

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**LİPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN ENDOTOKSEMİK RAT MODELİNDE
KETAMİN, PROPOFOL VE KETOFOLO KULLANIMININ İNFLAMASYON VE
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Abdulkerim YILDIZ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU

ANKARA
Eylül 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN ENDOTOKSEMİK RAT
MODELİNDE KETAMİN, PROPOFOL VE KETOFOL KULLANIMININ
İNFLAMASYON VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Abdulkerim YILDIZ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/50 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Eylül 2012

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 25/09/2012

**İmza
Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**İmza
Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU
Gazi Üniversitesi**

**İmza
Doç. Dr. Ece KONAÇ
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Resimler	V
Tablolar	VII
Semboller ve Kısaltmalar	VIII
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Lipopolisakkarit (LPS).....	4
2.2. Sepsis.....	6
2.2.1. Endotoksin	8
2.2.2. Sepsisin Fizyopatolojisi	9
2.2.3. Sitokin Biyolojisi	11
2.2.4. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- α)	13
2.2.5. Nükleer faktör - Kappa B (NF- κ B)	15
2.2.5.1. NF- κ B Sinyal Yolu	17
2.3. Reaktif Oksijen Bileşikleri (ROS)	19
2.3.1. Nitrit Oksit (NO)	21
2.3.1. Lipit Peroksidasyonu	22
2.4. Siklooksijenazlar (COX)	25
2.4.1. Siklooksijenaz-2 (COX-2)	28
2.4.2. COX-1 ve COX-2'nin Karşılaştırılması	30
2.4.3. Siklooksijenazların İnhibisyonu	31
2.5. Heat Shock Proteinleri (Hsp).....	32
2.5.1. Hemoksijenaz (HO)	33
2.5.1.1. HO Geni	33
2.5.1.2. Hem Molekülünün HO ile Oksidatif Parçalanması	33
2.5.1.3. HO İzofomları ve Moleküler Özellikleri	35
2.5.1.4. HO-1/HO-2 İndüksiyonu ve Regülasyonu	36
2.5.1.5. HO-1'in Reaksiyon Ürünleri ve Fonksiyonları	36
2.6. İntravenöz (İV) Anestezikler	41
2.6.1. Ketamin	41
2.6.1.1. Fiziko-kimyasal Özellikleri	42
2.6.1.2. Metabolizma ve Farmakokinetik	42

2.6.1.3. Kardiyovasküler Sisteme Etkileri	42
2.6.1.4. Solunum Sistemine Etkileri	43
2.6.1.5. Santral Sinir Sistemi Etkileri	43
2.6.1.6. Kullanım Alanları	44
2.6.1.7. Yan Etkiler ve Kontraendikasyonlar	44
2.6.1.8. Ketaminin İnflamatuar Üzerine Etkisi	45
2.6.2. Propofol.....	45
2.6.2.1. Fiziko-kimyasal Özellikleri	46
2.6.2.2. Metabolizma ve Farmakokinetik	46
2.6.2.3. Kardiyovasküler Etkileri	47
2.6.2.4. Solunum Sistemine Etkileri	47
2.6.2.5. Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	48
2.6.2.6. Diğer Etkileri.....	48
2.6.2.7. Kullanım Alanları.....	49
2.6.2.8. Yan Etkiler ve Kontraendikasyonlar	50
2.6.2.9. Propofolün İnflamatuar Üzerine Etkisi	50
2.6.3. Ketofol	50
3.GEREÇ ve YÖNTEM	51
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	51
3.1.1. Deney Hayvanları	51
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	51
3.2. Deneylerin Yapılışı	52
3.2.1. Deney Grupları.....	52
3.2.2. Dokuların Hazırlanışı.....	53
3.2.3. TNF- α 'nın ELISA Yöntemi ile Ölçümü.....	53
3.2.4. NF- κ B'nin ELISA Yöntemi ile Ölçümü.....	53
3.2.5. Dokuda NOx Ölçümü	54
3.2.6. Dokuda MDA Ölçümü.....	54
3.2.7. HO-1 ve Cox-2'nin Western-Blot ile Ölçümü.....	56
3.3. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	59
4.BULGULAR	60
4.1. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda TNF-α Düzeylerindeki Bulguları	60
4.2. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda NF-κB Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değişimleri.....	61

4.3. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda Nitrit/Nitrat Düzeylerindeki Bulgular	62
4.4. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda MDA Düzeylerindeki Bulgular	63
4.5. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda Cox-2 Protein Düzeylerindeki Bulgular	64
4.6. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda HO-1 Protein Düzeylerindeki Bulgular	65
5.TARTIŞMA	67
6.SONUÇ	83
7.ÖZET	84
8.SUMMARY	86
9.KAYNAKLAR	88
10.EKLER	118
11.ÖZGEÇMİŞ	119

Şekiller ve Resimler

Şekil – 1 : LPS yapısı.....	4
Şekil – 2 : Gram negatif hücre duvarı	5
Şekil – 3 : SIRS, sepsis ve enfeksiyon arasındaki ilişki	6
Şekil – 4 : Septik şokun patogenezinde sitokinlerin ve humoral faktörlerin etkileşimleri.....	7
Şekil – 5 : Sepsisin Fizyopatolojisi	8
Şekil – 6 : Sepsiste TNF, IL-1 ve IL-6 Fonksiyonları	9
Şekil – 7 : Sepsis ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı	10
Şekil – 8 : TNF- α 'nın Kristal Yapısı.....	14
Şekil – 9 : NF- κ B sinyal yolunun aktivasyon mekanizması.....	18
Şekil – 10 : NF- κ B aktivatörleri ve etki yerleri.....	19
Şekil – 11 : Singlet Oksijen Türleri.....	20
Şekil – 12 : Oksijenin suya indirgenmesi sırasında ROS'ların oluşması	21
Şekil – 13 : Malondialdehit (MDA).....	24
Şekil – 14 : PG'lerin otokrin ve parakrin etkileri	25
Şekil – 15 : COX enzim kompleksinin COX ve POX aktivitesine sahip bölgelerinin modeli	27
Şekil – 16 : COX-1 ve COX-2'nin etki mekanizması	28
Şekil – 17 : COX-1 ve COX-2'nin lokalizasyonu ve miktarları	30
Şekil – 18 : NSAİD'lerin COX-1 ve COX-2 üzerindeki etkisi	32
Şekil – 19 : Hem parçalanma yolağı. Hemin biliverdin IX α 'ya dönüşümü HO tarafından katalize edilirken bilirubin IX α oluşumu biliverdin redüktaz varlığında gerçekleşir	34
Şekil – 20 : Heme oksijenaz enzimi ve son ürünler	35

Şekil – 21 : Hem molekülünün parçalanma ürünleri ve fonksiyonları	37
Şekil – 22 : CO'in muhtemel etki mekanizmaları	38
Şekil – 23 : Serbest demirin normal ve patolojik durumlardaki rolü	39
Şekil – 24 : Bilirubin biyokimyasal yapısı ve işlevleri.....	40
Şekil – 25 : Ketaminin Kimyasal Yapısı.....	41
Şekil – 26 : Propofolün Kimyasal Yapısı.....	45
Şekil – 27 : Ratların Kalp Dokusunda Ketamin, Propofol ve Ketofolün, TNF- α Düzeylerine Etkisi	61
Şekil – 28 : Ratların Kalp Dokusunda Ketamin, Propofol ve Ketofolün, NF- κ B Düzeylerine Etkisi	62
Şekil – 29 : Ratların Kalp dokusundaki Nitrit/Nitrat düzeyleri	63
Şekil – 30 : Ratların Kalp dokusundaki MDA düzeyleri.....	64
Şekil – 31 : Ratların Kalp Dokularındaki Cox-2 Enzim Bant Yoğunluğu.....	65
Şekil – 32 : Ratların Kalp Dokularında Ketamin, Propofol ve Ketofolün, Cox-2 Protein İfadelenmesi Üzerine Etkisi	65
Şekil – 33 : Ratların Kalp Dokularındaki HO-1 Enzim Bant Yoğunluğu	66
Şekil – 34 : Ratların Kalp Dokularında Ketamin, Propofol ve Ketofolün, HO-1 Protein İfadelenmesi Üzerine Etkisi	66
Şekil – 35 : HO-1 ve iNOS aktivitesinin NF- κ B yolu ile transkripsiyonal regülasyonu	81

Tablolar

Tablo – 1: İnflamatuvar özelliklerine göre bazı sitokinlerin sınıflandırılması.	12
Tablo – 2 : NF-κB yolağının aktivatörlerinden bazıları	16
Tablo – 3 : NF-κB ile düzenlenen hedef genlerden bazıları	17
Tablo – 4 : Başlıca ROS’lar ve antioksidanları	20
Tablo – 5 : COX-1 ve COX-2’nin karşılaştırılması.....	30-31
Tablo – 6 : MDA ölçüm protokolü.....	55
Tablo – 7 : %5 Paketleyici Jel	56
Tablo – 8 : %12 Ayırıcı Jel.....	57
Tablo – 9 : Primer ve Sekonder Antikorların Marka ve Dilüsyon Oranları.	57
Tablo – 10 : Kalp Dokusundaki TNF-α Değerleri ve İstatiksel Analizleri.....	60
Tablo – 11 : Kalp Dokusundaki NF-κB Gen Ekp. ve İstatiksel Analizler	61
Tablo – 12 : Kalp Dokusundaki Nitrit/Nitrat Değ. ve İstatiksel Analizleri ...	62
Tablo – 13 : Kalp Dokusundaki MDA Değerleri ve İstatiksel Analizleri.....	63
Tablo – 14 : Kalp Dokusundaki Cox-2 Değerleri ve İstatiksel Analizleri.....	64
Tablo – 15 : Kalp Dokusundaki HO-1 Değerleri ve İstatiksel Analizleri.....	66

Semboller ve Kısaltmalar

AA: Araşidonik Asit.

AP-1: Aktivatör protein-1.

APP: Akut Faz Proteini.

ARDS: Akut Respiratuar Distres Sendromu.

C/EBP β ve δ : CCAAT/Enhancer Binding Protein.

COX-2: Siklooksijenaz-2.

COXIBs: COX-2'ye Spesifik İnhibitörler.

CREB: Siklik AMP Cevap Elemanı Bağlanma Proteini.

DIC: Disseminant İntravasküler Koagulasyon.

ECGF: Endotel Hücresi Büyüme Faktörü.

ED₅₀: Bilinç Kaybı İçin Median Efektif Doz.

eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz.

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü.

GMCSF: Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör.

HO-1: Hemoksijenaz-1.

HSP: Heat-Shock (Isı-Şok) Proteini.

IKB: İntrakranial Basıncı.

IKK: I κ B Kinaz.

IKKi: I κ B Kinaz.

I κ B: NF- κ B'nin Hücre İçi İnhibitörü.

IV: İntravenöz.

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz.

L $\cdot$: Lipid Radikalleri.

LOO $\cdot$: Lipid Peroksit Radikali.

LPS: Lipopolisakkarit.

LPB: LPS-Bağlayıcı Protein.

LTA: Lipoteikoik Asit.

MAPK: "Mitojen Aktive eden" Protein Kinaz.

MDA: Malondialdehit.

MODS: Multipl Organ Disfonksiyon Sendromu.

NF-κB: Nükleer Faktör – Kappa B.

NIK: NF-κB - Including Kinaz.

NO: Nitrik Oksit.

nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz.

NOS: Nitrik Oksit Sentaz.

NSAİD: Steroid Olmayan Yangı Karşıtı İlaçlar.

PAF: Trombosit Aktive Edici Faktör.

PG: Prostaglandin.

PGG₂: Prostaglandin G₂.

PGH₂: Prostaglandin H₂.

PGHS: Prostaglandin G/H Sentaz.

PLA₂: Fosfolipaz A₂.

POX: Peroksidaz.

PTGS: Endoperoksit Sentaz.

RHD: Rel Homoloji Alanı.

RNS: Reaktif Nitrojen Türleri.

ROS: Reaktif Oksijen Türleri.

SF: Serum Fizyolojik.

SIRS: Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu.

Sn-PPN: Sn-Protoporfirin.

sTNFR: Solubl TNF Reseptörü.

TBA: Tiyobarbütirik Asit.

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör – Alfa.

TRAF1: TNF Receptor-Associated Factor-1.

TxA₂: Tromboksan A₂.

USF-1: Upstream Uyarıcı Faktör-1.

Zn-PPN: Zn-Protoporfirin.

1.GİRİŞ

Endotoksemi, kanda toksisite varlığını tanımlar. Klinik olarak bu terim kullanıldığı zaman endotoksemiye ait klinik belirtilerin de var olması gerekmektedir¹. Endotoksin, gram negatif bakterilerin hücre duvarının bir parçasını oluşturur ve canlı dokuya girdikten sonra akut bir yangı başlatılmasından sorumludur². Gram negatif bakteri hücre duvarı; içte peptidoglikan tabaka, dışta lipopolisakkaritler, proteinler ve fosfolipitlerden oluşur. Lipopolisakkarit tabakada bulunan endotoksin molekülü, hücre membranında kaldığı sürece inaktiftir. Hücrenin hızlı büyümesi veya hücre yıkımı sırasında açığa çıkan endotoksin sepsis/endotoksemide olaylar dizisini başlatan anahtar moleküldür³. Septisemide bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonun morbidite ve mortalitesi üzerinde bakterilerin (özellikle gram negatif) membranlarındaki lipopolisakkarit yapısında olan endotoksinin önemli rolü olduğu bildirilmektedir^{4,5,6,7,8}. Endotoksinler, ısıya dayanıklı olan ve lipopolisakkarit komplekslerinin yapısında bulunan organik moleküller olup enterik basiller başta olmak üzere bir çok gram negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunur. Sepsis sonucu bakterinin parçalanması ile serbest kalabilirler ve endotoksemiye neden olurlar⁹.

