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte)

4.1.1.3 12. saatte Serum MDA

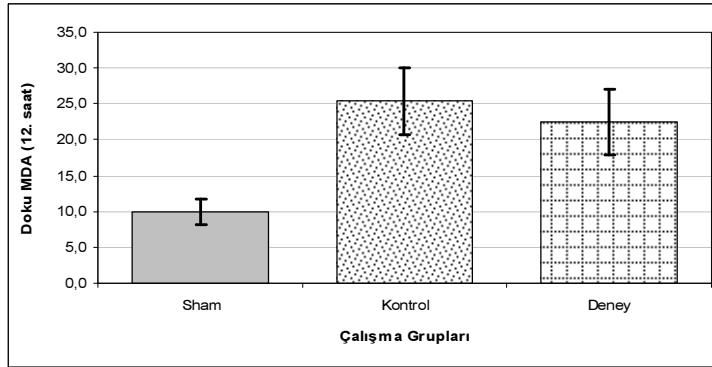
12. saat Serum MDA ortancaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklılık göstermektedir ($\chi^2=16.337$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlıdır ($Z=4.042$; $p<0.001$). Sham ve Deney grubu arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemlidir ($Z=4.040$; $p<0.001$). Kontrol ve Deney grubu arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($Z=1.633$; $p=0.105$). Serum MDA 12. saat ortancaları büyükten küçüğe; Kontrol, Deney ve Sham grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 11). Sepsis oluşturulan ancak tedavi almayan Kontrol grubundaki ratlarda serum MDA değerleri yine sepsis oluşturulan ve tedavi edilen Deney grubundaki ratlara göre bir miktar daha yüksektir ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı olamayacak kadar azdır.



Şekil 11: Çalışma gruplarına göre 12. saat Serum MDA ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte) (Sham grubunda standart sapma yoktur)

4.1.1.4 12. saatte Doku MDA

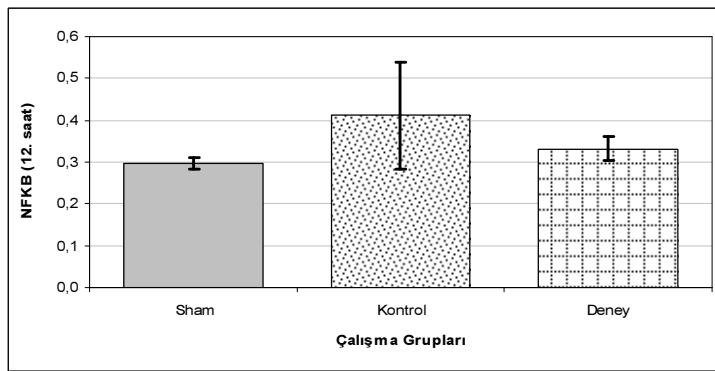
12. saat Doku MDA ortalamaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($F=43.494$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki 15.46 birimlik fark istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p<0.001$). Sham ve Deney grubu arasındaki 12.56 birimlik farklılık da istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$). Kontrol ve Deney grubu arasındaki 2.90 birimlik farklılık ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.334$) (Şekil 12). Serum MDA değerlerinde olduğu gibi doku MDA değerlerinde de tedavi gören deney grubundaki ratların ortancaları kontrol grubundaki ratlardan daha düşüktür, ancak bu farklılık istatistiksel olarak önemli olamayacak kadar azdır.



Şekil 12: Çalışma gruplarına göre 12. saat Doku MDA ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte)

4.1.1.5 12. saatte NFκB

12. saat NFκB ortancaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklılık göstermektedir ($\chi^2=14.307$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlıdır ($Z=3.782$; $p<0.001$). Sham ve Deney grubu arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemlidir ($Z=3.782$; $p<0.001$). Kontrol ve Deney grubu arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($Z=1.293$; $p=0.218$). NFκB 12. saat ortancaları büyükten küçüğe; Kontrol, Deney ve Sham grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 13). Serum ve Doku TNF- α değerleri ile yine serum ve doku MDA değerlerine benzer şekilde sepsis oluşturulan ancak tedavi edilmeyen kontrol grubundaki ratların NFκB ortancaları tedavi gören deney grubundaki ratlara göre daha yüksek olmasına karşın aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı olmaya yeterli değildir.



Şekil 13: Çalışma gruplarına göre 12. saat NFκB ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte)

4.1.2 24. saatte Serum ve Doku TNF- α , Serum ve Doku MDA ve NF κ B değerlendirilmesi

Çalışmanın 24. saatinde Kontrol ve Deney grubu ratlardan elde edilen değerler Tablo 7’de, Sham grubu değerleri ile birlikte Şekil 14–18’de gösterilmiştir.

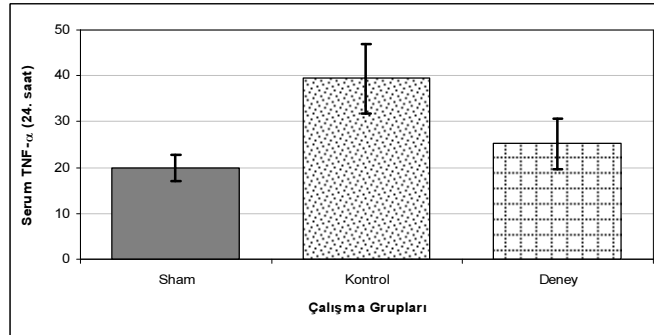
Tablo 7: Çalışmanın 24. saatinde Kontrol ve Deney grubu değerleri

Değişken		En Az	En Çok	Ortalama \pm SD
				Ortanca (IQR)
Serum TNF- α	Kontrol	22.0	48.00	39.40 \pm 7.55
	Deney	15.00	34.00	25.20 \pm 5.59
Doku TNF- α	Kontrol	2.20	3.60	2.90 (0.80)
	Deney	1.40	2.90	1.95 (0.43)
Serum MDA	Kontrol	24.00	35.00	29.00 (6.00)
	Deney	8.00	18.00	13.00 (4.25)
Doku MDA	Kontrol	21.00	37.00	28.40 \pm 4.74
	Deney	15.00	27.00	20.00 \pm 3.80
NF κ B	Kontrol	0.35	0.46	0.41 (0.04)
	Deney	0.24	0.36	0.31 (0.05)

Şekil 14–18 hazırlanırken Şekil 9–13’de olduğu gibi Sham grubundaki ratların çalışma başlangıcındaki değerlerinin çalışmanın 24. saatinde de değişmeyeceği kabul edilmiştir.

4.1.2.1 24. Saatte Serum TNF- α

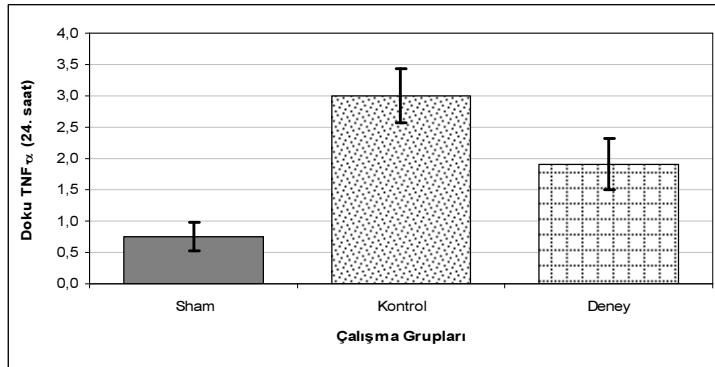
24. saat Serum TNF- α ortalamaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklılık göstermektedir (F=31.591; p<0.001). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki 19.50 birimlik fark istatistiksel olarak da anlamlıdır (p<0.001). Sham ve Deney grubu arasındaki 5.30 birimlik farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.139). Kontrol ve Deney grubu arasındaki 14.20 birimlik farklılık istatistiksel olarak da önemlidir (p<0.001). Serum TNF- α 24. saat ortalamaları büyükten küçüğe; Kontrol, Deney ve Sham grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 14). Sepsis oluşturulan ve tedavi edilmeyen Kontrol grubunda ölçülen Serum TNF- α değerleri tedavi edilen Deney grubundan istatistiksel olarak da anlamlı miktarda daha yüksektir. Uygulanan tedavi Serum TNF- α değerini azaltma yönünde işe yaramaktadır. Tedavi sonrası Serum TNF- α değerleri sepsis oluşturulmayan Sham grubundan istatistiksel olarak farklı değildir. Tedavi Serum TNF- α değerlerini normale döndürme konusunda başarılıdır.



Şekil 14: Çalışma gruplarına göre 24. saat Serum TNF- α ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte)

4.1.2.2 24. saatte Doku TNF- α

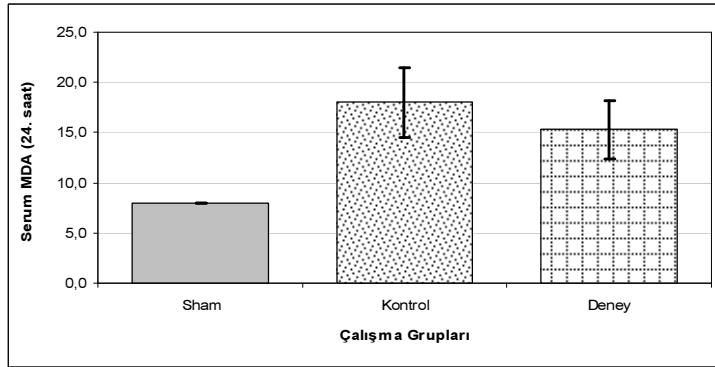
24. saat Doku TNF- α ortancaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklılık göstermektedir ($\chi^2=24.847$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlıdır ($Z=3.795$; $p<0.001$). Sham ve Deney grubu arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemlidir ($Z=3.801$; $p<0.001$). Kontrol ve Deney grubu arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlıdır ($Z=3.468$; $p<0.001$). Doku TNF- α 24. saat ortancaları büyükten küçüğe; Kontrol, Deney ve Sham grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Doku TNF- α değerleri çalışma gruplarının her birinde diğerlerinden farklı bulunmuştur. Sağlıklı ratlar (Sham) en düşük doku TNF- α değerlerine sahipken, sepsis oluşturulan ancak tedavi edilmeyen (Kontrol) ratlarda doku TNF- α değerleri en yüksek düzeydedir. Sepsis oluşturulan ve tedavi edilen (Deney) gruptaki ratlarda doku TNF- α değerleri Sham grubuna göre halen yüksek olmasına karşın Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda daha düşüktür.



Şekil 15: Çalışma gruplarına göre 24. saat Doku TNF- α ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte)

4.1.2.3 24. saatte Serum MDA

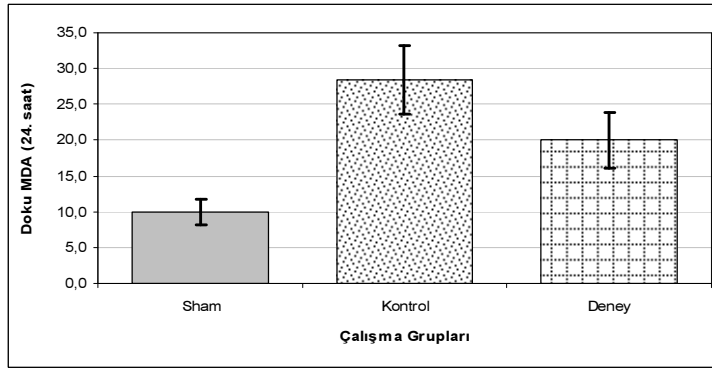
24. saat Serum MDA ortancaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklılık göstermektedir ($\chi^2=25.888$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlıdır ($Z=4.040$; $p<0.001$). Sham ve Deney grubu arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemlidir ($Z=3.734$; $p<0.001$). Kontrol ve Deney grubu arasındaki farklılıklar da istatistiksel olarak önemlidir ($Z=3.790$; $p<0.001$). Serum MDA 24. saat ortancaları büyükten küçüğe; Kontrol, Deney ve Sham grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 16). Sepsis oluşturulan ve tedavi edilen Deney grubundaki ratların serum MDA değerleri Kontrol grubuna göre daha düşük olmasına karşın halen sağlıklı ratlara göre daha yüksektir.



Şekil 16: Çalışma gruplarına göre 24. saat Serum MDA ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte) (Sham grubunda standart sapma sıfırdır)

4.1.2.4 24. saatte Doku MDA

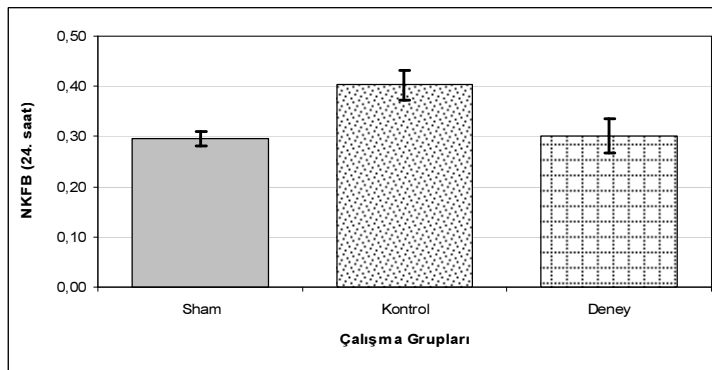
24. saat Doku MDA ortalamaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($F=64.298$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki 18.46 birimlik fark istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p<0.001$). Sham ve Deney grubu arasındaki 10.06 birimlik farklılık da istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$). Kontrol ve Deney grubu arasındaki 8.40 birimlik farklılık da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$) (Şekil 17). 24. saat doku MDA değerleri büyükten küçüğe doğru Kontrol, Deney ve Sham grupları olarak sıralanabilir.



Şekil 17: Çalışma gruplarına göre 24. saat Doku MDA ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte)

4.1.2.5 24. saat NFκB

24. saat NFκB ortancaları çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklılık göstermektedir ($\chi^2=19.408$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde; Sham ve Kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlıdır ($Z=3.800$; $p<0.001$). Sham ve Deney grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli değildir ($Z=0.655$; $p=0.529$). Kontrol ve Deney grubu arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlıdır ($Z=3.717$; $p<0.001$). NFκB 24. saat ortancaları büyükten küçüğe; Kontrol, Deney ve Sham grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 18). Sepsis oluşturulan ratlardan tedavi edilenlerin 24. saat NFκB değerleri Sham grubu ratlardan istatistiksel olarak farksız duruma gelmiştir. Uygulanan tedavi sepsise bağlı NFκB değerlerini normale döndürme yönünde 24 saatte bile etkili sonuçlar vermektedir.



Şekil 18: Çalışma gruplarına göre 24. saat NFκB ortalamaları (standart sapmalar ile birlikte)

4.1.3 12. saat ve 24. saat Serum ve Doku TNF- α , Serum ve Doku MDA ve NF κ B değerlerinin karşılaştırılması

Deney grupları arasındaki 12. saat – 24. saat farklılıkları araştırıldı. Sonuçlar Tablo 8’de gösterilmiştir. Tablo 8 incelendiğinde; Serum ve Doku TNF- α değerlerinde 12. saat – 24. saat farklılığının Kontrol grubunda önemli olduğu (sırasıyla $Z=3.427$; $p=0.008$ ve $Z=2.844$; $p=0.004$), Deney grubunda ise anlamlı olmadığı ($p>0.05$) görülmektedir. Kontrol grubunda Serum ve Doku TNF- α değerleri 24. saatte 12. saate göre artış göstermektedir ve bu artış istatistiksel olarak da anlamlıdır. Deney grubunda ise Serum ve Doku TNF- α değerleri 24. saatte 12. saate göre azalmış olmasına karşın gözlenen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Serum ve Doku MDA ölçümleri Kontrol grubunda 24. saatte 12. saate göre istatistiksel olarak da anlamlı miktarda yükselirken, deney grubunda 24. saatte 12. saate göre istatistiksel olarak da anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Sepsis tedavisi Serum ve Doku MDA değerini 24 saat içerisinde düşürmeye başlamıştır.

NF κ B ölçümleri incelendiğinde Kontrol grubunda 24. saatte 12. saate göre bir miktar artış olmasına karşın bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmayacak kadar azdır. Sepsis tedavisi uygulanan Deney grubunda ise 12. saatten 24. saate geçilirken istatistiksel olarak da anlamlı miktarda NF κ B değeri düşüşü gözlenmiştir.

Tablo 8: Çalışma gruplarına göre 12. ve 24. saat değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Değişkenler	SHAM	KONTROL			DENEY		
		12. Saat	24. Saat	Test İstatistiği	12. Saat	24. Saat	Test İstatistiği
	Ortalama±SS	Ortalama±SS	Ortalama±SS		Ortalama±SS	Ortalama±SS	
	Ortanca (IQR)	Ortanca (IQR)	Ortanca (IQR)	Z / t (p)*	Ortanca (IQR)	Ortanca (IQR)	Z / t (p)*
Serum TNF- α	19.90±2.88	32.50±4.48	39.40±7.55	t=3.427 (0.008)	28.20±5.43	25.20±5.59	t=2.065 (0.069)
Doku TNF- α	0.75 (0.43)	2.15 (0.53)	2.90 (0.80)	Z=2.844 (0.004)	2.15 (0.33)	1.95 (0.43)	Z=1.903 (0.057)
Serum MDA	8.0 (0.0)	17.50 (5.50)	29.00 (6.00)	Z=2.911 (0.004)	15.50 (4.75)	13.00 (4.25)	Z=2.676 (0.007)
Doku MDA	9.94±1.71	25.40±4.72	28.40±4.74	t=3.947 (0.003)	22.50±4.62	20.00±3.80	t=4.160 (0.002)
NF κ B	0.30 (0.02)	0.38 (0.03)	0.41 (0.04)	Z=1.794 (0.073)	0.34 (0.05)	0.31 8 (0.05)	Z=2.722 (0.006)

* Z: Wilcoxon işaretli sıralar test sonucu

t: Paired sample t test sonucu

4.2 Histopatoloji Sonuçları

Deney ve kontrol grubundaki ratlardan alınan retina örnekleri hemotoksilen-eozin ile boyanarak preparatlar hazırlandı ve histopatolojik olarak incelendi ve retina hasarı skorlandı.

Çalışma gruplarındaki ratların retinaları çalışmanın 12. ve 24. saatinde histopatolojik olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonuçları Tablo 9'de gösterilmiştir.

Tablo 9: Deney ve kontrol gruplarında retina histopatoloji sonuçları

Takip Zamanı	Histopatoloji Sonucu		Kontrol	Deney	Toplam
12. Saat	Minimal	n (%)	7 (70.0)	9 (90.0)	16 (80.0)
	Zayıf	n (%)	3 (30.0)	1 (10.0)	4 (20.0)
	Orta	n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Kuvvetli	n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Çok Kuvvetli	n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Toplam	n (%)	10 (100.0)	10 (100.0)	20 (100.0)
24. Saat	Minimal	n (%)	0 (00.0)	6 (60.0)	6 (30.0)
	Zayıf	n (%)	9 (90.0)	4 (40.0)	13 (65.0)
	Orta	n (%)	1 (10.0)	0 (0.0)	1 (5.0)
	Kuvvetli	n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Çok Kuvvetli	n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Toplam	n (%)	10 (100.0)	10 (100.0)	20 (100.0)

Tablo 9'a göre; sepsis oluşturulup tedavi uygulanmayan kontrol ve tedavi uygulanan deney gruplarında çalışmanın 12. saatinde "Orta" ya da daha üzerinde histopatolojik olarak sınıflanan retina örneği yoktur. Çalışmanın 24. saatinde ise deney grubundaki ratların 3'ünde Minimal'den Zayıf'a geçiş gözlenirken, kontrol grubunda Minimal grubundaki ratların tamamı zayıf ve orta histopatolojik sonuçlarına dönüşmüştür. Kontrol grubunda 24. saatte histopatoloji sonucu kötüleşmeye başlamıştır.

Histopatoloji sonucu “Minimal” olanlar “Etkilenmemiş”, “Zayıf” ve daha yüksek olanlar ise birleştirilerek “Etkilenmiş” olarak yeniden kodlandı. Yapılan yeni kodlama sonucunda çalışma gruplarında 12. ve 24. saat retina histopatoloji sonuçları Tablo 10’daki biçimde oluşmuştur.