Deneysel araştırmalarda hayvanlarda sepsis/endotoksemiye oluşturmak için lipopolisakkarit uygulamalarının yapılabileceği belirtilmektedir. Lipopolisakkarit pek çok araştırmacı tarafından tavşan^{10,11,12,13,14,15}, rat^{16,17,18,19}, fare^{20,21}, köpek²², keçi²³, at^{24,25}, bufalo²⁶, sığır^{27,28} gibi hayvanlarda deneysel endotoksemi oluşturmak için kullanılmıştır. Lipopolisakkaritler herhangi bir hastalığa sebep olmaksızın gastrointestinal kanalda bulunabilirlerken küçük bir miktarı bile canlının dolaşım sistemine girerse, sistemik yangısal semptomlarla karakterize ciddi klinik cevapları başlatırlar. Gram negatif bakterilerden kaynaklanan sistemik enfeksiyonlar endotoksemik şok veya ölüme neden olabilmektedir. Laboratuvar hayvanlarına endotoksin veya lipopolisakkaritin intravenöz uygulanmasıyla da endotoksik şoka veya ölüme neden olunabileceği belirtilmiştir^{29,30}. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda düşük doz

Lipopolisakkarit'in bile sistemik yangısal cevap oluşturduğunu bildirilmişdir. Lipopolisakkarit'in uygulanmasıyla ateş, sistemik hipotansiyon, bradikardi, disseminant intravasküler koagulasyon (DIC), doku nekrozu ve pek çok yangısal mediatörün üretilmesi gibi fizyolojik akut faz cevaplar oluşmaktadır. Bunun sonucunda sitokinlerin, akut faz proteinlerin ve serbest radikallerin üretimi indüklenir.

Sitokinler reperfüzyon hasarının sonucu olan inflamatuvar cevabı başlatırlar ve sürdürürler³¹. Sitokinlerin otokrin, parakrin ve hüморal etkileri olup birtakım inflamatuvar mediatörlerin üretimini indüklerler, bunlarda diğer sitokinler, kemokinler ve eikozonoidlerdir³².

Proteinler organizmada pek çok fizyolojik olayda rol oynayan maddelerdir. Dokuların temel yapı taşlarını oluşturmakla birlikte enzim ve hormon gibi vücutta çok sayıdaki kimyasal reaksiyonları düzenler. Protein sentezi kontrolünün en önemli basamağı genetik düzeyde gerçekleşmektedir. Bunun için de bireyler ve türler arasında proteinler bakımından farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Kanda bulunan bazı proteinler, çeşitli yangı durumlarında hızla yükselir veya düşer. Özellikle lipopolisakkarit ile oluşturulan endotoksemide, akut faz proteinlerinin hızlı artış/azalışı oldukça belirgindir. Akut dönemde bu belirgin değişikliği gösteren proteinlere akut faz proteini (APP) adı verilir. Bu proteinler temel olarak karaciğerden sentezlenir ve çoğu glikoprotein yapısındadır. Akut faz proteinlerin salgılanması proinflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenir^{33,34,35}.

Akut faz proteinler; enfeksiyon, yangı, sirurjikal travma veya oksidatif strese maruz kalan canlılarda antikordan bağımsız olarak mikrobiyal büyümeyi sınırlandırmada ve homeostazisin restorasyonuna katkı saėlarlar³⁶.

APP'ler enfeksiyon, yangı veya travmaya cevapta proinflamatuvar sitokinlerin stimölasyonuyla çeşitli hastalık durumlarına tepki olarak üretilmektedir. APP'lerin cevabının genişliği ve bir hastalık için spesifik olmaması bir dezavantaj olarak görülebilirken diğer uygun testlerle beraber değerlendirildiğinde önemli diagnostik parametre olacağı ifade edilmektedir^{37,38}.

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan hidroksil radikalleri hücre ve organel membranlarındaki lipitler ile çift bağ yapar ve oluşan lipit-radikal etkileşimi ile bir dizi reaksiyon gelişir. Bunun sonucunda malondialdehit (MDA), dien konjugatları gibi birçok lipid peroksidasyon ürünü oluşur³⁹. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve oksidatif hasarın bir indikatörüdür. MDA oluşum yerinden kolayca diffüze olarak membran yapısındaki lipit ve proteinlere çapraz bağlanarak membran bütünlüğünü bozar, bu da membran permeabilitesinin bozulmasına neden olur. Birçok değişik organ sistemleri üzerinde iskemi/reperfüzyon modeli oluşturularak yapılan çalışmalarda MDA düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir^{40,41,42}. Tiyobarbitirik asit (TBA) reaktivitesi ile MDA ölçümü lipit peroksidasyonun değerlendirilmesi için en sık kullanılan yöntemdir⁴³.

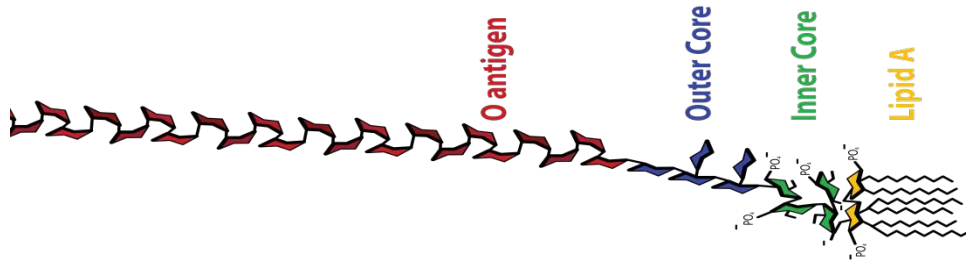
Bununla birlikte bazı hastalıklar nitrik oksitin (NO) üretimi veya etkisindeki bozukluklara bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, NO vücut savunması ve immünolojik reaksiyonlarda da rol oynar^{44,45}. Sitotoksik özelliklerinin ve aktive makrofajlar tarafından oluşturulduğunun saptanması ile özgül olmayan bağışıklıkta ve septik şok, inflamasyon gibi durumların patogenezinde rol oynadığı da ortaya konulmuştur^{46,47}.

Bu tez çalışmasında ratlara lipopolisakkarit (LPS)'nin intravenöz enjeksiyonu ile oluşturulan endotoksemi modelinin ardından verilen ketamin, propofol ve ketamin ile propofolün 1:1 oranında karışımının (ketofol) verilmesinden sonra ratlardan alınan kalp dokusundaki sitokin düzeyleri olarak Tümör Nekrozis Faktör – Alfa (TNF- α) ve Nükleer Faktör – Kappa B (NF- κ B) düzeyleri kantitatif analizi, Siklooksijenaz-2 (Cox-2) ve stres proteini diğer bir ismi ile heat-shock (ısı-şok) proteini (Hsp) olarak Hemoksijenaz-1 (HO-1) enziminin Western Blot yöntemi ile semi-kantitatif analizi, oksidatif stres belirteçleri olan Malondialdehit (MDA) ve Nitrik Oksit (NO) düzeylerinin kantitatif analizi ile; ketamin, propofol ve ketofolün, LPS ile indüklenen endotoksemik rat modelinde oluşan yangı ve stres üzerine etkilerini araştırmak amacıyla incelendi.

2.GENEL BİLGİLER

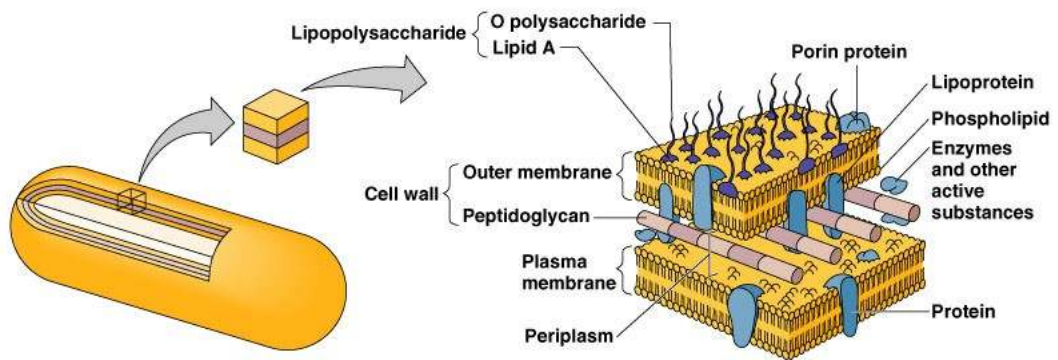
2.1. Lipopolisakkarit (LPS)

Sağlıklı bireyde bakteriler primer olarak gastrointestinal sistemde bulunur ve bağırsak duvarının intact olması halinde konakçının kan dolaşımına translokasyonu gerçekleşmez^{48,50}. Ancak; bakteriyel çoğalmaya bağlı olarak konakçının florasında değişiklik meydana gelmesi, konakçının bağışıklık mekanizmalarında bozulma, yüksek proteinli enteral diyet, major cerrahi girişimler ve buna benzer sebeplerle epitelyal hücre bariyerlerinde permeabilite artması sonucunda bakteriyel translokasyon ortaya çıkmaktadır⁶⁴. Gram negatif bakteri konakçının kan akımına geçtiğinde lipopolisakkaritler (LPS) ve bakteri duvarını meydana getiren diğer komponentler, lökositler ve parankimal hücrelerle etkileşerek inflamatuvar olayı başlatır⁶⁷. LPS, Gram negatif bakteri için yaşamsal önemi olan integral bir hücre duvarı komponentidir. Günümüzde yapısı ve katıldığı biyolojik mekanizmalar çok iyi tanımlanmış olan LPS, gram negatif bakteri öldüğü veya bölündüğü sırada açığa çıkmaktadır⁷⁴. Yapısı esas olarak üç immünokimyasal bölümden oluşmaktadır. Bunlar biyolojik olarak etkin bir lipid A, O-polisakkarit yan zincir ve R-kor oligosakkaritdir⁷⁵. O-polisakkarit yan zincir genellikle tekrarlayan oligosakkarit ünite polimerlerinden meydana gelir. Bu yapının diğer bir özelliği de, endotoksine serotip denilen bakteriyel köken ve karakteristik özellikleri vermesidir⁷⁶. Aynı zamanda O-polisakkarit yan zincir bakteriyel virulans etkenidir. O-polisakkarit yan zincir birimine göre daha az yapısal farklılık gösteren iç ve dış kor olarak iki alt birimden meydana gelir.



Şekil-1: LPS yapısı.

Konakçının immün modölatörlerinin etkisi ve antibiyotik uygulaması sonucunda bakterinin parçalanması ile yoğun miktarda LPS, konakçının dolaşımına geçer ve monosit, makrofaj gibi hedef hücreleri uyararak inflamatuvar mediatörlerin açığa çıkmasına sebep olur⁵⁹. Akut infeksiyonlarda karaciğerde sentez edilen LPS-bağlayıcı protein (LBP) konsantrasyonu yüz kat artar^{48,72}. Bu molekül, lipid-A'ya bağlanır ve opsonize eder. LBP-LPS kompleksi opsonizasyonu hızlandırır. Buna ilaveten, LBP-LPS, tek başına LPS'ye nazaran makrofajlardan TNF sentezinin uyarılması bin defa daha potenttir⁴⁸. LBP-LPS makrofajlarda CD₁₄ reseptörlerine bağlanarak etkili olmakta ve LBP'ye ilaveten bir proteaz yapısında olan septin de LPS-CD₁₄ etkileşimini arttırmaktadır^{48,73}. LPS, konakçıda koordine bir inflamatuvar cevabı başlatmaktadır. Ancak inflamatuvar, hücrelerin aşırı aktivasyonu ile konakçının ölümüne yol açabilmektedir. Polimorfonükleer lökositlerin ihtiva ettiği ve Gram negatif bakteriler için sitotoksik olan bakterisidal permeabilite artırıcı protein (BPI), LPS-CD₁₄ etkileşimini kompetitif olarak inhibe eder^{48,68}. Sonuç olarak, CD₁₄'ün, LPS'ye konakçının cevabında kritik bir önemi vardır, LPS ile CD₁₄ arasındaki etkileşim ise endotoksemide konakçının immün cevabı belirleyicisi olan serum faktörleri tarafından inhibe edilir veya uyarılır.



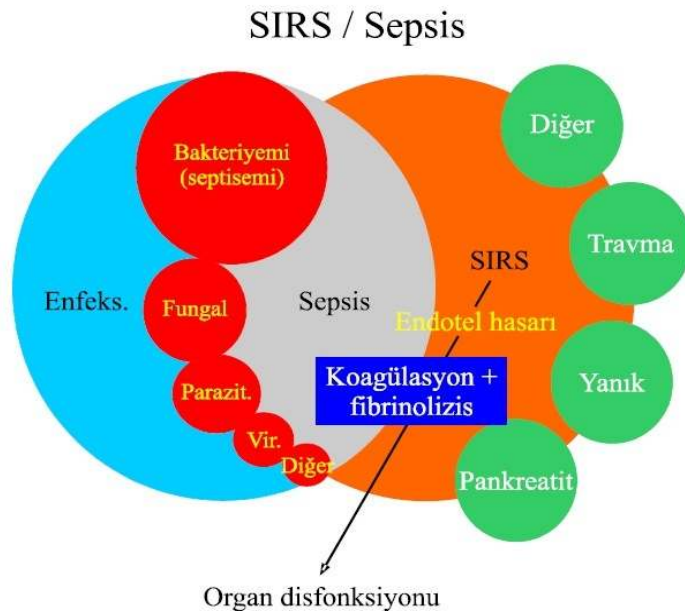
Şekil-2: Gram negatif hücre duvarı; Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

LPS, organizmada meydana getirdiği patolojik etkilerini, sitokinlerin de içinde yer aldığı ikinci araçlarla modüle etmektedir⁴⁸. LPS

tarafından indüklenen inflamatuvar cevabın modüle edilmesinde en önemli erken cevap sitokinleri TNF- α ve IL-1 β 'dir⁵⁷. Bu sitokinler, diğer sitokinlerin serbestleşmesi⁴⁸, araşidonik asit metabolizmasının aktive edilmesi, integrin ekspresyonu, kompleman aktivasyonu ve nitrik oksit sentezi indüksiyonu gibi birçok immün cevabın uyarılmasını sağlar^{49,50}.

2.2. Sepsis

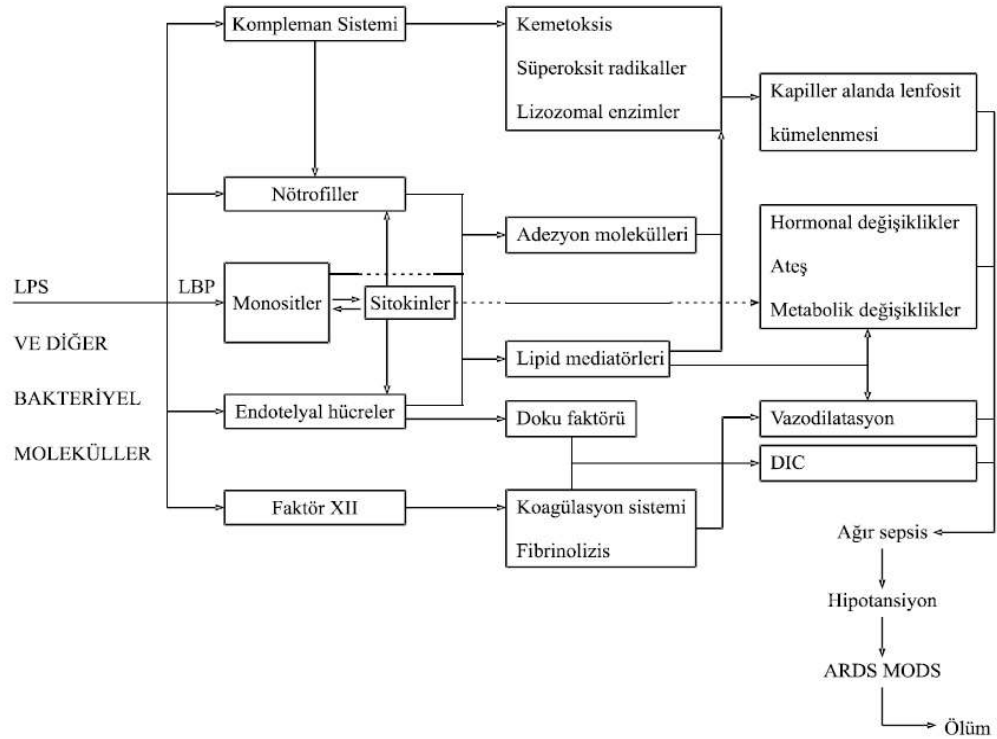
Sepsise eşlik eden klinik tabloyu ilk kez, M.Ö. 400 yılında tanımlayan Hippocrates, “akut bir hastalıkta ekstremitelerin soğuması kötü bir belirtidir” ifadesini kullanmıştır⁸⁰. Bu tanımlamadan yaklaşık 24 asır sonra günümüzde, sepsis fizyopatolojisindeki gelişmelere karşın, terminolojideki karmaşanın sürdüğü gözlenmektedir. 1991 yılında Society of Critical Care Medicine ve American Collage of Chest Physicians’ın konsensus toplantısında enfeksiyon, bakteriyemi, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) , sepsis, septik şok ve multip organ disfonksiyon sendromuna (MODS) ilişkin evrensel tanımlamalar geliştirilmiştir (Şekil-3)⁸¹.



Şekil-3: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), sepsis ve enfeksiyon arasındaki ilişki⁸¹.

Gram negatif bakteriler insanda alt gastrointestinal sistem florasında bulunmaktadır. Konak ve patojen arasındaki bariyer oldukça güçlüdür ve predispozan bir durum bulunmadıkça enfeksiyon beklenmez. Ne zaman bariyer aşılr (ör: medikal veya cerrahi uygulamalar) gram negatif bakteriler daha önce kolonizasyonu olmayan dokulara yayılırlar, özellikle de büyümekte olan hücrelere invazyon gösterir. Çoğu gram negatif enfeksiyonları üriner, genital, alt solunum yolları, peritoneal kavite, yumuşak doku ve cerrahi yaralanmalardan orijin almaktadır ⁸².

Bakterilerin intakt bağırsak lümenini geçerek sistemik dolaşıma katılmasına “bakteriyel translokasyon” adı verilmektedir. Bu geçişin neden olduğu tüm olaylar aynı zamanda bir sepsis nedenidir. Öte yandan sepsisin ilerlemesi sırasında bakteriyel translokasyon devam etmektedir. Kısaca sepsisin kendisi bir bakteriyel translokasyon nedenidir ⁸³.

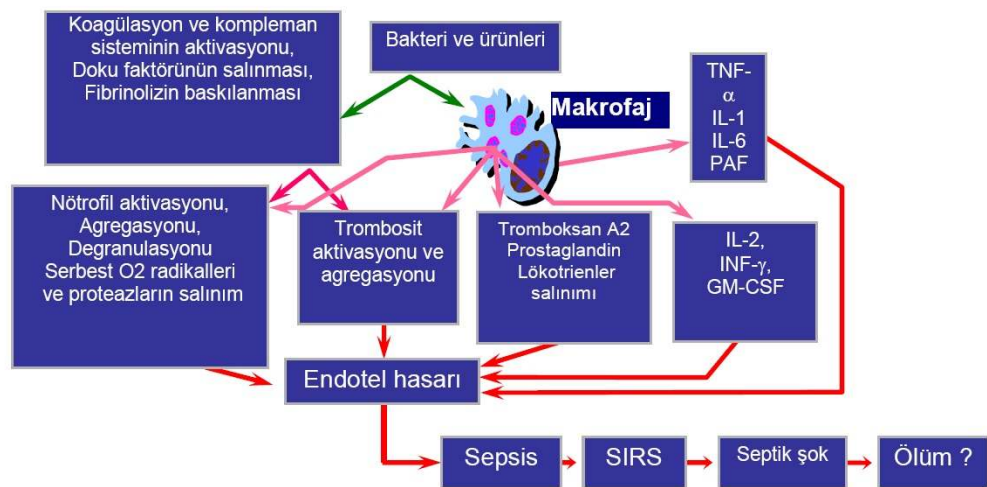


Şekil-4: Septik şokun patogenezinde sitokinlerin ve humoral faktörlerin etkileşimleri ⁸⁶.

Çoğunlukla gram negatif bakteriler olmak üzere pek çok mikroorganizma, makrofaj ve monositi uyarak sepsis kaskadının başlamasına neden olur. Başta makrofaj olmak üzere pek çok hücreden sitokin salınımı başlar. Organ yetmezliği ve ölüme kadar giden süreç içinde bir dizi karmaşık sitokin etkileşimleri, kompleman ve pıhtılaşma sisteminin aktivasyonu, nötrofil aktivasyonu, ilerleyici biçimde yaygın hipoksi, reperfüzyon hasarı, endotel hasarı ve sonunda organ yetmezliği ile sonuçlanır^{84,85}.

2.2.1. Endotoksin

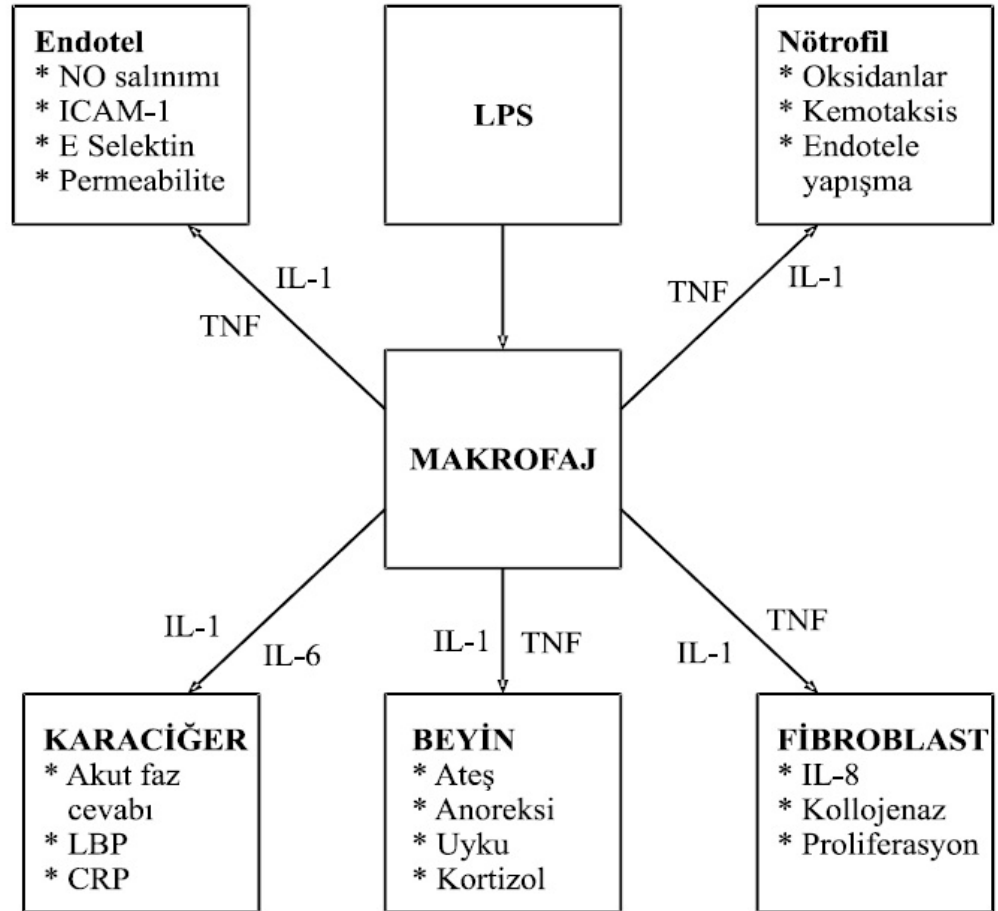
Gram negatif bakterilerin hücre duvarı iki tabakadan oluşmuştur. Dıştaki tabakada proteinlere ilave olarak LPS yapı içeren bir bölüm vardır. Bu bölüm, bakteriyemide toksisitenin asıl sorumlusudur ve polisakkarit O antijeni, Core antijeni ve Lipid A olmak üzere üç bölümden oluşur. Bir polisakkarid yan zincir olan O antijeni, core polisakkaridi aracılığıyla bir fosfolipid olan lipid A'ya bağlanır. O antijeni gram negatif bakteri suşlarına göre değişir ve belirgin serotipik farklılaşmadan sorumludur. Lipid A bölgesi toksisitenin ana sorumlusu olarak görülmektedir. Pek çok klinik ve deneysel çalışmada, lipopolisakkaridin intravenöz enjeksiyonunun sitokin kaskadını başlatan ana sorumlu olduğu ve sepsis sendromuna yol açtığı gösterilmiştir^{86,87}.



Şekil-5: Sepsisin Fiziopatolojisi⁸⁸.