Tablo 10: Deney ve kontrol gruplarında retina histopatoloji (kodlanmış) sonuçları

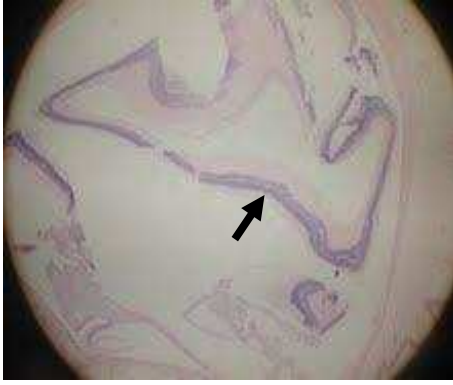
Takip Zamanı	Histopatoloji Sonucu		Kontrol	Deney	Toplam	χ^2	p
12. Saat	Etkilenmemiş	n (%)	7 (70.0)	9 (90.0)	16 (80.0)	1.297	0.255
	Etkilenmiş	n (%)	3 (30.0)	1 (10.0)	4 (40.0)		
24. Saat	Etkilenmemiş	n (%)	0 (0.0)	6 (60.0)	6 (30.0)	10.974	0.001 *
	Etkilenmiş	n (%)	10 (100.0)	4 (40.0)	14 (70.0)		

χ^2 : Ki-kare Likelihood ratio değeridir * İstatistiksel olarak anlamlı farklılık

Tablo 10 incelendiğinde; 12. saat retina histopatoloji sonuçlarının Kontrol ve Deney grupları arasında istatistiksel olarak farksız olduğu, 24. saate gelindiğinde ise sepsis kaynaklı kötüleşmenin tedavi almayan kontrol grubunda çok daha belirgin hale geldiği görülmektedir. 24. saatte kontrol grubundaki ratların tamamında sepsis retinayı etkilemişken, tedavi uygulanan deney grubunda ratların yarısından fazlası (n=6; % 60.0) “Etkilenmemiş” olarak kalmaya devam

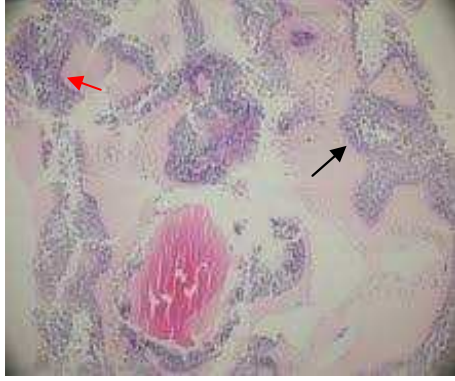
etmektedir. Retina histopatoloji sonuçları 24. saatte çalışma grupları arasında istatistiksel olarak da anlamlı miktarda farklıdır ($\chi^2=10.974$; $p=0.001$).

Sepsis oluşturulmayan ve tedavi edilmeyen, baz değerlerin alındığı grup 1'e ait (sham) bir histopatolojik görünüm Resim 1'de izlenmektedir. Normal retina yapısı siyah okla işaret edilen kısımda gösterilmektedir.



Resim 1: Grup 1 (Sham); Normal retina görüntüsü (siyah ok)

Resim 2'de sepsis oluşturulan ancak sepsis oluşturulmak üzere verilen LPS ile eş zamanlı olarak 0.5 mg/kg serum fizyolojik verilen 12. saat kontrol grubuna ait bir kesit izlenmektedir. Çalışmanın 12. saatinde retinal histopatolojik skorlama sistemi ile skorlandığında 7 rat Grade 0 (minimal) tutulum gösterirken, 3 rat Grade 1 tutulum (zayıf) göstermektedir. Resim 2'de anterior retinada belirgin retina infiltrasyonu (siyah ok) ve iç limitan membranda kalınlaşma (kırmızı ok) ile karakterize Grade 1 tutulum görülmektedir.



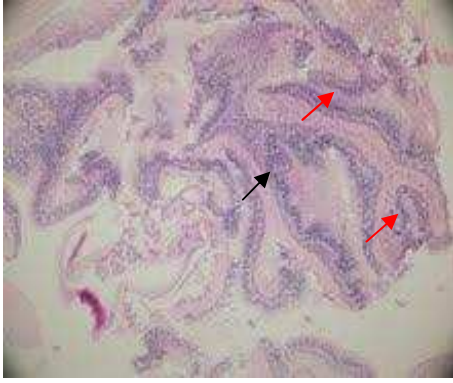
Resim 2: Grup 2; Anterior retinada belirgin retina infiltrasyonu (siyah ok) ve iç limitan membranda kalınlaşma (kırmızı ok) (Grade 1 tutulum)

Resim 3'te ise sepsis oluşturulan ve LPS ile eş zamanlı olarak 0.5 mg/kg Eritoran verilen 12. saat çalışma grubuna ait bir histopatolojik görüntü izlenmektedir. Çalışmanın 12. saatinde tedavi verilen grupta 9 ratta Grade 0, 1 ratta ise Grade 1 tutulum izlenmektedir. Tedavi sonrasında retina generalize yapısı sham grubuna benzer olmakla birlikte, Resim 3'te retinada birkaç infiltran hücre ve pigmentte minimal bozulma (siyah ok) ile karakterize Grade 0 tutulum görülmektedir.



Resim 3: Grup 4; retinada birkaç infiltran hücre ve pigmentte minimal bozulma (siyah ok) (Grade 0 tutulum)

Resim 4’de sepsis oluşturulan ancak sepsis oluşturulmak üzere verilen LPS ile eş zamanlı olarak 0.5 mg/kg serum fizyolojik verilen 24. saat kontrol grubuna ait bir kesit izlenmektedir. Çalışmanın 24. saatinde retinadaki histopatolojik tutulumun kötüleştiği izlenmekte ve 9 rat Grade 1, 1 rat ise Grade 2 tutulum sergilemektedir. Resim 4’te retinada belirgin infiltrasyon (siyah ok) ve retinal foldlar (kırmızı oklar) ile karakterize Grade 2 tutulum izlenmektedir.



Resim 4: Grup 3; Retinada belirgin infiltrasyon (siyah ok) ve retinal foldlar (kırmızı oklar) (Grade 2 tutulum)

Resim 5’te ise sepsis oluşturulduktan sonra 0.5 mg/kg Eritoran verilen 24. saat çalışma grubuna ait bir histopatolojik görüntü izlenmektedir. Çalışmanın 24. Saatinde tedavi ile retinal tutulumun hafiflediği izlenmekte ve 6 rat Grade 0 , 4 rat ise Grade 1 tutulum göstermektedir. Resim 5’te retinada birkaç infiltran hücre ve pigmentte minimal bozulma (siyah ok) ile karakterize Grade 0 tutulum izlenmektedir.



Resim 5: Grup 5; retinada birkaç infiltran hücre ve pigmentte minimal bozulma (siyah ok) (Grade 0 tutulum)

5. TARTIŞMA

Sepsis, gelişen tedavi yöntemlerine karşın yüksek mortalite ile seyreden bir hastalık olma özelliğini korumaktadır. Sepsis patofizyolojisi son yıllarda yapılan araştırmalarla önemli oranda aydınlatılmış olmakla birlikte bu konuda açıklanamayan pek çok durum halen mevcuttur. (18)

Sepsis; enfeksiyona karşı verilen sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler, sepsiste oluşan patolojik olayların birçoğunun anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Araştırmacılar, konağın enfeksiyona karşı pasif kalmadığını, enfeksiyona inflamatuvar yanıt esnasında öncelikle mikrobiyal öldürme için üretime başlanılan ancak bazı durumlarda kontrolden çıkarak sepsis kliniğine kadar gidebilen ve doku/organ hasarı oluşturan endojen proinflamatuvar mediyatörlerin salındığını fark etmişlerdir. LPS'in septik süreci başlatabilmesi için konakçı hücrelerinde LBP tarafından bağlanması gerekmektedir LPS-LBP kompleksinin hangi yolla hücreleri aktive ettiği ve inflamatuvar süreci nasıl başlattığını açıklamak bir süre mümkün olamamıştır. 1996 yılında Hoffman ve arkadaşlarının *Drosophila*'da keşfettikleri Toll molekülünün insandaki homologu olan Toll like reseptörler (TLR)'in 1997'de keşfi ile bu belirsizlik ortadan kalkmıştır.(33,34) Kısa sürede insanda 11 farklı çeşit TLR keşfedilmiş ve bu konuda binlerce yayın yapılmıştır. TLR'lerin doğal immün sistemin en temel reseptörlerinden biri olarak patojenin tanınması ve inflamatuvar sürecin başlatılması gibi immün sistem için hayati görevinin yanı sıra adaptif immün sistemin aktive edilmesi, bağışıklık kazanılması ve inflamatuvar sürecin sonlandırılması amacıyla apoptoz regulasyonu ve anti-

inflamatuvar dengenin sağlanması gibi sekonder görevleri de mevcuttur. TLR'lerin sepsis patogenezindeki ve immün yanıtındaki öneminin anlaşılmasıyla birlikte inflamatuvar süreçlerin rol oynadığı çeşitli romatolojik ve otoimmün hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, alerji/astım, dermatolojik hastalıklar, atheroskleroz gibi pek çok farklı hastalık patogenezi ve TLR arasında ilişki bulunmuş ve TLR fonksiyonlarının modülasyonu ile farklı terapötik alternatifler gündeme gelmiştir.

Oküler inflamatuvar hastalıkların patogenezinin aydınlatılması amacıyla göz dokusunda da TLR fonksiyonu ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan moleküler in vitro veya deneysel in vivo çalışmalarda TLR'lerin oküler ekspresyonu olduğu gösterilmiş ve pek çok farklı immünopatolojik oküler süreçte rol oynadığı keşfedilmiştir. Hangi TLR tipinin hangi dokuda eksprese edildiği Şekil 8'de izlenilmekte olup, bu çalışmaya konu olan TLR4 molekülünün kornea epitel hücreleri (6), korneal stromal fibroblastlar (7), silier cisim, iris endotel hücreleri (8), üveadaki resident antijen sunan hücreler (9) ve retina pigment epitelinde (10) de eksprese edildiği gösterilmiştir.

Kornea dokusunda TLR ekspresyonunun keşfi ile TLR moleküllerinin çeşitli enfeksiyöz ve inflamatuvar hastalıkların patogenezindeki rolünü aydınlatmak amacıyla kornea ve TLR ilişkisini göz önüne seren pek çok çalışma yapılmıştır. Song ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (6) kornea epitel, stroma ve endotel hücrelerinin TLR4 koreseptörü olan CD14 molekülünü ve ayrıca epitel hücrelerinin de TLR4 molekülünü eksprese ettikleri gösterilmiş ve gram negatif bakteriyel keratitlerin fizyopatolojisinde rol oynayabileceği ifade edilmiş ve TLR4

inhibisyonunun tedavi seçenekleri arasında olabileceği söylenmiştir. Bundan 8 yıl sonra Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (95) kontakt lense bağlı Pseudomonas keratit modelinde TLR4 antagonisti olan Eritoran kullanılmış ve korneadaki kemokin, sitokin salınımının ve lökosit infiltrasyonunun etkin biçimde inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu çalışma Eritoranın göz dokularında kullanılıp inflamasyonu inhibe ettiği ve sekonder doku hasarını önlediğini gösteren literatürdeki tek çalışmadır. TLR etkinliği ayrıca Herpes simplex virus keratitlerinde (96), keratoplasti sonrası red reaksiyonlarında ve kuru göz immünesinde de (97) çalışılmaktadır.