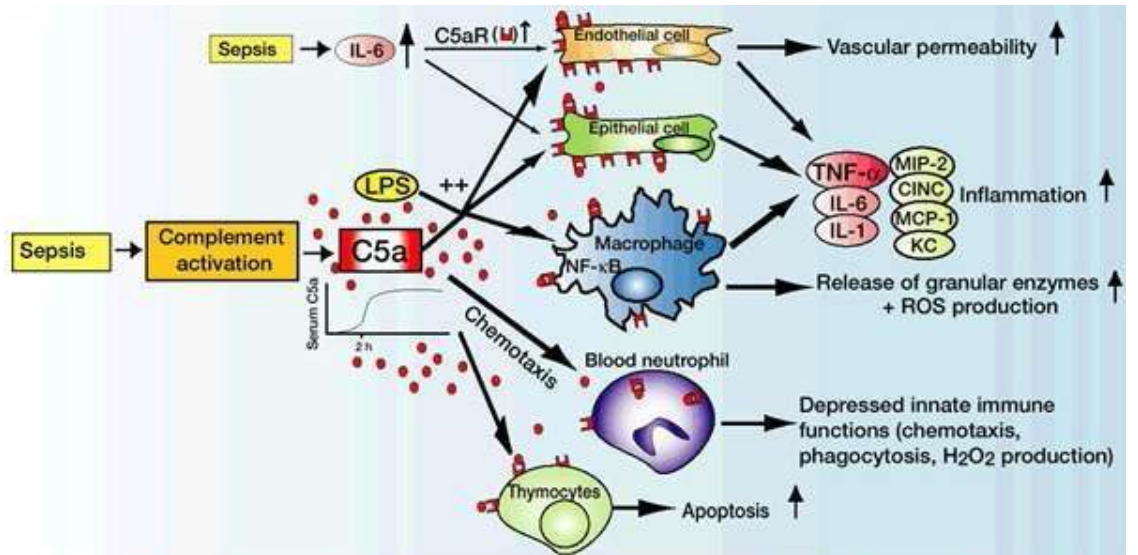
LPS rahatlıkla sistemik dolaşıma geçebilir ve makrofaj, monosit gibi hücreleri uyarak sepsis kaskadını başlatacak sitokinlerin salınımına yol açabilir. LPS'in Lipid A bölümü, lökositlerin membranlarına; CD₁₄, CD₁₁, CD₁₈ ve asetillenmiş düşük doz lipoprotein gibi reseptörler aracılığıyla yapışır^{73,91}. LBP 60 kDa ağırlığında ve esas olarak karaciğerde sentezlenir. CD₁₄, 55 kDa ağırlığında glikozilfosfoinozitol bağlı bir reseptördür. LPS'in lipid A bölümü, öncelikle Lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP) ile birleşir. Oluşan LPS-LBP kompleksi CD₁₄ reseptörüne yapışır. LBP başlangıçta bir akut faz cevabı proteini olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonra normal serumda da bulunduğu ve LPS-CD₁₄ birleşmesini katalize ettiği gösterilmiştir⁸⁹.

2.2.2. Sepsisin Fizyopatolojisi



Şekil-6: Sepsiste TNF, IL-1 ve IL-6 Fonksiyonları⁸⁴.

Deneysel endotoksemilerde plazmada sitokin seviyesindeki artmaya paralel olarak, klinik bulguların ateş, taşikardi, hipotansiyon, ortaya çıkar. Klinik bulgular sitokinlerin varlığı ile alakalı olup LPS infüzyonundan 90-120 dakika sonra ortaya çıkar. Ekzojen gram (-) bakteri endotoksini verilen deney hayvanlarında sırasıyla TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 seviyelerinde artış saptanmıştır. Sepsisin oluşması için nonenfeksiyöz uyarıcılar da benzer fizyolojik cevaba sebep olabilir. Sirkülasyonda endotoksinler; TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve trombosit aktive edici faktörün (PAF) mononükleer fagositler ve hücrelerden üretimine sebep olur. Bu mediatörler aracılığıyla koagülasyon ve kompleman sisteminin de aktive olduğu değişik çalışmalarda belirtilmiştir⁸⁴.



Şekil-7: Sepsis ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı⁹⁰.

TNF- α , IL-1 ve PAF salınımından sonra araşidonik asit metabolize olur. Lökotrienler, tromboksan A₂ (TxA₂), prostoglandinler özellikle PGE₂ ve PGI₂ oluşur. IL-1 ve IL-6, T hücrelerini uyararak IL-2, IL-4 ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) üretimini aktive eder. Bu ajanların direkt etkisi daima vasküler endotel üzerinedir. Endotoksin, TNF- α , PAF, Lökotrienler ve TxA₂ endotel permeabilitesini arttırırlar. Endotel hücreleri bunun yanı sıra EDRF ve endotelin-1 salınımına neden olur. EDRF düz kas gevşemesine

ve trombosit agregasyonunun inhibisyonuna neden olur. Endotelin-1 ise potent bir vazokonstrüktördür⁸⁴.

Septik basamaklarda etkili olan diğer ajanlar adezyon molekülleri, kininler, miyokardial depresan faktör, hipertermi ve oksidatif stres sonrası hücre hasarını önleyen ısı sok proteinleri (ör: Hemoksijenaz-1) ve β -endorfindir. Adezyon molekülleri ve trombin endotel hasarını artırır. Buna karşılık IL-4, IL-8 ve ısı şok proteinlerinin bu hasara karşı koruyucu etkileri mevcuttur⁸⁸.

2.2.3. Sitokin Biyolojisi

Sitokinler, protein veya glikoprotein yapısında moleküller olup nonspesifik immün sisteminde temel haberleşmeyi sağlayan proteinlerdir. Hücre büyümesi ve değişimi, doku tamiri ve yeniden yapılanması, immün cevabın düzenlenmesinde hücreler arasında kimyasal haberleşmeyi sağlarlar⁹². Doğal immünitede sitokinler; mononükleer fagositler ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilirler. Kazanılmış immünitede ise, T hücreleri tarafından üretilirler. TNF- α , IL-1 ve IL-6 doğal immün cevapta en önemli sitokinlerdir^{92,93}. Bu sitokinler tek başlarına immün cevabın düzenlenmesinde rol oynamazlar, fakat yardımcı T hücre cevabına neden olarak edinsel immünitenin gelişmesine ve yayılmasına neden olurlar. Sitokin biyolojisinin önemi arttıkça, cerrahi hastalardaki önemi de artmaya başlamıştır. Yara iyileşmesi, iskemi - reperfüzyon injürisi ve septik şok gelişimi gibi inflamatuvar durumlarda sitokinlerin rol aldığı ve önemleri tamamen anlaşılmıştır. İnsan genomunun da açıklığa kavuşturulmasıyla birlikte, bilinen sitokin sayısında dramatik bir artış olmuştur. İnterferon $\alpha\beta$ 'nın kronik hepatit-C enfeksiyonunda kullanılması, son dönem böbrek yetmezliğinde meydana gelen anemide eritropoetin kullanılması ve kemoterapiye bağlı nötropeni tedavisinde GMCSF kullanılması sitokin terapi rejimlerine verilebilecek örneklerdir^{92,93}.

Sitokinler farklı hücre tiplerinde farklı etkiler göstermektedirler. Bir sitokin diğerlerinin sentez ve salgılanmasını artırıp veya azaltarak, immün ve inflamatuvar cevabı baskılayabilir veya aktive edebilir. Sitokinler hedef hücrelerde,

hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak aynı hücreden sitokin sekresyonu (otokrin), bitişik hücrelerde (parakrin) veya uzak hücrelerde (endokrin) aktivasyona neden olabilirler⁹³.

Sitokinler etki mekanizmalarına göre proinflatuar ve antiinflatuar olarak adlandırılırlar. Proinflatuar sitokinler inflamasyonun başlangıcında salınırlar, immün cevabın başlaması ve sürdürülmesi için gereklidirler. İnsan immün cevabında temel proinflatuar sitokinler, TNF- α ve IL-1'dir. Sekonder veya bunlara yardımcı sitokinler ise, IL-6 ve IL-8'dir⁹⁴.

Bunun zıttı olarak anti-inflatuar sitokinler ise inflamasyonun daha sonraki evrelerinde salınırlar. İnflatuar cevabın kontrolü ve down regülasyonunu düzenlerler (Tablo-1)⁹⁵.

Tablo-1: İnflatuar özelliklerine göre bazı sitokinlerin sınıflandırılması⁹¹.

Proinflatuar	Anti-inflatuar	Çift Etki
TNF- α	IL-4	IL-6
TNF- β	IL-10	TGF- β
IL-1	IL-11	
IL-2	IL-13	
IL-8		
IL-12		
IL-15		
IL-17		
IL-18		
INF- γ		

Monosit, makrofaj, granüllü lokosit, endotel hücresi, dendritik hücre, keratinosit, T ve B lenfositleri, mast hücresi, tümör hücresi ve diğer pek çok hücre, sitokin sentezleme ve salgılama yeteneğine sahiptir^{95,96}. Sitokinler, genellikle geçici olarak etki gösterirler. Normal koşullar altında düşük konsantrasyonlarda bulunurlar⁹⁷.

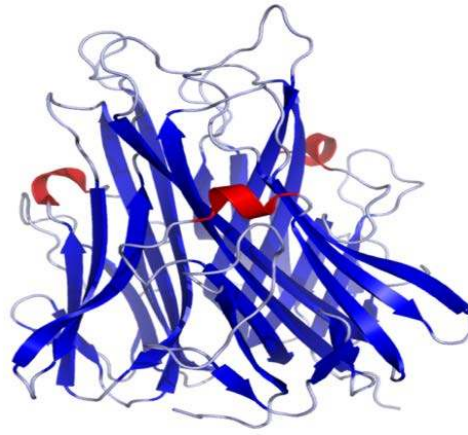
Birçok sitokin reseptörleri iki veya daha fazla zar geçişli polipeptid zinciri içerir. Bunlar sinyal iletim kompleksi şeklinde çalışırlar. Bunun yanında, çözünebilen sitokin reseptörleri hücre bağımlı reseptörlerle rekabet içindedir ve sitokin sinyallerini ayarlarlar. Çözülebilen sitokin reseptör seviyeleri enfeksiyon hastalarında (örneğin sepsis) ve enfeksiyon hastalıkları dışında (örneğin romatizmal hastalıklar) yükselir⁹⁵. Bu çözünebilen reseptörler geçirgen zarın ve sitoplazmik aralığın yok edilmesiyle ortaya çıkan mRNA şeklinde de olabilir. Çözünür sitokin reseptörlerinin sitokin konsantrasyonuna oranı, çözünür sitokin-reseptör kompleksinin oluşumunda önemli rol oynar. Örneğin düşük konsantrasyonda bulunduğu, çözünebilen reseptörler sitokin taşıyıcısı olarak görev yapar. Bu da sitokinlerin biyolojik aktivitesini stabilize eder ve etkinliğini uzatır. Bunun yanı sıra bu reseptörler yüksek konsantrasyonda bulunduğu zaman (örneğin bakteriyel enfeksiyonlar sırasında), sitokinlerin aktivitesini engellerler.

Bazı sitokinlerin biyolojik hareketi IL-1 reseptör antagonisti gibi reseptör antagonistleri tarafından düzenlenir. Sitokinlerin etkileri reseptör sayısı ve afinitesi, ikincil haberci, gen kopyalaması, sitokin üretimi ve salınması veya metabolizması ile düzenlenir.

2.2.4. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- α)

TNF'nin varlığı ilk kez kendiliğinden gelişen tümör vakalarında belirlenmiş ve farelerin deneysel subkutan tümörlerinde hemorajik nekroz oluşturduğu için bu ad verilmiştir⁹⁸. LPS'ye veya diğer sitokinlere cevap olarak mononükleer makrofajlar tarafından üretilir⁴⁸. Monositler ve makrofajlar TNF- α proteininin ana kaynağı olmakla birlikte aynı zamanda beyin glial hücreleri, karaciğer Kupffer hücreleri, deri keratinositleri, mast hücreleri, N-F lenfositleri, T lenfositleri ve B lenfositleri tarafından da üretilebilir. TNF- α 'nın LPS ile meydana gelen sepsis sendromunda sitokin basamaklarını uyararak etki gösteren ana mediatör madde olduğu tespit edilmiştir⁶²; IL-1⁵⁸, kemotaktik sitokinlerden IL-8⁶², nötrofilik kemoatraktanlardan IL-6⁶², genel hipotansiyon, pulmoner hipertansiyon ve miyokardiyal depresyondan sorumlu nitrik oksit (NO)⁴⁸, araşidonik asit

metabolizması ve mikrotrombüs teşekkülünden sorumlu sitokinlerin sentezini uyarmaktadır⁵⁴. Bulgular, TNF- α 'nın organizmaya giren bakteriye karşı meydana gelen cevapta konakçının bütünlüğünün sağlanmasında esas olduğunu göstermiştir. Ancak, katabolik bir mediatör olup, aşırı TNF- α sekresyonu konakçının ölümüne yol açmaktadır⁵⁸. Solubl TNF reseptör düzeyi (sTNFR) sepsiste TNF düzeyinden yüksek olup, aradaki fark yaşam oranı ile paraleldir.



Şekil-8: TNF- α 'nın Kristal Yapısı⁷⁹.

Tümör Nekrozis Faktörün Biyolojik Etkileri⁹⁸:

- İnfeksiyon bölgesine nötrofil ve monositlerin çekilmesini sağlar.
- Vasküler endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır.
- Endotelyal hücrelerden ve makrofajlardan kemokin salınımını artırır.
- Makrofajlardan IL-1 salınımını artırır.
- Bazı hücre tiplerinin apoptozisini artırır.