Çeşitli deneysel üveit modellerinde yapılan çalışmalarda üveadaki resident antijen sunucu hücrelerin, iris endotelinin ve silier cismin TLR4 eksprese ettikleri ve endotoksin ile oluşturulan ön üveit mekanizmasında TLR molekülünün rol aldığı gösterilmiştir. (98) Chen ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada normalde iris-silier cisim kompleksinin TLR4 eksprese etmediği ancak sistemik LPS enjeksiyonunu takiben 6. saatte iriste TLR4 (+) hücrelerin görülmeye başladığı ve 48. saatte bu hücrelerin yoğunluğunun pik yaptığı izlenmiştir. İris dokusunda normalde TLR4 (+) hücrenin bulunmaması ve LPS enjeksiyonu ile TLR4 (+) hücrelerin iris ve silier cisimde görülmeleri EIU patogenezinde TLR4 sinyal sisteminin etkin olduğunu göstermektedir. Üveit patofizyolojisinde TLR rolü ile ilgili yapılan başka bir in vitro çalışmada da üveal dokunun önemli miktarda TLR4 eksprese ettiği ve kültürdeki iris endotel hücrelerinde LPS ile indüklenen TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 üretiminin TLR4 monoklonal antikoru ile inhibe edildiği gösterilmiştir. (8) Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da EIU

oluşturulan ratlarda iris-silier cisim kompleksinin TLR4 ve TLR4 sinyal sisteminde rol oynayan Myc88 ve NFκB proteininin ekspresyonunda önemli derecede artış olduğu izlenmiştir.(99)

EIU modelinde yapılan bir çalışmada TLR4 mutasyonu olan ratların LPS'ye yanıt vermedikleri ve lethal etkiden korundukları gösterilmiştir. Ratların TLR4 fonksiyon bozukluğu durumunda LPS toleransı göstermeleri endotoksinin dokudaki hasarlandırıcı etkisinden ve lethaleden TLR4 sinyal sisteminin sorumlu olduğunu düşündürmektedir. (100) Diğer yandan TLR modülasyonunun iki yüzü keskin bıçak gibi olduğunu ve doğal immün yanıtı bozabileceğini savunan bazı araştırmacıların yaptığı bir çalışmada da TLR inhibisyonunun bakteriyel tanımayı önlediği, enfeksiyonlara karşı savunma sisteminde disfonksiyon oluşturduğu ve deneklerin endotoksine duyarsız oldukları ancak gram negatif enfeksiyonlara daha hassas oldukları izlenmiştir. (36)

Shibuya ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada normal tansiyonlu glokom hastalarındaki optik sinir hasarı ile TLR4 gen polimorfizmi arasında ilişki bulunmuştur. Optik sinir hasarının TLR4 yolağı aracılığıyla üretilen mediyatörlerin ve serbest radikallerin toksik etkisiyle ve heatshock proteinlerin interaksyonu neticesinde gerçekleştiği düşünülmüştür. (101) Başka bir çalışmada da deney hayvanlarında oluşturulan yüksek intraoküler basınç ve retina iskemisi sonrasında reperfüzyon uygulandığında TLR4 (-) hayvanların TNF-α, IL-6 gibi sitokinleri belirgin olarak daha az eksprese ettikleri ve ganglion hücre surveyininin daha yüksek olduğu izlenmiştir. Bu çalışmaya göre iskemi ve reperfüzyon sonrası retina hasarında TLR4 molekülünün rolü olduğu düşünülmüştür. (102)

Son yıllarda yapılan çalışmalar TLR'lerin retina doğal immün yanıtı ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle RPE'nin vasküler koroid ile nörosensöryel retina arasında stratejik bir konumda olması ve kan retina bariyerinin yapısına katılması inflamatuvar hastalıkların immünopatogenezinde rol oynadığını desteklemektedir. İnsan RPE hücre kültüründe TLR 1, 3, 4, 7, 9, 10 ekspresyonu gösterilmiştir. (84) TLR3 virüs dsDNA yapısını tanıyan bir molekül olup, CMV ve *Toxoplasma gondi* retinitis patogenezinde önemlidir. (103,104) TLR3 stimülasyonu ile RPE hücrelerinden çeşitli sitokin, kemokin ve adezyon moleküllerinin salındığı izlenmiştir. RPE hücre yüzeyinde TLR4 ekspresyonunu gösteren bir çalışmada da TLR4 aracılı sinyal sisteminin RPE hücrelerinin fagositoz fonksiyonunda etkili olduğu ve bu sistem uyarıldığında çeşitli proinflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen metabolitleri salınarak üveoretinit, yaşa bağlı makula dejenerasyonu veya diabetik retinopati gibi proinflamatuvar patofizyolojik süreçlerde rol oynayabileceği bildirilmiştir. (84,10) RPE hücrelerinin kan retina bariyerinde aktif immünolojik görev üstlenmesi ve bazı enfeksiyöz ajanlar tarafından özellikle tutulum yeri olarak seçilmesi ve TLR4'ün RPE hücrelerinde eksprese edilmesi bu sinyal sisteminin inflamatuvar retina hastalıkları patogenezinde etkin olduğunu kuvvetle desteklemektedir. RPE hücreleri enfeksiyöz ajanla ilk karşılaştığında TLR yoluyla ile immün yanıtı başlatmakta ve nörosensöryel retinaya immün hücre invazyonunu önlemeye çalışmaktadır. Ancak bazı durumlarda bu hücre immün yanıt kontrolden çıkmakta, salgılanan sitokinler ve endotel aktivasyonu sonucunda KRB

bozulmakta ve ileri doku hasarının göstergesi olan retinokoroidit tablosu oluşmaktadır. (93)

LPS ile indüklendiğinde NFκB aktivasyonuna yol açan TLR4 sinyal sistemi, son yıllarda sepsis başta olmak üzere pek çok inflamatuvar hastalığın tedavi araştırmalarında hedef alınmaktadır. TLR4'ün antagonize edilmesiyle konağın enfeksiyon durumunda verdiği aşırı inflamatuvar yanıtın inhibe edilmesi amaçlanmaktadır. Literatürde pek çok farklı TLR inhibitörü deneysel çalışmalarda araştırılmış olup Eritoran da oldukça güncel çalışmalara konu olmuş bir TLR4 sinyal sistemi antagonisitidir. Eritoranın etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte MD2 molekülünün iç cebine bağlanarak LPS'nin TLR4 ile etkileşmesini önlemekte ve NFκB aktivasyonuna izin vermemektedir. İn vitro çalışmalarda Eritoranın hücre kültüründe endotoksin benzeri aktivite göstermeden LPS'i bloke ettiği gösterilmiştir. (64) Yine başka bir in vitro çalışmada Eritoran insan myeloid hücre ve makrofaj kültürlerinde sitokin üretimini bloke etmekte (62) ve hücre içi proinflamatuvar sitokin üretiminde down regülasyona neden olmaktadır. (65) Deneysel sepsis modelleri ile yapılan bir çalışmada da lethal dozda *E. coli* LPS'i verilen hayvanların sadece antibiyotik ile tedavi edilmesiyle hayvan kaybının önlenemediği, ancak 5 mg/kg Eritoran verilmesiyle hayvanların 1/3'ünün hayatta kaldığı gözlemlenmiştir. (62) Sağlıklı deneklerle yapılan çalışmalarda Eritoranın endotoksinin neden olduğu inflamatuvar yanıtı ve klinik semptomları azalttığı gösterilmiştir. (66) Yine aynı çalışmada Eritoranın serum TNF-α ve IL-6 seviyesini azalttığı, hipotansiyon, taşikardi gibi dolaşım ile ilgili bulguları hafiflettiği izlenmiştir. Farmakodinamik çalışmalarda 12 saatte bir

yapılan infüzyon ile devamlı etkinlik sağlanabildiği gösterilmiştir. (63) Sepsis hastalarında yapılan Faz 2 randomize kontrollü klinik bir çalışmada da Eritoranın mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir. (67) Eritoran ile ilgili Faz 3 klinik randomize çalışma halen devam etmektedir.

Sepsiste izlenen abartılı inflamatuvar yanıtın ve proinflamatuvar mediyatör üretiminin TLR4 antagonisti Eritoran ile başarılı bir şekilde bloke edilebilmesi, yapılan pek çok çalışma ile retinokoroidal dokularda TLR4 ekspresyonunu varlığı ve TLR4 sistemi stimülasyonunun çeşitli retina hastalıklarının immünopatolojik sürecinde etkin olabilmesi fikri bizim çalışmamızın amacı olan TLR4 antagonize edilerek retinokoroidal hasar önenebilir mi sorusunu gündeme getirmiştir. Biz bu çalışmada öncelikle sistemik yolla LPS verilen ratlarda oluşan hem serumda hem retinokoroidal dokuda meydana gelen biyokimyasal değişiklikleri (TNF- α , MDA, NF κ B düzeyleri ile) değerlendirmeyi hem de inflamasyona sekonder retinal doku hasarını histopatolojik olarak ortaya koymayı amaçladık. Ayrıca 12. ve 24. saat seçeneklerini ekleyerek bu parametrelerdeki zamana bağlı değişimi de araştırdık.

Serumda TNF- α düzeylerine baktığımızda 12. saatte kontrol grubunda anlamlı miktarda TNF- α artışı olduğunu ve sepsis modelinin oluştuğunu görmekteyiz. 12. saatte Eritoran verilen grupta TNF- α düzeylerinde bir miktar azalma izlenmekle birlikte bu değişim istatistiksel olarak anlamlı olmamaktadır. 24. saate geldiğimizde tedavisiz kontrol grubunda sepsis bulgularının daha da şiddetlendiğini TNF- α düzeyindeki belirgin artıştan anlamaktayız ve 24. saatte tedavi verilen grupta TNF- α düzeyinde oldukça belirgin bir azalma izlenmekte ve bu değişim kontrol grubuna göre anlamlı olmaktadır. Ayrıca 24. saatte çalışma

grubunda TNF- α düzeyi oldukça anlamlı miktarda azalmıştır ki hatta sham grubundan farksız hale gelmiştir. Yani serum TNF- α düzeyleri açısından 24. saat çalışma grubu ile tamamen normal olan sham grubu ratları benzerdir.

12. saatte retinokoroidal dokudaki TNF- α düzeyleri incelendiğinde 12. saatteki serum TNF- α düzeyleri gibi kontrol grubunda anlamlı derecede artış olduğu, tedavi verilen çalışma grubunda ise bir miktar azalma olduğu ancak bu değişimin anlamlı olmadığı izlenmektedir. 24. saatte dokudaki TNF- α düzeyleri tedavisiz grupta artmaya devam etmekte ve tedavi edilen çalışma grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı oranda azaldığı görülmektedir. Ancak doku TNF- α düzeyi, 24. saatte kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olsa da tedavi grubu 24. saat serum TNF- α düzeyinde gördüğümüz gibi sham grubu seviyelerine inememiştir.

TNF- α , sepsis ve diğer inflamatuvar hastalıkların en önemli mediyatörlerinden biridir. IL-1 ile birlikte inflamatuvar yanıt sırasında akut faz cevabı, nötrofil adezyonu ve migrasyonu, endotel aktivasyonu, kapiller permeabilite artışı, doku ve organ hasarı, şok benzeri sendrom gelişiminden sorumludur. Hem sistemik inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların hem de sepsisin immün modülasyon tedavisinde TNF- α önemli bir hedef molekül olmaktadır. Oküler inflamatuvar hastalıkların özellikle otoimmün üveitlerin patogenezinde ve sonuçta oluşan doku hasarında da TNF- α oldukça önemli bir mediyatördür. Evreklioğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TNF- α düzeylerinin Behçet hastalığı aktivitesi ile korele olarak artış gösterdiği bulunmuştur. (105) TNF- α düzeylerinin saate bağlı değişimi ile ilgili yapılan bir çalışmada da Lewis ratlarında bifazik

TNF- α pikleri görülmektedir. LPS enjeksiyonu sonrasında serumda 2. saatte pik görülmekte, 8. saatte preenjeksiyon düzeyine geri dönülmekte ve 22. saatte ikinci bir pik izlenmektedir. (106) Retina dokusunda sitokin ekspresyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada da LPS enjeksiyonu sonrası 4. saatte retinada TNF- α belirgin bir şekilde eksprese edilmeye başlanmakta ve 22-24. saatte maksimum düzeye ulaşmaktadır. (107) TNF- α 'nın oküler inflamatuvar hastalıkların patogenezi bu denli katılmasıyla çeşitli hastalıklarda özellikle refrakter üveit tedavisinde infliximab, adalimumab, etanercept gibi anti-TNF- α ajanların kullanılması gündeme gelmiştir. Yapılan güncel çalışmalarda anti-TNF- α ajanların üveit tedavisinde etkinliğini ortaya koymaktadır. (108,109) Literatürde TLR4 yolağının antagonize edilmesiyle retinokoroidal dokuda TNF- α düzeylerindeki değişim veya oküler inflamatuvar hasarın değerlendirilmesi konularında çalışma bulunmamasına rağmen hem dokuda hem de serumda anlamlı TNF- α azalması elde etmiş olmamız TLR4 inhibisyonu ile proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin azaltılmasının ve ileri doku hasarının önlenmesinin mümkün olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada serum ve retinokoroidal dokudaki lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA düzeylerini de değerlendirdik. MDA inflamatuvar yanıt sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikalleri ve önemli bir mediatör olan TXA₂'nin metabolitidir. MDA bir lipid peroksidasyon ürünüdür. Bu bileşik hücre içinde toksik stres oluşturan reaktif bir aldehid ve hücre içinde proteinlerle ve DNA ile kovalan bağlar yaparak ileri lipoksidasyon son ürünleri oluşturur (51). MDA'nın organizmada oksidatif stres belirteci olarak kullanılabileceği

belirtilmiştir. (52) Deneysel otoimmün üveit modellerinde retinal hücre hasarından lipid peroksidasyonun sorumlu olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. (110,111) Yine Evreklioğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Behçet hastalığı aktivitesi ile serum MDA düzeylerinin korele olduğu bildirilmiştir. (105) Çeşitli antioksidan bileşikler kullanılarak deneysel üveoretinit oluşturulan hayvanlardaki retina hasarının geri döndürülebildiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. (112,113)

12. ve 24. saatte serum MDA düzeylerini değerlendirdiğimiz zaman TNF- α düzeyindeki değişime benzer şekilde septik grupta 12. saatte sham grubuna göre anlamlı şekilde artmış olan MDA düzeyi 24. saatte artmaya devam etmektedir. Tedavi alan grupta ise 12. saatte azalmaya başlayan seviye 24. saatte kontrol grubu ile anlamlı olacak şekilde azalma göstermektedir. Ancak hem 12. hem de 24. saatte çalışma grubundaki MDA düzeyi normal ratlardan oluşan sham grubuna benzer olacak kadar azalamamaktadır. MDA seviyesinin 24. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış olmasına rağmen 24. saatteki serum TNF- α düzeyi gibi tamamen normal ratlara benzer hale gelememesinin nedenleri; MDA'nın inflamasyon sırasında açığa çıkan pek çok farklı serbest oksijen radikalinin ve ayrıca araşidonik asit yolağındaki TXA2 gibi mediyatörlerin metaboliti olmasından dolayı serum ve dokudaki yükünün daha fazla olması veya MDA'nın doku içinde veya serumda proteinlerle kovalan bağ yapması sonucu serumdan TNF- α gibi kolay temizlenememesi şeklinde speküle edilebilir. Yine serum TNF- α düzeyindeki daha anlamlı değişimi doku TNF- α düzeyinde görmememizin nedeni de aynı şekilde hem TNF- α 'nın hem de MDA'nın dokudan uzaklaştırılmasının serumdan uzaklaştırılmasından daha zor olması olabilir. Bizim

çalışmamızda TLR4 antagonisti Eritoran ile serum ve doku MDA seviyelerinde anlamlı azalma elde edilebilmiş olması üveit patogenezinde önemli olan serbest oksijen radikali ve araşidonik asit metabolitlerinin bu tedavi yöntemi ile elimine edilebileceğinin ve oluşacak retina hücre hasarının önlenebileceğinin bir göstergesi olabilir diye düşünmekteyiz.

Bu çalışmada dokuda NFκB düzeylerinde de anlamlı değişiklikler elde edilmiştir. NFκB, TLR4 sinyal sistemi neticesinde aktive olarak proinflamatuvar sitokinleri üreten genleri uyarmakta ve inflamasyon sürecinde en önemli basamağı oluşturmaktadır. NFκB aktivitesi astım, kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi pek çok hastalık ile ilişkilendirilmiş, sepsiste de artmış NFκB düzeylerinin mortalite ile korele olduğu saptanmıştır. (114,115) Oküler inflamatuvar hastalıkların patogenezinde de NFκB aktivitesi retinal hasar ile ilişkili bulunmuştur ve NFκB inhibisyonu ile özellikle deneysel otoimmün üveit modellerinde doku hasarının engellendiği saptanmıştır. (116,117) Bu çalışmada elde edilen sonuçlara bakacak olursak; yine serum TNF-α düzeyine benzer şekilde 12. saatte NFκB düzeyinde çalışma grubunda kontrol grubuna göre bir miktar azalma sağlanmıştır ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildir. 24. saatte ise bu azalma trendi daha da devam etmekte ve çalışma grubunu sham grubu ile benzer hale getirmektedir. Bu değişim TLR4 antagonisti Eritoran verilmesiyle TLR4 sisteminin en önemli basamağı olan ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ile doku hasarına neden olabilen NFκB' nın etkin biçimde inhibe edilebildiğinin bir göstergesidir. NFκB inhibisyonu ile inflamatuvar yanıtın aşırı oluşup doku hasarına neden olması önlense de bu inhibisyonun normal immün yanıtı bozup bozmadığı

veya bakteriyel ajanlara karşı savunmayı zayıflatıp zayıflatmadığına dair ilaç dozajlaması ve zamanlaması açısından ayrıntılı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kontrol ve çalışma grupları 12. ve 24. saatlerde kendi içlerinde tekrar değerlendirildiğinde kontrol grubunda 12. saatten 24. saate geçerken sepsisin daha da kötüleştiği ve hem serum hem de doku TNF- α ve MDA düzeylerinde anlamlı artış olduğu izlenmektedir. Ancak NF κ B muhtemelen sepsisin daha erken döneminde yükselmekte ve 12. ve 24. saatler arasında belirgin fark bulunmamaktadır. Çalışma grubunda ise 12. saatten 24. saate geçildiğinde sepsiste kötüleşme olmasına karşın ilaca verilen cevap da daha iyi olmaktadır. Bu durum KRB etkisi ile açıklanabilir. Eritoranın KRB'ni geçip geçmediğine dair literatürde herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Ancak yaklaşık 1400 kD ağırlığında oldukça büyük bir moleküldür. (118) İnflamasyon kötüleştikçe KRB daha da bozulmakta fakat bu bozulma aynı zamanda ilacın dokuya geçişini de hızlandırmaktadır. 24. saatte kontrol grubunda septik bulguların ağırlaşmasına karşın yine 24. saat tedavi grubunda daha iyi yanıt alınmasının nedeni bu bariyerlerden geçiş etkisi olabilir. Eritoranın bariyerlerden geçişi konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışma grubunun 12. ve 24. saatler arasındaki değişimine bakıldığında TNF- α düzeyinde bu iki saat arasında anlamlı fark olmadığı (her iki saatte de anlamlı olarak düzey düşük olduğu için), MDA düzeyleri arasında ise anlamlı fark olduğu izlenmektedir. Bu durum bize TNF- α molekülünün MDA molekülüne göre daha hızlı ortamdan temizlendiğini göstermektedir. Bu durum daha önce bahsettiğimiz gibi ortamda daha fazla MDA yükü olması (daha fazla bileşiğin metaboliti olduğu için) veya proteinlerle kovalan bağ yapması ile ilişkili olabilir.