Alman Fizikçi P. Bruns, insanlarda bakteriyel enfeksiyonun tümör regresyonuna yol açtığını bildirmiştir⁹⁹. Daha sonra Amerikalı Onkolog W. Coley, bakteriyel ekstreleri insan kanserlerinde başarılı olarak uyguladığını rapor etmiştir¹⁰⁰. Gratia ve ark. hayvan modelinde bakteriyel ekstrelerin tümörde küçülmeye yol açtığını göstermiştir¹⁰¹. Shear ve ark. bakteriyel ekstrelerden elde ettikleri LPS'nin tümör regresyonuna yol açtığını gösterdiler¹⁰². G. Algire ve ark. LPS sistemik hipotansiyon, tümör damarlanmasında kollaps, tümör hücre

anoreksisi yaparak tümörde hemorajik nekroza yol açtığını gösterdiler¹⁰³. O'Malley ve ark. LPS'nin tümör üzerine doğrudan etkisinin olmadığını, ve serumda bir faktörün salgılanmasını arttırarak etki gösterdiklerini ortaya koydular ve bu faktöre "Tümör nekrozis faktör alfa" adını koydular¹⁰⁴. L Old ve ark. bu faktörün makrofajlar ve B lenfoblastoid hücre serisi tarafından salgılandığını gösterdi¹⁰⁵.

2.2.5. Nükleer faktör - Kappa B (NF-κB)

Nükleer faktör - Kappa B (NF-κB) indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (Cox-2) gibi inflamatuvar genlerin üretiminden sorumlu olan redoks-duyarlı transkripsiyon faktörüdür¹⁰⁶. Oksido-inflamatuvar kaskadın tetiklendiği, yoğun sitokin salıverilmesi ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun arttığı akut respiratuvar distres sendromu (ARDS), sepsis ve multi-organ yetmezliği gibi klinik durumlarda patofizyolojide önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

NF-κB reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS), hipoksi/anoksi, hiperoksi, sitokinler, protein kinaz C aktivatörleri, "mitogenactivated" protein kinaz (MAPK) aktivatörleri, lipopolisakkarit (LPS), dsRNA proteini gibi bakteriyel veya viral ürünler ve UV radyasyon tarafından aktive edilebilir¹⁰⁹⁻¹¹¹. NF-κB doğal ve kazanılmış immünite genlerinin her ikisini de düzenler; bu genlerin içinde proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, lökosit adhezyon molekülleri ve inflamatuvar enzimler vardır¹¹¹.

NF-κB, 1986'da, matür B lenfositlerinin çekirdeklerinde immünglobulin kappa hafif zincir *enhancer* bölgesinde 10 baz çiftlik (bç) DNA elemanına bağlanan bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır¹¹². Memeli hücrelerinde beş ayrı NF-κB alt ünitesi tanımlanmış ve klonlanmıştır. Bunlar NF-κB₁ (p50/p105), NF-κB₂ (p52/p100), Rel-A (p65), Rel-B ve c-Rel'dir^{113,114}. İnsan NF-κB₁ (Nükleer faktör-kappa B₁) geni p105 ve p50 proteinlerini kodlar¹¹⁵. NF-κB₁ ve NF-κB₂'i p50 ve p52'yi serbestleştirmek için proteolitik bir işlemde geçerler. NF-κB alt üniteleri aktivasyon öncesi sitoplazmada homo- veya hetero-

dimerizasyona uğrarlar. Oldukça iyi korunan 300 aminoasitlik rel homoloji alanı (*rel homology domain*-RHD) bu dimerizasyondan sorumludur. Ayrıca RHD, DNA'ya bağlanma ve IκB (NF-κB'nin hücre içi inhibitörü) ile ilişkiden de sorumludur¹¹⁶.

Stimülasyon öncesi çoğu hücrede NF-κB dimerleri sitoplazmada IκB ailesi üyeleriyle ilişki içinde inaktif şekilde bulunurlar. IκB ailesi yapısal olarak ilişkili IκB-alfa (en çok), IκB-beta (B), IκB-gama (γ), IκB-epsilon (ε), IκB-zeta (ζ), p105, p100 ve bcl-3 proteinlerini içerir¹¹⁶⁻¹¹⁷.

NF-κB; gelişimsel işlemler, inflamasyon, immün cevap, hücre büyümesi, kanser, ateroskleroz, diabetes ve bazı viral genlerin ekspresyonunu içeren birçok fizyolojik işlem ve hastalık ile ilişkilendirilmiştir^{118,119}. NF-κB 150'den fazla farklı hücre dışı uyaran (bakteriler, virüsler, interleokinler, büyüme faktörleri, kemoterapötik ajanlar, çeşitli fizyolojik, fiziksel ve oksidatif uyaranlar vb.) ile indüklenir. NF-κB ayrıca 150'den fazla hedef genin (sitokinler, kemokinler, interleokinler, immünglobulinler, akut faz proteinleri, hücre adezyon molekülleri, hücre proliferasyonu, anti-apoptoz, hücre migrasyonu ve anjiyogenez ile ilişkili) ekspresyonunu düzenler¹²⁰.

Tablo-2: NF-κB yolağının aktivatörlerinden bazıları¹¹⁸.

Kimyasal Ajanlar	Forskolin, kalsiyum iyonoforları
Kemoterapötik Ajanlar	Sisplatin, doksorubisin, etoposid, tamoksifen, vinkristin
Sitokinler	İnterlökün 1, 2, 12, 15, 17, tümör nekroz faktörü (TNF) α & β
Çevresel	Kobalt, sigara içimi, kurşun
Büyüme Faktörleri&Hormonlar	İnsan büyüme faktörü, insülin, PDGF
Mikroorganizmalar& İlişkili Ürünleri	Bakteriler (<i>Listeria</i> , <i>Mycobacteria</i> , <i>Neisseria</i>), lipopolisakkarit, stafilokok enterotoksin A&B, virüsler (Hepatit B, HIV, EBV, CMV)
Fizyolojik Stres	Hemoraji, hiperglisemi, oksidatif stres & iskemi
Fizyolojik Aracılar	Bradikinin, hemoglobin, potasyum, lökotrien B4

Tablo-3: NF- κ B ile düzenlenen hedef genlerden bazıları¹¹⁸.

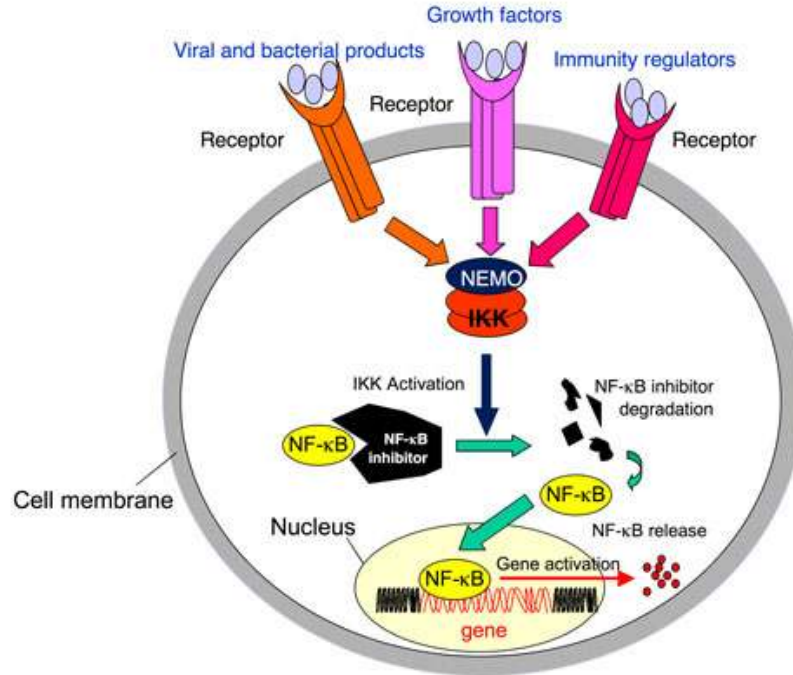
Akut Faz Proteinleri	Anjiyotensinojen, CRP, kompleman faktör B & C4
Hücre Adezyon Molekülleri	Platelet adezyon reseptörü, vasküler hücre adezyon molekülü
Sitokinler	İnterferon- γ , interlökin 1, 2, 6, 8, 9, 11, 12 & 15, TNF- α & - β
Enzimler	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, lizozim, ksantin oksidaz
Büyüme Faktörleri	Koloni stimüle edici faktörler, trombospodin, vasküler endotelial büyüme faktörü
İmmün Cevap	İmmünglobulin ϵ & κ zincirleri, interlökin 2 reseptörü, beta-2 mikroglobulin
Apoptoz Düzenleyicileri	Fas, apoptozu indükleyenler
Stres Cevap Genleri	Anjiyotensin II, siklooksijenaz-2, fosfolipaz A2
Transkripsiyon Faktörleri	c-Myc, c-rel, p53, jun B, Rel/ NF- κ B inhibitörü (I κ B)
Diğerleri	Apolipoprotein C III, faktör VIII, alfa-1 antitripsin

2.2.5.1. NF- κ B Sinyal Yolu

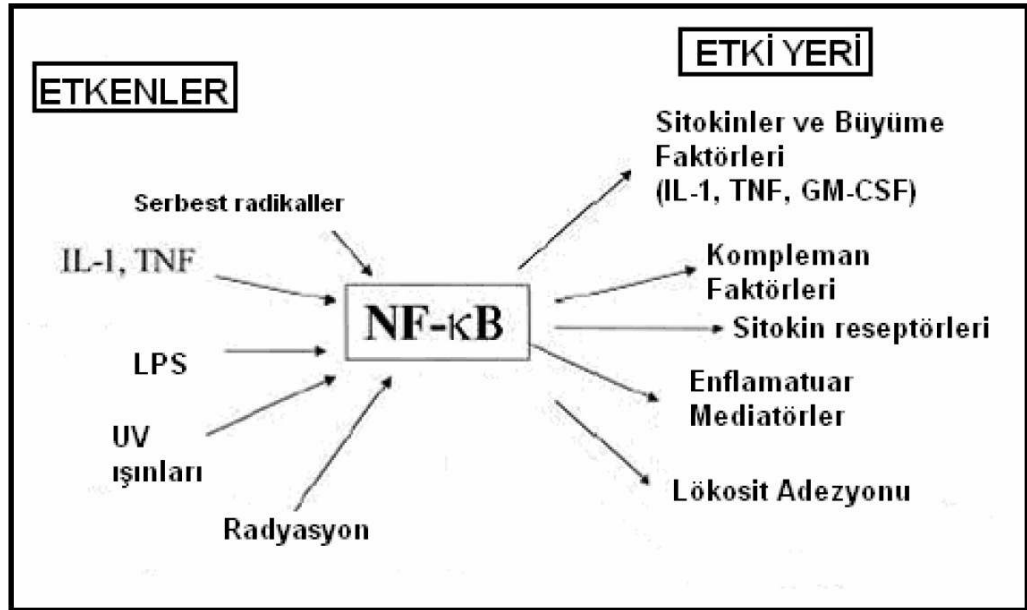
NF- κ B; I κ B ile kompleks halde inaktif olarak sitoplazma içinde bulunur. Ligandlar, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlandıklarında, NF- κ B'nin uyarı düzenleyici proteinleri olan, I κ B- α ve I κ B- β 'nin N-terminallerindeki serin 32 ve 36 kalıntıları, fosforilize olur. Fosforilizasyon sonrası I κ B'ler ubiquitimize olur ve proteolitik yolla yıkılırlar. I κ B'nin yıkımı sonrası sitoplazmada serbest kalan NF- κ B nukleusa transloke olur. Aktive NF- κ B; nukleusta spesifik genlerin başlatıcı veya arttırıcı bölgelerine bağlanarak ilişkili transkripsiyonu düzenler (Şekil-9)^{121,122}.

NF- κ B'nin aktivasyonunda en önemli basamak I κ B'ların 700 – 900 kDa multimerik kompleksler ile fosforilasyonudur; sonuçta I κ B kinaz (IKK) kompleksi oluşur. IKK kompleksi iki katalitik alt üniteden (IKK1/IKK α ve IKK2/IKK β) oluşur. NF- κ B için gerekli alt düzenleyiciler NEMO, IKK, "IKK-associated protein" veya FIP-3'tür. NEMO'nun kendisi kinaz olmamakla beraber

önemli protein-protein ilişkisine aracılık ederler. IKK kompleksinin aktivasyonuna "upstream" kinazlar ("NF- κ B - including kinaz" (NIK) ve MAP3K ailesinden MEKK1) tarafından IKK veya IKK'nin fosforilasyonu aracılık eder¹²⁴⁻¹²⁶. I κ B serin kalıntılarının fosforilasyonu ile IKK kompleksi eski durumuna döner. NF- κ B'nin sitokine bağlı aktivasyonunda IKK'nin rolü yoktur; IKK proinflamatuvar uyarılar tarafından NF- κ B'nin aktivasyonunda rol alır. Son zamanlarda LPS'in neden olduğu I κ B kinaz (IKKi) gösterilmiştir¹²⁷. LPS ve proinflamatuvar sitokinler IKK'nin ekspresyonuna neden olurlar. IKK'inin aşırı ekspresyonu sonucu I κ B tercihen 36 nolu Serin amino asidi fosforile olur. Bundan başka IKKi'nin N-terminal uyarımı yapan TNF receptor-associated factor-1 (TRAF1) tarafından fosforile ettiği gösterilmiştir¹²⁸. Bu nedenle IKKi diğer IKK'lerden daha fazla fonksiyona sahiptir. NF- κ B aktivasyonu için kinaz kaskadı birçok uyarı bağımlı yolak izler. Uyarının tipi ve hedef hücredeki etki bölgesinin sayısı NF- κ B aktivasyonu sonrası transkribe edilen ürünün aktivitesi ve miktarını etkileyecektir^{127,128}.



Şekil-9: NF- κ B sinyal yolunun aktivasyon mekanizması¹²³.



Şekil-10: NF-κB aktivatörleri ve etki yerleri¹²⁹.

2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Moleküler oksijenin özellikleri: Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahiptir¹³⁰⁻¹³⁴.

Ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektrona sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Bu tip maddeler serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler^{131,132,135}.

Serbest radikal tanımına göre O_2 bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer.

Biradikal oksijenin elektronlarından birinin, enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle, **singlet oksijen**

oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen ürünüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır^{131,132}.



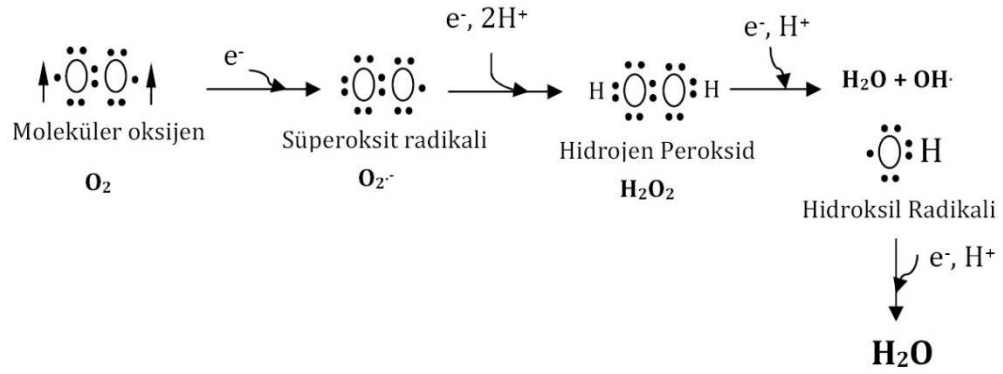
Şekil-11: Singlet Oksijen Türleri.

O₂, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede **reaktif oksijen türleri (ROS)** oluşturma eğilimindedir. ROS'ları 2 grupta incelemek olasıdır. Birinci grup serbest radikallerdir. İkinci grupta ise hidrojen peroksit (H₂O₂), nitrik oksit (NO), singlet oksijen gibi moleküller yer alır. Bu moleküller son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron taşımadıkları için, serbest radikal değildir. Bu tip maddelere **nonradikal reaktif oksijen ürünleri** adı verilir (Tablo-4)¹³³.

Tablo-4: Başlıca ROS'lar ve antioksidanları¹³³.

	ROS	Antioksidan
¹ O ₂	Singlet oksijen	Vitamin A, β-karoten, vitamin E
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali	Süperoksit dismutaz (SOD), β-karoten
OH [•]	Hidroksil radikali	
RO [•]	Alkoksil radikali	
ROO [•]	Peroksil radikali	Vitamin E, vitamin C
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit	Katalaz, glutatyon peroksidaz
LOOH	Lipid peroksitleri	Glutatyon peroksidaz

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede peroksit radikalleri ($\text{ROO}^\cdot$), alkoksi radikalleri ($\text{RO}^\cdot$), tiyil radikalleri ($\text{RS}^\cdot$), sulfenil radikalleri ($\text{RSO}^\cdot$), tiyil peroksit radikalleri ($\text{RSO}_2^\cdot$), reaktif nitrojen bileşikleri gibi çeşitli ROS'ların oluşumuna neden olurlar^{132,133}. Şekil-12'de genel ROS oluşum yolu izlenebilir.



Şekil-12: Oksijenin suya indirgenmesi sırasında ROS'ların oluşması.

2.3.1. Nitrit Oksit (NO)

Nitrojenin oksidasyonu: Nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) ve nitrojen dioksit (NO_2) tek sayıda elektron taşıdıkları için radikal olarak tanımlanabilirler^{131,134,136}. Ancak nitroz oksit (N_2O) radikal değildir. $\text{NO}^\cdot$ tüm fizyolojik ve patolojik süreçlerde, önemli bir mediatör olarak karşımıza çıkar. $\text{NO}^\cdot$ sentezini yapan NO sentaz (NOS) enziminin, farklı genler tarafından kodlanan 3 izoformu bulunmaktadır¹³⁶⁻¹³⁹. Tüm izoformlar L-arjininin, sitrullin ve NO 'ya dönüşümünü katalizler. Reaksiyon O_2 , NADPH ve arjininin, guanidin nitrojenine gereksinim gösterir. Nöronal NOS (tip I, nNOS) ve endotelial (tip III, eNOS) Ca^{++} -Kalmodulin bağımlı, yapısal NOS tipleridir. nNOS nörotransmitter olan NO 'nun üretiminden sorumludur. eNOS tarafından üretilen $\text{NO}^\cdot$, endotel kökenli gevşetici faktör olarak bilinir ve vasküler düz kasın gevşemesini sağlayan temel uyarandır. eNOS ve nNOS fizyolojik durumlarda önemli fonksiyonlar yaparlar^{131,136}.

Uyarılabilen NOS (inducible NOS, iNOS, tip II) normal koşullarda aktif değildir. iNOS enfeksiyöz ve inflamatuvar proseslerde sitokinler ve/veya endotoksinlere bağlı olarak aktiflenir ve bol miktarda NO⁻ üretimi gerçekleştirir. iNOS hepatositler, makrofajlar, nötrofiller, düz kas hücreleri ve kondrositler gibi birçok hücrede bulunur. iNOS'un artmış ekspresyonu sepsis, astım, romatoid artrit, aterosklerotik lezyonlar, tüberkuloz, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve iskemi-reperfüzyon zedelenmesi gibi birçok hastalıkta ve patolojik süreçte gösterilmiştir. Bu hastalıklarda fazla miktarda ve sürekli NO üretiminin hastalık semptomlarının oluşumundan da sorumlu olduğu sanılmaktadır^{131,136}.

NO yapısal enzimler olan eNOS ve iNOS tarafından sentezlenir. eNOS sadece sinüzoidal endotelyal hücrelerde üretilmektedir¹⁴⁵. iNOS ise transkripsiyonel olarak, endotelyal hücreler, hepatositler ve diğer doku hücreleri tarafından düzenlenmektedir. NO hücre membranından serbestçe difüze olur ve sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek vazodilatasyon oluşturur. Vazokonstriktörlerin etkin olduğu dönemde, NO presinüzoidal ve sinüzoidal alanda vazodilatasyonu uyandır¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Vazodilatasyon etkisine ek olarak NO, O₂⁻ ile reaksiyona girer ve potansiyel bir oksidan olan ONOO⁻'i meydana getirir¹⁴⁹. Aslında O₂⁻'de NO ile SOD'dan daha hızlı reaksiyona girmektedir¹⁴⁹. Genel olarak eNOS'un ürettiği NO kalbin kan akımının devamlılığı açısından önemlidir. Bunun yanında iNOS'un ürettiği fazla miktardaki NO'da hipotansiyon oluşumu, şok yanında peroksinitrit aracılı hücre hasarından da sorumludur¹⁵⁰.

2.3.2. Lipit Peroksidasyonu

Araşidonik asit metabolizması, reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu, çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelirler. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "**Enzimatik Lipid Peroksidasyonu**" denir.

Serbest radikallerle prostaglandin metabolizması birbiriyle yakından ilişkilidir^{133,140,142}.

ROS'ların lipidlere etkileri: Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı, en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar^{131,133,140}.

Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren, zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında, lipid radikalleri ($L^{\cdot}$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO^{\cdot}$) oluşması, ROS'ların neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna, "**nonenzimatik lipid peroksidasyonu**" denir^{131,133,140}.

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri, poliansature yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu, genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.

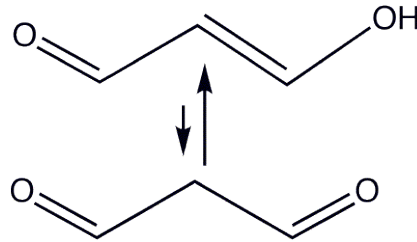
$L^{\cdot}$ dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. $L^{\cdot}$ O_2 'le etkileşmesi sonucu, $LOO^{\cdot}$ oluşur. $LOO^{\cdot}$ membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşür ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder^{131,133,140}.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkılımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organellerde, lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak H_2O_2 'den, Fenton

reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir^{131,133,140,143,144}. LOOH yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.

Peroksidasyon sırasında açığa çıkan malondialdehit (MDA) gibi yıkım ürünleri, çeşitli hücre bileşenleriyle reaksiyona girebilmekte ve böylece hücre yapısı ve fonksiyonunu bozabilmektedir. Lipid peroksidasyonunun bilinen en yaygın son ürünü olan MDA, ikiden fazla çift bağ taşıyan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşmaktadır. Nispeten küçük yapısı ve nonpolar özellikte olması; MDA'nın biyomoleküllerle etkileşimini kolaylaştırmakta ve başta membranlar olmak üzere, aşağıda sıralanan yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açmaktadır^{151,152}:

- Membran permeabilite, deformabilite, akışkanlık gibi özelliklerin değişmesi sonucunda iyon transportunun ve buna bağlı olarak intrasellüler iyon dengesinin bozulması;
- Oksidatif hasar nedeniyle enzim aktivitesine sahip bazı membran proteinlerinde aktivite kaybı;
- Nükleer membrandan kolayca difüze olabilmesi nedeniyle DNA ile etkileşimi: DNA zincirinin kırılması.



Şekil-13: Malondialdehit (MDA).

MDA kanda, dokuda ve idrarda ortaya çıkar. Yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik

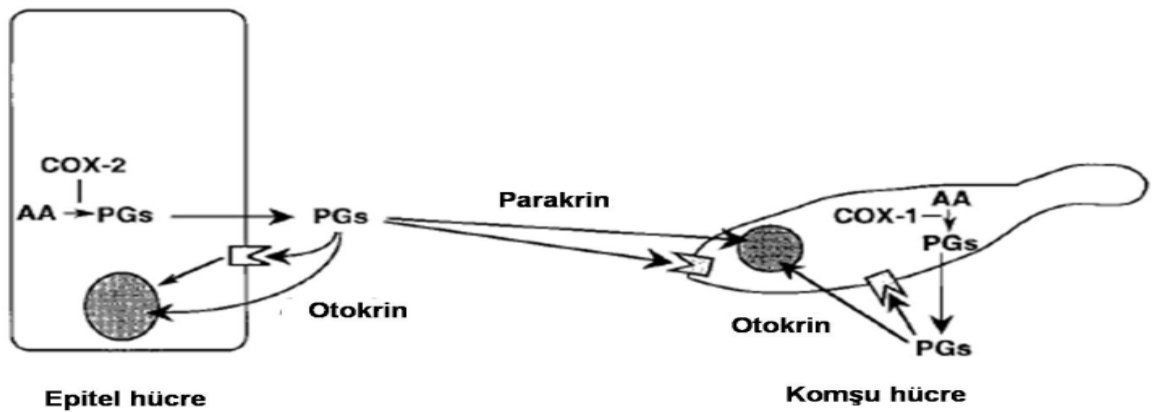
örneklerde MDA ölçülmesi, lipid peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılır^{133,140,141}.

2.4. Siklooksijenazlar (COX)

Prostaglandin endoperoksit sentaz (PTGS) enzim kompleksi [Prostaglandin G/H sentaz (PGHS), Siklooksijenaz (COX)], hayvansal yağlardan elde edilen doymamış yağ asitlerindeki araşidonik asit (AA)'ten PG'lerin biyosentezinde görevli olan anahtar bir enzimdir¹⁵³.

Prostaglandin (PG) sentezinde ilk basamak, AA'nın prostaglandin G₂ (PGG₂) ve prostaglandin H₂ (PGH₂) oluşturmak üzere COX enzim kompleksi tarafından oksitlenmesi ve çembersel şekil almasıdır. Bu enzim kompleksi biri COX, diğeri peroksidaz (POX) olmak üzere iki katalitik aktiviteye sahiptir^{153,154}.

PG'lerin büyük bölümünün öncül maddesi olan AA, pekçok memeli tarafından gereksinim duyulan esansiyel yağ asididir ve hücrelerin plazma zarlarını oluşturan lipid çift tabakada bulunan fosfolipidlerle esterleşmiştir. AA, fosfolipaz A₂ (PLA₂) enzimi tarafından membrana bağlı fosfolipid molekülünden serbest kalır¹⁵³⁻¹⁵⁵.



Şekil-14: PG'lerin otokrin ve parakrin etkileri¹⁵⁶.

COX'un, sentezine aracılık ettiği PG'ler hayvanların vücutunda önemli görevleri olan yağ asitlerinden enzimatik olarak türeyen lipid tabiatında lokal hormonlardır. Hızla degrade olmaları sebebiyle vücudun diğerk bölgelerine taşınamazlar, oluşturuldukları yerde etkindirler (otokrin ve parakrin) (Şekil-14)¹⁵³⁻¹⁵⁵.