Histopatolojik değişiklikleri incelediğimizde sistemik LPS verilerek retinokoroidal hasar oluşmuş olduğunu ve Eritoran ile bu hasarın bir miktar geri dndrlebildiğini izlemekteyiz. Deneyin 12. saatinde 7 rat minimal retinal tutulum gösterirken, 3 rat zayıf tutulum sergilemiştir. 24. saate geçildiğinde sistemik bulgulara bakıldığında da daha da kötüleşen sepsis tablosunun retinadaki yansıması da daha da kötüleşmektedir. 24. saatte 9 ratta retina hasarı zayıf tutulumla dnşmşken 1 rat da orta tutulumla geçmiştir. Tedavi verilen grupta ise 12. saatte 9 minimal 1 zayıf tutulum izlenirken, 24. saate geçildiğinde 6 minimal 4 zayıf tutulum görülmektedir. 12. ve 24. saat grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında 12. saatte Eritoranın retinal hasarı bir miktar dzeltebildiği ancak bu değişimin anlamlı olmadığı, 24. saatte ise kliniğin daha kötüleşmesine rağmen ilacın daha etkili olduğu görülmektedir. Bu durumun daha önce bahsettiğimiz septik klinik ilerledikçe ilacın bariyerlerden daha iyi geçebilmesi ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Retinada kuvvetli ya da çok kuvvetli tutulumun hiç görülmemesinin nedenlerinden biri de bu bariyer etkisi olabilir. Eritoranın KRB'ni geçip geçmediğine dair çalışma bulunmamaktadır. Hem bu konunun aydınlatılması hem de oküler inflamasyon modelinde izlenen retinal hasarın tedavisi veya ilaç toksisitesinin belirlenebilmesi açısından Eritoranın intravitreal kullanımı ile ilgili deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır. Literatürde yapılan bir çalışmada LPS enjeksiyonu sonrası retinaya makrofaj infiltrasyonunun saate bağlı değişimi araştırılmış ve retinadaki infiltrasyonun 4-6 saatte başladığı, 16-24. saatlerde artarak devam ettiği ve 48. saatte pik yaptığı izlenmiştir. (14) Aynı çalışmada hücre infiltrasyonu n kamarada da incelenmiş ve n kamaradaki

infiltrasyonun daha erken olarak 24. saatte pik yaptığı gözlenmiştir. Ön kamara ile retina arasındaki bu zaman farkının silier cismin fenestre kapiller yataktan daha zengin olması, retinaya göre kan akım hızının daha yüksek olması veya ön kamaradaki mm²'ye düşen makrofaj sayısının retinaya göre daha fazla olması ile açıklanabileceği ifade edilmiştir. Retinadaki bu farklı tutulum KRB'nin daha etkin bir şekilde retinayı immün hücre infiltrasyonundan koruyor olması ile de açıklanabilir. Bizim çalışmamızda da retinal hasarın geri döndürülebilmesi açısından 24. saat sonuçlarımızın 12. saat sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olması deneyin ilerleyen saatlerinde daha anlamlı bir tutulum görebilir miydik sorusunu gündeme getirmiştir. Ancak çalışmamıza göre şu açıktır ki Eritoran etkinliği sepsisin sistemik biyokimyasal yansıması ve retinokoroidal hasar açısından TNF- α , MDA ve NF κ B düzeyleri ile birlikte değerlendirildiğinde ilgili parametrelerde anlamlı düzelme olduğu izlenmektedir. Ayrıca sepsisin erken döneminde retinal hasarın tedavisi açısından erken müdahalenin etkili olmadığı görülmektedir. Bu çalışma literatürde rastlanıldığı kadarıyla TLR4 antagonisti Eritoranın retinokoroidal etkinliğinin değerlendirildiği tek çalışmadır. Eritoranın patogenezinde retinokoroidal inflamatuvar komponent bulunduran oküler inflamatuvar hastalıkların klinik kullanımına girebilmesi açısından ilacın bariyerlerde nasıl davrandığını gösteren, daha uzun süreli takip içeren, hem sistemik hem intravitreal yolla ilacın verildiği kapsamlı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Sistemik LPS enjeksiyonu ile sepsis oluşturulan ratlarda Toll like reseptör antagonisti Eritoran ile hem serum hem de retinokoroidal dokuda TNF- α ve MDA seviyelerinde hem de dokuda NF κ B düzeylerinde anlamlı azalma saptandı. İnflamasyona sekonder retinal hasarda tedavinin 24. saatinde histopatolojik olarak anlamlı düzelme izlendi. Bu çalışma literatürde bilindiği kadarıyla retinokoroidal inflamatuvar patolojilerde Eritoranın etkinliğinin çalışıldığı tek çalışmadır. Yine bu çalışma retinokoroidit, üveit, senil makula dejenerasyonu veya diabetik retinopati gibi patogenezinde inflamatuvar süreçlerin eşlik ettiği oküler patolojilerde terapötik alternatif olarak toll like reseptör antagonizmasının etkinliği açısından fikir verse de ilaç toksisitesi, ilacın kan retina bariyerindeki davranışı, ilacın intravitreal etkinliği konularında daha uzun süre takipli ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- 1) Krawczyk-Michalak K, Glapiński A, Brzezińska-Błaszczyk E. **Toll-like receptors and their role in regulation of the inflammatory response in sepsis.** Anestezjol Intens Ter. 2008 Oct-Dec;40(4):253-59.
- 2) Pinsky MR, Matuschak GM. **Multiple systems organ failure: failure of host defense homeostasis.** Crit Care Clin 1989; 5:199.
- 3) Wiersinga WJ, Van der Poll T. **The Role of Toll-like Receptors in Sepsis** Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, 2006, Volume 2006, Part 1, 3-13
- 4) Wittebole D, Castanares-Zapatero, Laterre PF. **Toll-like Receptor 4 Modulation as a Strategy to Treat Sepsis.** Mediators Inflamm. 2010:568396.
- 5) Kim HM, Park BS, Kim JI, et al. **Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran.** Cell, vol. 130, no. 5, pp. 906–917, 2007.
- 6) Song PI, Abraham TA, Park Y, et al. **The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells.** Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:2867–2877.
- 7) Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Lu Y, Chikamoto N, Nishida T. **Lipopolysaccharide-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and chemokines in cultured human corneal fibroblasts.** Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:114–120.

- 8) Brito BE, Zamora DO, Bonnah RA, Pan Y, Planck SR, Rosenbaum JT. **Toll-like receptor 4 and CD14 expression in human ciliary body and TLR-4 in human iris endothelial cells.** *Exp Eye Res* 2004;79:203–208.
- 9) Chang JH, McCluskey P, Wakefield D. **Expression of toll-like receptor 4 and its associated lipopolysaccharide receptor complex by resident antigen-presenting cells in the human uvea.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1871–1878.
- 10) Kindzelskii AL, Elnor VM, Elnor SG, Yang D, Hughes BA, Petty HR. **Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments.** *J Gen Physiol* 2004;124:139–149.
- 11) Jha P, Bora PS, Bora NS. **The role of complement system in ocular diseases including uveitis and macular degeneration.** *Mol Immunol* 2007, 44:3901–3908
- 12) Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR. **Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease.** *Nature.* 1980;266:611-613.
- 13) Rosenbaum JT. **Endotoxin-induced uveitis.** Tabarra KF, Cello RM, eds. *Animal Models of Ocular Diseases.* Springfield, IL: Thomas; 1984:247-253.
- 14) Yang P, de Vos AF, Kijlstra A. **Macrophages in the retina of normal Lewis rats and their dynamics after injection of lipopolysaccharide.** *Ophthalmol Vis Sci.* 1996 Jan;37(1):77-85.
- 15) Ruiz-Moreno JM, Thillaye B, de Kozak Y. **Retino-choroidal changes in endotoxin-induced uveitis in the rat.** *Ophthalmic Res.* 1992;24(3):162-8.

- 16) Bhattacharjee P, Williams RN, Eakins KE. **An evaluation of ocular inflammation following the injection of bacterial endotoxin into the rat foot pad.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983;24:196–202.
- 17) Koizumi K, Poulaki V, Doehmen S, Welsandt G, et al. Sepsis. In: Armstrong D, Cohen J (eds). **Contribution of TNF- α to Leukocyte Adhesion, Vascular Leakage, and Apoptotic Cell Death in Endotoxin-Induced Uveitis In Vivo.** Infectious Diseases. London: Mosby;1999: volume 1, section 2, 47.1-14.
- 18) Bone RC. **The pathogenesis of sepsis.** Ann Intern Med 1991; 115:457.
- 19) Bone RC. **Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS).** Ann Intern Med 1996; 125:680.
- 20) Movat HZ, Cybulsky MI, Colditz IG, et al. **Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, and neutrophils.** Fed Proc 1987; 46:97.
- 21) Cinel I, Dellinger RP. **Advances in pathogenesis and management of sepsis.** Curr Opin Infect Dis 2007; 20:345.
- 22) Van der Poll T, Lowry SF. **Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense?** Shock 1995; 3:1.

- 23) Pruitt JH, Copeland EM, Moldawer LL. **Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock.** Shock 1995; 3:235.
- 24) Doğanay M. **Sepsis.** [http://www.tip.erciyes.edu.tr/ders notlari](http://www.tip.erciyes.edu.tr/ders%20notlari)
- 25) Lamping N, Dettmer R, Schröder NW, et al. **LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria.** J Clin Invest 1998; 101:2065.
- 26) Remi Neviere, MD <http://www.uptodate.com/contents/pathophysiology-of-sepsis>, 2010
- 27) Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. **Red blood cell rheology in sepsis.** Intensive Care Med 2003;29:1052.
- 28) Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR. **Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity.** Crit Care Med 2002; 30:276.
- 29) Marshall JC, Watson RW. **Apoptosis in the resolution of systemic inflammation.** Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Vincent JL (Eds), Springer-Verlag, Berlin, 1997. p.100.
- 30) Shanley TP, Hallstrom C, Wong HR. **Sepsis.** Fuhrman BP, Zimmerman JJ (eds): Pediatric Critical Care (3rd ed) Philadelphia: Mosby, 2006: 1474-93.
- 31) Bochud PY, Calandra T. **Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment.** Br Med J 2003; 326: 262-266.

- 32) Majewska M, Szczepanik M. **The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation.** Postepy Hig Med Dows 2006; 60: 52-63.
- 33) Belvin MP, Anderson KV. **A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway.** Annu Rev Cell Dev Biol. 1996;12:393-416.
- 34) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.** Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.
- 35) Sandor F, Buc M. **Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands.** Folia Biol (Praha).2005;51(5):148-57.
- 36) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, et al. **Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.** Science. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.
- 37) Adışen E, Önder M. **Dermatolojide Toll Like Reseptörler.** Dermatose. 2006;1: 14-21
- 38) Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. **MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4.** J Exp Med. 1999 June 7; 189(11): 1777–1782.

- 39) The Toll-Like Receptor Family of Innate Immune Receptors in Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease, ed: Anthony L. DeFranco, Richard M. Locksley, and Miranda Robertson Chapter 3-10 2007 New Science Press Ltd.
- 40) Liu SF, Malik AB. **NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006 Apr;290(4):L622-L645.
- 41) Uwe S. **Anti-inflammatory interventions and NF-kappaB signaling: Potential applications and risks.** Biochem Pharmacol. 2008;75:1567–79
- 42) Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, et al. **Role of NFκB in the mortality of sepsis.** J Clin Invest 1997, 100: 972–985
- 43) Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, et al. **Predictive Value of Nuclear Factor κB Activity and Plasma Cytokine Levels in Patients with Sepsis.** Infection and Immunity, 2000, 68;4:1942-1945
- 44) Karaali R, Tabak F. **Sepsis patogenezi.** Klinik gelişim, 2009, cilt no:22, No:3
- 45) Gutteridge JM, Mitchell J. **Redox imbalance in the critically ill.** Br. Med. Bull. 1999,55:49.
- 46) Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. **Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling.** Oncogene 1999, 18:6104.
- 47) Abraham E. **Nuclear factor κB and its role in sepsis-associated organ failure.** J.Infect. Dis. 2003,187 (Suppl. 2):S364.

- 48) Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. **Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B.** J Immunol. 2004 Feb 15;172(4):2522-9.
- 49) Thimmulappa RK, et al. **Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis.** J. Clin. Invest. 2006;116:984–995.
- 50) Pryor WA, Stanley JP. **A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids: Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation.** J. Org. Chem. 1975, 40 (24): 3615–7.
- 51) Farmer EE, Davoine C. **Reactive electrophile species.** Curr. Opin. Plant Biol. 2007, 10 (4): 380–6.
- 52) Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. **A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress.** Nutr Metab Cardiovasc Dis 2005, 15 (4): 316–28
- 53) Marnett LJ. **Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde.** Mutat. Res.1999, 424 (1-2): 83–95.
- 54) Sabroe I, Dower SK, Whyte MKB. **The role of toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation and apoptosis.** Clinical Infectious Diseases 2005;45:S421-6
- 55) Haslett C. **Granulocyte apoptosis and inflammatory disease.** Br Med Bull 1997;53:669-83

- 56) Zychlinsky A, Sansonetti P. **Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis.** J Clin Invest 1997; 100:493–5.
- 57) Hull C, McLean G, Wong F, Duriez PJ, Karsan A. **Lipopolysaccharide signals an endothelial apoptosis pathway through TNF receptor–associated factor 6–mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase.** J Immunol 2002; 169:2611–8.
- 58) Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. **Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products.** Blood 1992; 80:2012–20.
- 59) Lee A, Whyte MK, Haslett C. **Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators.** J Leukoc Biol 1993; 54:283–8.
- 60) Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, et al. **NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro.** J Biol Chem 1999; 274:4309–18.
- 61) Sabroe I, Prince LR, Jones EC, et al. **Selective roles for Toll-like receptor TLR2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span.** J Immunol 2003; 170:5268–75.
- 62) Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, et al. **Inhibition of endotoxin response by E5564, a novel Toll-like receptor 4- directed endotoxin antagonist.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2003, 304;3: 1093–1102

- 63) Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, et al. **Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a Toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis.** Critical Care Medicine, 2010, 38; 1: 72–83.
- 64) Rossignol DP, Lynn M. **Antagonism of in vivo and ex vivo response to endotoxin by E5564, a synthetic lipid A analogue.** Journal of Endotoxin Research 2002, 8: 483
- 65) Czeslick E, Struppert A, Simm A, Sablotzki A. **E5564 (eritoran) inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in human blood monocytes.** Inflammation Research, 2006, 55;11: 511–515.
- 66) Lynn M, Rossignol DP, Wheeler JL, et al. **Blocking of responses to endotoxin by E5564 in healthy volunteers with experimental endotoxemia.** Journal of Infectious Diseases, 2003, 187;4: 631–639.
- 67) Rossignol DP, Wong N, Noveck R, Lynn M. **Continuous pharmacodynamic activity of eritoran tetrasodium, a TLR4 antagonist, during intermittent intravenous infusion into normal volunteers.** Innate Immunity, 2008, 14;6: 383–394.
- 68) Hagberg L, Hull R, Hull S, McGhee JR, Michalek SM, Svanborg Eden C. **Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice.** Infect Immun. 1984;46:839-844
- 69) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, et al. **Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product.** J Immunol. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.

- 70) Weighardt H, Kaiser-Moore S, Vabulas RM, Carsten J, et al. **Myeloid Differentiation Factor 88 Deficiency Improves Resistance Against Sepsis Caused by Polymicrobial Infection** The Journal of Immunology, 2002, 169: 2823-2827.
- 71) Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. **Role of Toll-like receptors in the development of sepsis.** Shock, 2008, 29;3: 315-321.
- 72) Bauer PR. **Microvascular responses to sepsis: clinical significance** Pathophysiology Volume 8, Issue 3, June 2002, Pages 141-148
- 73) Bannerman DD, Fitzpatrick MJ, Anderson DY, et al. **Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction.** Infect Immun, 1998, 66:1400–1407
- 74) Astiz ME, DeGent GE, Lin RY, Rackow EC. **Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis.** Crit Care Med 1995; 23:265.
- 75) De Backer D, Creteur J, Preiser JC, et al. **Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis.** Am J Respir Crit Care Med 2002; 166:98.
- 76) Aird WC. **The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome.** Blood 2003; 101:3765.

- 77) Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. **Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis.** Cardiovasc Res. 2003 Oct 15;60(1):49-57.
- 78) Koevary SB. **Ocular immune privilege: a review.** Clin Eye Vis Care. 2000, 12 (34):97-106.
- 79) Zhou R, Caspi RR. **Ocular immune privilege.** F1000 Biol Rep. 2010 Jan 18;2. pii: 3.
- 80) Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA. **Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions.** Angiogenesis. 2007;10(2):103-17.
- 81) Sharma NK, Prabhakar S, Anand A. **Age related macular degeneration - advances and trends.** Annals of Neurosciences, Volume 16, Number 2, 2009
- 82) Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. **The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy.** J Biomed Biotechnol. 2010;2010:190724.
- 83) Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, De Vos AF. **Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes.** Progress in Retinal and Eye Research, 2001, 20; 1:29–48,
- 84) Kumar MV, Nagineni CN, Chin MS, et al. **Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signalling in human retinal pigment epithelial cells.** J Neuroimmunol 2004; 153:7–15.

- 85) Crane IJ, Liversidge J. **Mechanisms of leukocyte migration across the blood–retina barrier.** *Semin Immunopathol* 2008, 30:165–177
- 86) Herbort CP, Chan CC, Nussenblatt RB. **Endotoxin induced uveitis in the rat: A hypothesis for preferential involvement of the anterior uvea.** *Curr Eye Res.* 1990;9(suppl):119-124.
- 87) Okumura A, Mochizuki M, Nishi M, Herbort CP. **Endotoxin-induced uveitis (EIU) in the rat: A study of inflammatory and immunological mechanisms.** *Int Ophthalmol.* 1990; 14:31-36.
- 88) Miyashita H, Tagawa S, Takeda H, Higashide T, Sugiyama K. **Comparison between stereo angiographic findings and histopathologic findings in endotoxin-induced uveitis.** *Curr Eye Res.* 2009 Jul;34(7):536-42.
- 89) Miyahara S, Almulki L, Noda K, Nakazawa T, Hisatomi T, et al. **In vivo imaging of endothelial injury in choriocapillaris during endotoxin-induced uveitis.** *FASEB J.* 2008 Jun;22(6):1973-80.
- 90) Streilein JW, Stein-Streilein J. **Does innate immune privilege exist?** *J Leukoc Biol* 2000;67:479–87.
- 91) Takeda K, Kaisho T, Akira S. **Toll-like receptors.** *Annu Rev Immunol* 2003;21:335–76.
- 92) Micera A, Stampachiacchiere B, Aronni S, dos Santos MS, Lambiase A. **Toll-like receptors and the eye.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005, (5):451-8.

- 93) Chang JH, McCluskey PJ, Wakefield D. **Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease.** Br J Ophthalmol 2006;90:103–108.
- 94) Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, et al. **Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes.** Prog Retin Eye Res 2001;20:29–48.
- 95) Sun Y, Pearlman E. **Inhibition of corneal inflammation by the TLR4 antagonist Eritoran tetrasodium (E5564).** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Mar;50(3):1247-54.
- 96) Kumar A, Zhang J, Yu F. **TLR3 mediates Poly (I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells.** Immunology 2006; 117:11–21
- 97) Redfern RL, McDermott AM. **Toll-like receptors in ocular surface disease.** Exp Eye Res. 2010 Jun;90(6):679-87.
- 98) Chen W, Hu XF, Zhao L, Li S, Lu H. **Toll-like receptor 4 expression in macrophages in endotoxin-induced uveitis in Wistar rats.** Zhonghua Yan Ke Za Zhi. 2010 Apr;46(4):355-61.
- 99) Li S, Lu H, Hu X, Chen W, Xu Y, Wang J. **Expression of TLR4-MyD88 and NF- κ B in the iris during endotoxin-induced uveitis.** Mediators Inflamm. 2010:748218.

- 100) Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ et al. **Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4).** J Exp Med. 1999 Feb 15;189(4):615-25.
- 101) Shibuya E, Meguro A, Ota M, Kashiwagi K et al. **Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Oct;49(10):4453-7.
- 102) Dvorianchikova G, Barakat DJ, Hernandez E, Shestopalov VI, Ivanov D. **Toll-like receptor 4 contributes to retinal ischemia/reperfusion injury.** Mol Vis. 2010 Sep 30;16:1907-12.
- 103) Detrick B, Rhame J, Wang Y, et al. **Cytomegalovirus replication in human retinal pigment epithelial cells. Altered expression of viral early proteins.** Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37:814–25
- 104) Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, et al. **Mechanisms of interferon induced inhibition of Toxoplasma gondii replication in human retinal pigment epithelial cells.** Infect Immun 1996;64:4188–96.
- 105) Evereklioglu C, Er H, Türköz Y, Cekmen M. **Serum levels of TNF-alpha, sIL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behçet's disease.** Mediators Inflamm. 2002 Apr;11(2):87-93.