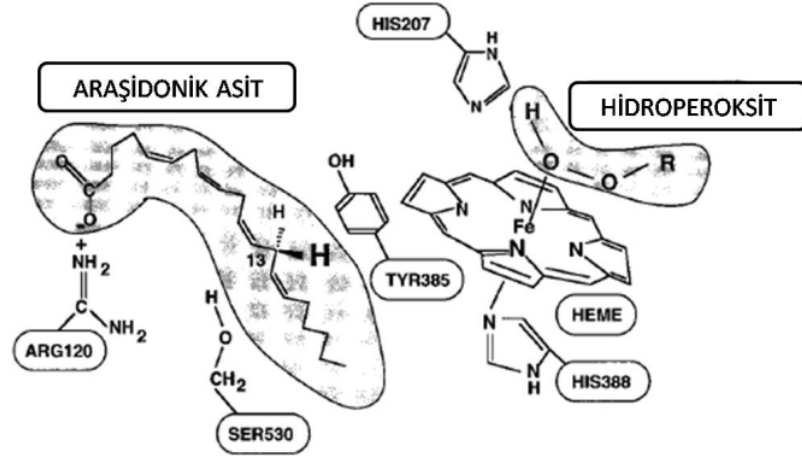
PG'ler 20 karbon atomu ve 5-karbon halkası içerirler. Teknik olarak hormon sayılmalarına karşın güçlü fizyolojik etkileri olan mediyatörlerdir. Etkileri bakımından hormonlara benzetilmelerine rağmen, özgün bezlerden ziyade hemen hemen tüm dokulardan oluşmaları ve genellikle lokal olarak etki etmeleri bakımından hormonlardan ayrılırlar. PG'ler çok sayıda fizyolojik yanıtı neden olurlar. Bu bileşikleri çalışmak çok güçtür. Çünkü çok kısa yarı ömre sahiptirler ve çok küçük miktarlarda üretilirler. Kanda yüksek konsantrasyonlarda bulunmazlar ve kayda değer bir miktarda depolanmazlar¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

COX tepkimesinin son ürünü olan PGH₂, etkinlikleri dokulara göre değişen çeşitli sentazlar tarafından PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ ya da tromboksan A₂ (TxA₂)'ye dönüştürülür¹⁵³⁻¹⁵⁵.

COX enziminin, Siklooksijenaz-1 (COX-1, PGHS-1) ve Siklooksijenaz-2 (COX-2, PGHS-2) adı altında iki izoenzimi tanımlanmıştır. Bilindiğı gibi, izoenzimler aynı tepkimeyi katalizleyen fakat amino asit dizilimlerindeki değişiklikler nedeniyle ayrı fiziksel özellikleri olan enzimlerdir. Farklı sayıda yüklü amino asit taşırlar ve elektroforezde birbirlerinden ayrılabilirler. İzoenzimler gen duplikasyonları ile oluşmakta ve genomda birbirlerinden ayrılarak bağımsız bölgelere yerleşmektedirler^{153,154}.

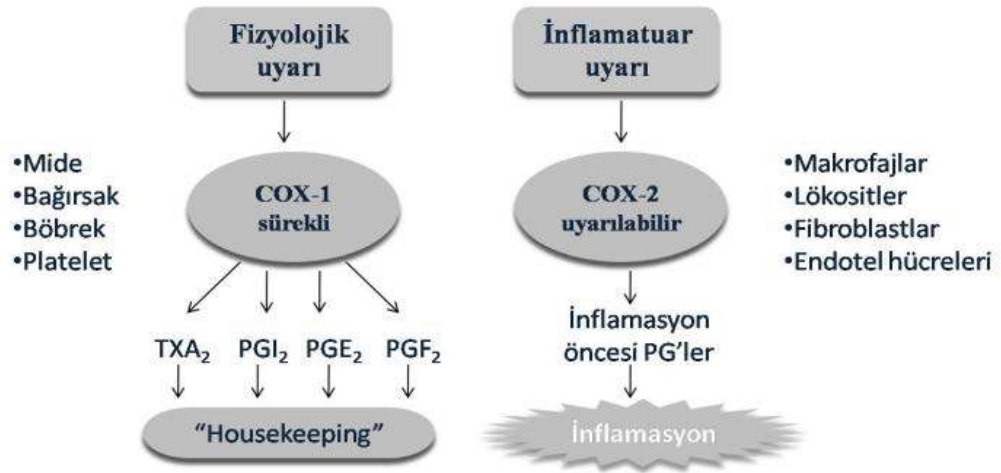
COX-1 ve COX-2 yapıları, "hem" prostetik grubunu taşıyan, glikozillenmiş integral membran proteinleridir. Alfa heliks yapısında olan bu homodimerler, endoplazmik retikulumun lümene bakan yüzünde, nükleus dış zarında ve nükleus iç zarının lümene bakan yüzünde yer alırlar^{158,159}.

COX enzim kompleksinin COX aktivitesine sahip bölgesi, enzimin merkezinde yer alan hidrofobik bir kanaldır. COX tepkimesinin başlaması için hidroperoksit grubuna ihtiyaç vardır ve 2 molekül O_2 'e gereksinim duyar. Öncelikle peroksidaz (POX) aktivitesine sahip bölgede bulunan “hem” grubu, hidroperoksit ile bağlanarak oksidasyona uğrar. Okside olan “hem” grubu yakınında bulunan tirozini (Tyr-385) okside eder. Oluşan tirozil radikali ise AA'ye bağlanarak bir hidrojeni (H) koparır. Böylece COX katalizi başlar. Ser-530, aspirin asetilasyon bölgesi, Arg-120 hidrofobik yağ asidinin bağlanma kanalının ağzında yerleşmiştir (Şekil-15) ¹⁵⁵.



Şekil-15: COX enzim kompleksinin COX ve POX aktivitesine sahip bölgelerinin modeli ¹³².

COX'un her iki izoformu benzer yapısal özellik (%60 homoloji) göstermektedir. Her iki enzim de aynı substratı (AA) kullanmasına ve aynı katalitik mekanizma ile aynı ürünü (PGH_2) oluşturmaya rağmen bu iki enzim arasında genel bir ayırım yapılacak olursa: COX-1'in fizyolojik, COX-2'nin ise patolojik bir enzim olduğu söylenebilir. COX-2'nin patolojik olarak nitelendirilmesinin temel nedeni: COX-2'yi indüklediği bilinen uyarıların hemen hepsinin inflamasyon ile alakalı olmasıdır (Şekil-16) ¹⁵³⁻¹⁵⁶.



Şekil-16: COX-1 ve COX-2'nin etki mekanizması¹⁵³.

2.4.1. Siklooksijenaz-2 (COX-2)

1991 yılında çeşitli laboratuvarlarda COX aktivitesine sahip ikinci bir gen ürünü yani COX-2 tanımlanmıştır^{161,166}.

COX-2 geni, 1.kromozom (1q25.2-q25.3) üzerinde yerleşmiştir. Bu gen 8.3kb büyüklüğündedir ve 4.5kb'lık bir mRNA'yı kodlar. COX-2 izoenzimi 604 amino asitten oluşur ve yaklaşık 72000 Dalton ağırlığında proteini şifreler (Şekil-17)¹⁶¹⁻¹⁶³.

Baskılayıcı bir role sahip olan COX-2, inflamasyondan sorumlu olan bir izoenzimdir. COX-2 sağlıklı hücrelerde normal şartlarda bulunmaz. COX-2 enzimi yangıda veya iltihapta çok önemli role sahiptir. COX-2, akut ve kronik inflamasyon gibi patolojik durumlarda önemli rolleri olan PG'lerin (PGE₂ ve PGF₂) sentezinden sorumludur¹⁵³⁻¹⁵⁷.

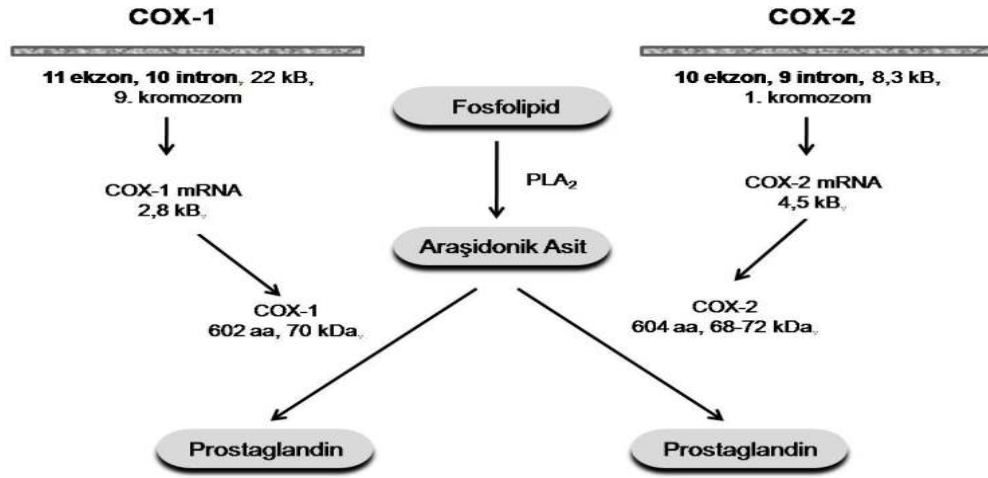
COX-2, çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri veya mitojenler tarafından uyarılarak inflamatuvar süreçte görev alan makrofajlar, monositler, sinoviyal hücreler, kondrositler, fibroblastlar ve endotel hücrelerinde ifadenir. İnterlökin-1 α ve β (IL-1 α/β), Tümör Nekroz Faktör - Alfa (TNF- α), Endotel Hücresi Büyüme Faktörü (ECGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi uyarıcı

ve glukokortikoid ve interlökin-4,10,13 (IL-4, IL-10, IL-13) gibi baskılayıcı rolü olan çeşitli aracı moleküller ile enzimin ifadenmesi düzenlenir^{156,164,165}. COX-2 ifadenmesini düzenleyen aracı moleküller Tablo-5’dedir^{164,165}.

COX-2 geninin transkripsiyonu çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. COX-2 geninin 5’ ucunda TATA kutusu ve çeşitli transkripsiyon faktörleri için bağlanma dizisi yer alır. COX-2 geninin 5’ promotör bölgesinde 2 varsayılan nükleer faktör - kappa B (NF-κB) bağlanma bölgesi vardır. Bu transkripsiyon faktörleri NF-κB, Aktivatör protein-1 (AP-1), siklik AMP cevap elemanı bağlanma proteini (CREB), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP β ve δ), upstream uyarıcı faktör-1 (USF-1)’dir. NF-κB ve AP-1, inflamasyon ve hücrel uyarım gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alan hedef genlerin ifadenmesini bağımsız olarak ve koordineli bir şekilde düzenler. Her iki transkripsiyon faktörü de septik şok sırasında oksidatif stresin gelişimine neden olur^{156,164,165}.

COX-2 ifadenmesi ve buna bağılı olarak PGE₂ ve PGF₂ düzeyi inflamasyon durumlarında artar. Bundan dolayı da COX-1 ve COX-2 enzimlerinin düzeyleri septik şokta önem kazanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada COX-1 ve COX-2 miktarlarının septik şokun başlamasından sonra değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir^{156,166,167}.

Uyarılabilen form olan COX-2 temel olarak böbrekte eksprese olur ve böbreğin fizyolojik düzenlenmesinde rol oynar, renal hemodinamik düzenlenmede yer alır ve renin salınımını uyarır. COX-2 mRNA’sı ve immünoreaktif proteini yetişkin memeli böbreğinde saptanabilir düzeylerde düşüktür. Renal korteks içinde COX-2 mRNA’sı ve protein ifadenmesi makula densa hücrelerinde ve makula densaya komşu olan kalın kolun kortikal kısmına dağılmış hücrelerinde yerleşir¹⁶⁸⁻¹⁷².



Şekil-17: COX-1 ve COX-2'nin lokalizasyonu ve miktarları¹⁶⁶.

2.4.2. COX-1 ve COX-2'nin Karşılaştırılması

Tablo-5: COX-1 ve COX-2'nin karşılaştırılması¹⁶⁴⁻¹⁶⁵.