- 106) de Vos AF, van Haren MA, Verhagen C, Hoekzema R, Kijlstra A. **Kinetics of intraocular tumor necrosis factor and interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis in the rat.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994 Mar;35(3):1100-6.
- 107) de Vos AF, Klaren VN, Kijlstra A. **Expression of multiple cytokines and IL-1RA in the uvea and retina during endotoxin-induced uveitis in the rat.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994 Oct;35(11):3873-83.
- 108) Pleyer U, Mackensen F, Winterhalter S, Stübiger N. **Anti-TNF- α treatment for uveitis. Analysis of the current situation.** Ophthalmologe. 2011 Jan;108(1):13-20.
- 109) Neri P, Zucchi M, Allegri P, Lettieri M, Mariotti C, Giovannini A. **Adalimumab (HumiraTM): a promising monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha in ophthalmology.** Int Ophthalmol. 2011 Apr;31(2):165-73
- 110) Goto H, Wu GS, Chen F, Kristeva M, Sevanian A, Rao NA. **Lipid peroxidation in experimental uveitis: sequential studies.** Curr Eye Res. 1992 Jun;11(6):489-99.
- 111) Rao NA. **Role of oxygen free radicals in retinal damage associated with experimental uveitis.** Trans Am Ophthalmol Soc. 1990;88:797-850.
- 112) Wu GS, Walker J, Rao NA. **Effect of deferoxamine on retinal lipid peroxidation in experimental uveitis.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993 Oct;34(11):3084-9.

- 113) Bosch-Morell F, Romá J, Marín N, Romero B. **Role of oxygen and nitrogen species in experimental uveitis: anti-inflammatory activity of the synthetic antioxidant ebselen.** *Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 1;33(5):669-75.
- 114) Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, et al. **Role of NFκB in the mortality of sepsis.** *J Clin Invest* 1997,100: 972–985.
- 115) Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, et al. **Predictive Value of Nuclear Factor κB Activity and Plasma Cytokine Levels in Patients with Sepsis.** *Infection and Immunity*, 2000, Vol.68, No:4, p:1942-1945
- 116) Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, Satofuka S et al. **Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappa B activation.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jul;50(7):3512-9.
- 117) Kitamei H, Iwabuchi K, Namba K, Yoshida K et al. **Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with an inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), pyrrolidine dithiocarbamate.** *J Leukoc Biol.* 2006 Jun;79(6):1193-201.
- 118) <http://www.freepatentsonline.com/EP1158990.html> **Use of E5564 for the treatment of sepsis by intravenous infusion.**

8.ÖZET

RATLARDA ENDOTOKSİNLE OLUŞTURULAN SEPSİS MODELİNDE TOLL-LİKE RESEPTÖR ANTAGONİSTİNİN (ERİTORAN) RETİNOKOROİDAL İNFLAMATUAR HASARA ETKİSİ

Enfeksiyöz bir ajan ile başlatılan ve kontrolsüz sistemik inflamatuvar yanıtı neden olan sepsis patofizyolojisinde Toll-like reseptörler kilit rol oynamaktadır. Pek çok farklı mikrobiyal yapıyı bağlayabilen bu reseptörlerden TLR4 gram negatif bakteri lipopolisakkaritini tanımaktadır. Başlıca immün sistem hücre yüzeylerinde bulunan ve LPS ile uyarıldığında nükleer faktör kapp B'nin proinflamatuvar mediyatör üreten genleri stimüle etmesine neden olan TLR4 molekülünün; çeşitli oküler dokularda da ekprese edildiği gösterilmiştir. TLR4 antagonisti Eritoran, LPS ile TLR4 bağlanmasını önleyen sentetik lipid A analogudur. Bu çalışmanın amacı, endotoksinle sistemik sepsis oluşturulan ratlarda retinokoroidal dokudaki biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri ortaya koymak ve TLR antagonisti eritoran ile retinokoroidal inflamatuvar hasardaki düzelme durumunu değerlendirmektir.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Her grupta 10 rat olacak şekilde 5 grup oluşturuldu. 1. grup normal değerlerin belirlendiği sham grubuydu. Kontrol ve çalışma grupları 12. ve 24. saat olmak üzere iki farklı grupta incelendi. Kontrol grubuna kuyruk veninden serum fizyolojik verilirken, çalışma grubuna eritoran verildi. Grupların çalışma saatlerine uygun olarak 12. ve 24. saatlerde kan örneği alındı ve enükleasyon yapıldı. Her ratın bir gözü biyokimyasal değerlendirme diğer gözü de

histopatolojik inceleme için kullanıldı. Serum ve retinokoroidal dokuda TNF- α , MDA, NF κ B değerlerine bakıldı ve histopatolojik inceleme yapıldı.

Sepsisin 12. saatinde çalışma grubunda kontrol grubuna göre tüm değerlerde düzelme izlendiyse de bu değişim istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Çalışmanın 24. saatinde sepsisin kötüleşmesine rağmen tüm değerlere istatistiksel olarak anlamlı düzelme izlendi. Serum TNF- α ve NF κ B düzeyleri 24. saat çalışma grubunda sham grubundan farklı değildi.

TLR4 antagonisti eritoran, tedavinin 24. saatinde TNF- α , MDA ve NF κ B düzeyleri ile değerlendirildiğinde hem sistemik hem de retinokoroidal dokuda inflamatuvar hasarda anlamlı düzelme sağlamaktadır. Eritoranın göz dokusunda bariyerlerden geçiş, toksisite ve doz belirlenmesi konularında ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: TLR4, Eritoran, Retinokoroidal hasar

9.SUMMARY

EFFECT OF TOLL-LIKE RECEPTOR ANTAGONIST ERITORAN IN RETINOCHOROIDAL INFLAMMATORY DAMAGE AT RAT MODEL OF ENDOTOXIN INDUCED SEPSIS

Toll-like receptors play a key role at sepsis which is characterized by uncontrolled systemic inflammatory response. These receptor family members recognize different microbial structures whereas TLR4 recognize gram negative bacteria lipopolysaccharide. TLR4 molecule stimulated by LPS trigger some reactions and finally cause proinflammatory mediator release via nuclear factor kappa stimulation. TLR4 molecule especially found on immun system cells but also found on some ocular cellular structures. TLR4 antagonist Eritoran is a synthetic lipid A analogue and prevents the engagement of LPS and TLR4. The aim of this study was to evaluate the biochemical and histopathologic changes at retinochoroidal tissue in endotoxin induced sepsis rats and the improvement in retinochoroidal inflammatory damage with eritoran, TLR4 antagonist.

This study was held in Gazi University Test Animal Laboratory. Rats are studies in five groups 10 rats found in each. First group was sham group for evaluation of normal value of parameters. Control and study groups were assessed parameters in 12th and 24th hour. While control group rats were delivered saline solution, study groups took eritoran through tail vein. According to the different timing of groups blood samples were collected and enucleation were done at 12. and 24. hours. TNF- α , MDA, NF κ B levels were evaluated at serum and retinochoroidal tissue and also histopathological assessment were made.

At 12th hour of study an improvement was seen in all parameters but this change was not significant istatistically. At 24. hour although sepsis parameters were worsened all parameters improved significantly. Serum TNF- α and NF κ B levels were not different than normal sham rats at 24th hour.

Eritoran, TLR4 antagonist, provide improvement in inflammatory damage both in serum and retinochoroidal tissue parameters evaluated by TNF- α , MDA and NF κ B levels especially at 24th hour of the study. Future investigation needed in transport of eritoran from ocular barriers, toxicity and dosage.

Key Words: TLR4, Eritoran, Retinochoroidal damage

10.EKLER



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 68- 14052
KONU:

29.09/2006

Sayın

Dr.Osman YÜKSEL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Öğretim Görevlisi

G.Ü.ET-06.053 kod numaralı ve "Ratlarda endotoksinle oluşturulan sepsis modelinde toll-like reseptör antagonistinin akciğer ve göz mikrodolaşım bozukluklarına etkisi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is certified that the research project numbered G.Ü.ET-06.053 and entitled "The effects of toll-like receptor antagonist on pulmonary and ocular microcirculatory disorders in a rat model of endotoxin-induced sepsis." is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards,

Prof.Dr.Gökhan ALPAŞLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

Uz.Vet.Hek.Şeyda DİKER

11.ÖZGEÇMİŞ

Dr. Feyzahan Ekici

Doğum Yeri ve Tarihi: Sakarya / 26.09.1981

feyzahan@gmail.com

feyzahan@yahoo.com

Eğitim Durumu

2006-2011	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Araştırma Görevlisi Doktor
1999-2005	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (İngilizce)
1996-1999	Denizli Fen Lisesi
1994-1996	Denizli Anadolu Lisesi
1992-1994	Afyon Kocatepe Anadolu Lisesi
1987-1992	Afyon Atatürk İlkokulu

Yabancı Dil İngilizce (ileri düzey)

Üye olduğu bilimsel kuruluşlar Türk Oftalmoloji Derneği

Bilimsel Çalışma ve Yayınlar

- Özdek Ş, Şekeryapan B, Ekici F, Hasanreisöğlu B. Management of Choroidal Neovascularization in Pathologic Myopia: Combined Therapy. Journal of Retina-Vitreous 2010, Volume 18, Number 3, Page(s) 197-202

Sözlü Sunum:

- Ekici F, Özdek Ş, Hasanreisöğlu B. Dejeneratif myopiye sekonder gelişen ve diğer tedavilere dirençli koroidal neovasküler membran tedavisinde intravitreal bevacizumab etkinliği. Türk Oftalmoloji Derneği 41. Ulusal Kongresi Program Kitabı 2008; S:131
- Ekici F, Özdek Ş, Gürelik G, Hasanreisöğlu B. KNV tedavisinde Lucentis: 3 aylık yükleme mi, gerektiğinde (PRN) tedavi mi? Türk Oftalmoloji Derneği 44. Ulusal Kongresi Program Kitabı 2009
- Ekici F, Özdek Ş. Düğümsüz Z sütün yöntemi ile skleral fiksasyonlu göz içi lens (GİL) implantasyonu. Türk Oftalmoloji Derneği 44. Ulusal Kongresi Program Kitabı 2010; S:116
- Akata F, Yüksel N, Gün FA, Ekici F, Gündüz ÖU. Kornea alımını daha güvenli kılabilir miyiz? . Türk Oftalmoloji Derneği 44. Ulusal Kongresi Program Kitabı 2010; S:136

Poster:

- Ekici F, Özdek Ş, Hasanreisöğlu B. Frosted branch angiitis olgusunda atipik bir bulgu: Premaküler hemoraji. Türk Oftalmoloji Derneği 42. Ulusal Kongresi Program Kitabı 2008; S:345

- Ekici F, Konuk O, Ünal M. Posttravmatik lakrimal sistem obstrüksiyonu olgularının özellikleri ve cerrahi seçenekler. Türk Oftalmoloji Derneği 44. Ulusal Kongresi Program Kitabı 2010; S:447