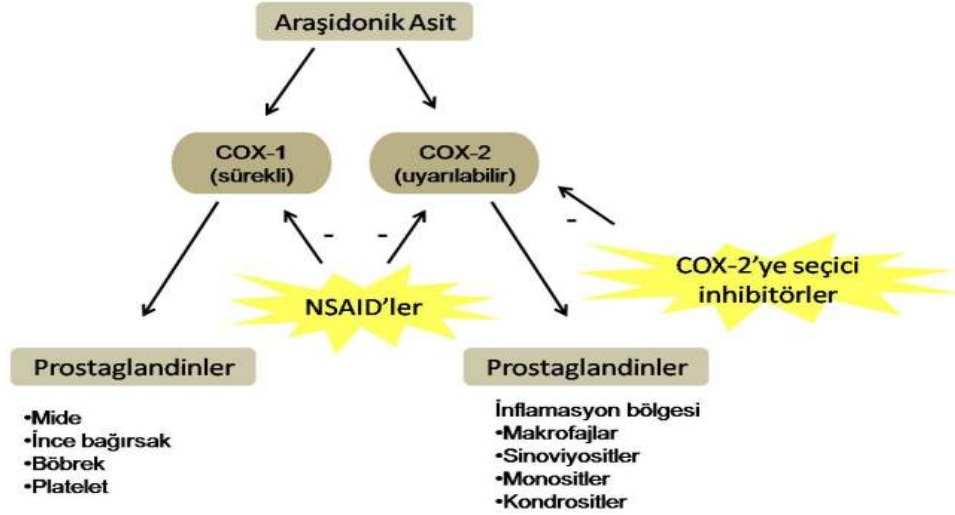
Özellik	Cox-1	Cox-2
Kromozomal Lokasyon	9q32-q33.3	1q25.2-q25.3
Genin Kopya Sayısı	Tek	Tek
Gen Büyüklüğü	Yaklaşık 25kB	Yaklaşık 8,3kB
Ekzon ve İntron Sayısı	11 Ekzon ve 10 İntron	10 Ekzon ve 9 İntron
mRNA uzunluğu	2,8kB	4,5kB
Kodlanan Bölgenin Uzunluğu	1,797 Nükleotid	1,812 Nükleotid
Promotör	TATA Kutusu Yok	TATA Kutusu Var
5' Yukarı Bölgesi	AP-2, GATA-1, NF-IL6, NF- κ B, PEA-3, SP-1, SSRE	AP-2, C/EBP, CRE, GATA-1, GRE, NF-IL6, NF- κ B, PEA-3, SP-1
3' Translasyona Uğramamış Bölge	Yok	AUUUA Tekrarları

İfadelenme	Sürekli	Uyarılabilir (sitokinler, büyüme faktörleri v.s)
Protein Uzunluğu	602 amino asit	604 amino asit
Protein Ağırlığı	74 kDa	70 kDa
Glikozilasyon Bölgesi Sayısı	3	3-4 (değişken)
Kofaktör	Hem	Hem
Substrat	AA	AA ve Diğerleri
Ürünleri	PGD ₂ , PGE ₂ , PGF ₂ , PGI ₂ , TXA ₂	PGE ₂ , PGI ₂ , PGF ₂
Kuaterner Yapı	Homodimer	Homodimer
Hücre İçi Yerleşim	Endoplazmik Retikulum	Endoplazmik Retikulum ve Çekirdek Zar
Fizyolojik Etkisi	Platalet Oluşumu, Midedeki Mukus Üretimi ve Böbrekte Damar İçinde Su ve Tuz Dengesi ve Renin Salınımı	Öncül Enflamatuvar PG'ler ve Diğer Enflamatuvar Aracıların Sentezi
Farmakolojisi	Steroid Olmayan Yangı Karşıtı İlaçlar (NSAİD) Tarafından İnhibe Edilir.	NSAİD ve COX-2'ye Spesifik İnhibitörler (COXIBs) Tarafından İnhibe Edilir.

2.4.3. Siklooksijenazların İnhibisyonu

PG'lerin yangı yanıtına aracılık etmede taşıdıkları önem nedeniyle PG yapımını engelleyen ilaçların ağrıyı gidermesi gerekir. PG endoperoksit sentaz (COX) enziminin COX aktivitesini aspirin, ibuprofen, indometazin ve fenilbutazon gibi steroid olmayan yangı karşıtı ilaçlar (NSAİD) ve yeni bir sınıf olan COX-2'ye spesifik inhibitörler [örneğin; Celebrex ve Vioxx (COXIBs)]

tarafından inhibe eder. Böylece AA'ten çeşitli PG'lerin sentezi önlenir (Şekil-18)^{153,154,163}.



Şekil-18: NSAİD'lerin COX-1 ve COX-2 üzerindeki etkisi¹⁵³.

2.5. Heat Shock Proteinleri (Hsp)

Hücresel düzeyde sıcak stres esnasında DNA sentezi, transkripsiyon, RNA işleme, translasyon olayları ve hücre döngüsünün ilerlemesi durdurulmaktadır. Proteinlerde denatürasyon ve yanlış katlanmalarla beraber hem lizozomal hemde proteozomal yollardan yıkımlanma artmaktadır. Membran geçirgenliği değişmekte ve hücre dışına iyon geçişinde artış olmaktadır. Heat shock proteinlerin (Hsp) genlerinin transkripsiyonu ve translasyonu başlamaktadır¹⁷³⁻¹⁷⁵.

Heat shock proteinleri (Hsp) olarak adlandırılmalarına karşılık, söz konusu proteinlerin sentezleri, hücreler radyasyon, kimyasal maddeler, oksijen yetersizliği, ağır metaller, alkol, septik şok vb. gibi stres faktörlerine maruz kaldıklarında da artmaktadır¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

Hücre içi sinyal ağını uyaran stres etmeninin şiddeti yeterli düzeyde ise, Hsp'inin ekspresyonu uyarılmaktadır. Hsp aynı zamanda “*stres proteinleri*” olarak da adlandırılmaktadır. Bu proteinlerin ekspresyonunun uyarılması ise “*stres tepkisi*” olarak tanımlanmaktadır¹⁷⁹.

Hsp'ini kodlayan genlerin bulunduğu gen ailelerinin üyeleri, evrim içerisinde hem fonksiyon hem de yapı olarak en çok korunmuş gen gruplarındandır^{179,180}. Bunlardan birtaneside Hsp-32 olarak bilinen Hem Oksijenaz-1'dir.

2.5.1. Hemoksijenaz (HO)

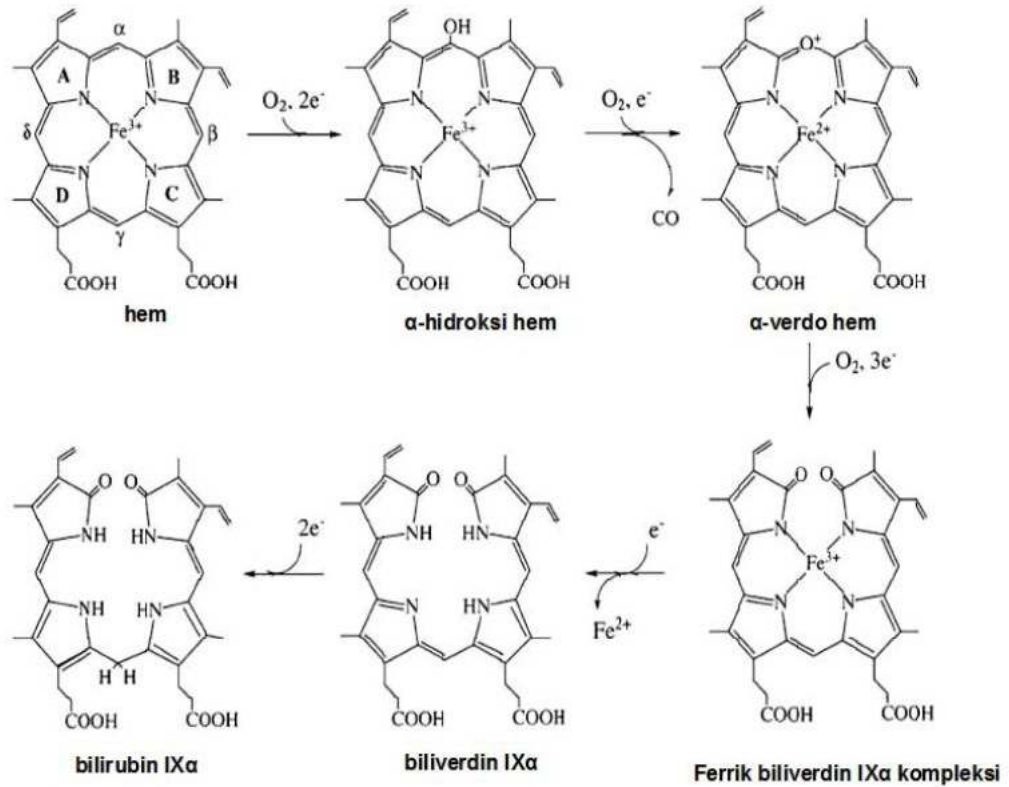
2.5.1.1. HO Geni

Heme oksijenaz (HO) ilk kez 1960'ların sonunda keşfedildi. 1986'da ise iki alt tipi olduğu Maines ve arkadaşları tarafından bulundu³¹⁸. Hem oksijenaz-1 (HO-1) ve HO-2 genleri 22q12 ve 16p13.3 kromozomları üzerinde lokalizedir ve %43 aminoasit dizilimi benzerdir. Şimdiye kadar tanımlanmış 3 tip HO enzimi vardır. HO-1 enzimi HO'nın indüklenebilir formudur. HO-2 kurucu enzim iken, HO-3'ün işlevi henüz kesinleşmemiştir¹⁸².

2.5.1.2. Hem Molekülünün HO ile Oksidatif Parçalanması

Hem oksijenaz basit protein yapısında olup O₂ aktivasyonu için prostetik gruba ihtiyaç duymadan substrat hem ile kompleks oluşturduğunda aktive olan mikrozomal bir enzimdir. Ferrik Hem-HO kompleksinin oluşması ile başlayan reaksiyon NADPH-sitokrom *p*-450 redüktaz tarafından aktarılan bir elektron ile yapıda bulunan demir indirgenir^{183,184}. Daha sonra moleküler oksijen enzim kompleksine bağlanarak okside formu oluşturur. Demire bağlı oksijen, redüktazdan bir elektron ve H₂O'dan proton alarak Fe⁺³-OOH yapısı meydana gelir. Fe⁺³-OOH'ın terminal oksijeni porfirin halkasının α -mezo karbonuna saldırarak α -mezo-hidroksihem yapısı oluşur¹⁸⁵. Oluşan bu yapı bir molekül oksijenle tekrar reaksiyona girerek Fe⁺³-verdo hem yapısını oluştururken CO

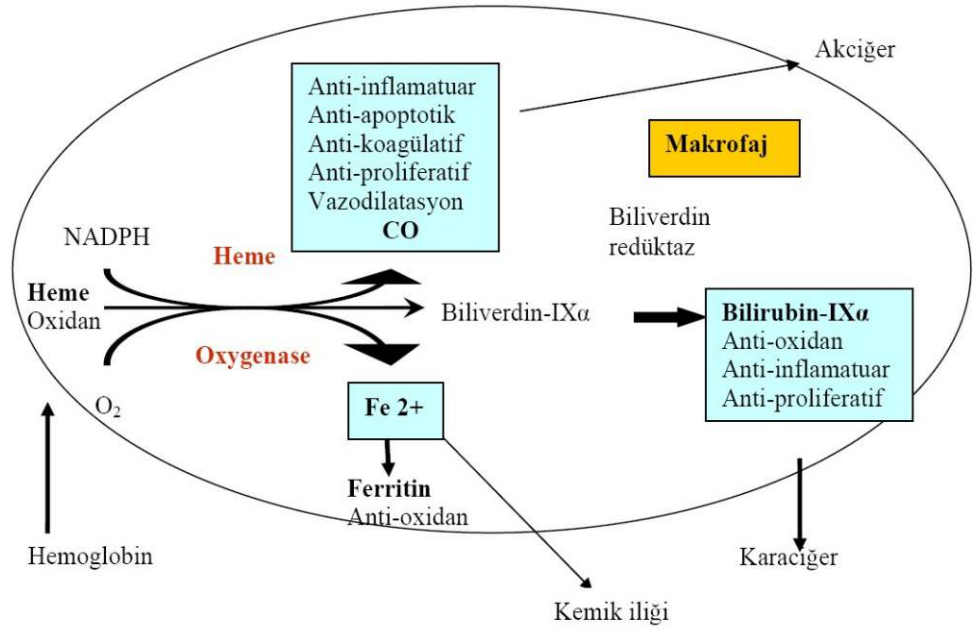
reaksiyondan salıverilir. Reaksiyonun bu basamağında bir elektron kullanılır. Bir sonraki basamak olan vero hem'in ferrik biliverdin-IX α kompleksine dönüşümü bir molekül oksijen ve 3 elektron gerektirmektedir. Reaksiyonda daha sonra demir ve biliverdin serbestleşir¹⁸³. Sonuç olarak reaksiyon sonunda bir molekül hemin CO, Fe⁺² ve biliverdine dönüşümü için 3 molekül O₂ ve 7 adet elektron kullanılmış olur. Oluşan biliverdin ise biliverdin redüktaz enzimi ile 2 elektron varlığında bilirubin IX α yapısına redüklenir (Şekil-19)¹⁸⁶.



Şekil-19: Hem parçalanma yolağı. Hemin biliverdin IX α 'ya dönüşümü HO tarafından katalize edilirken bilirubin IX α oluşumu biliverdin redüktaz varlığında gerçekleşir¹⁸⁶.

HO; başta karaciğer ve dalak olmak üzere, pankreas, bağırsak, böbrek, kalp, retina, prostat, akciğer, cilt, beyin, spinal kord, vasküler düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde mitokondri içinde aktivitesini gösterir. Hidrojen

peroksid, hem, okside olmuş LDL, sitokinler, endotoksin, ağır metaller, UV, nitrik oksit (NO) ve NO donörleri, hiperoksi, hipoksi ve büyüme faktörleri (PDGF, TGF- β) gibi çoklu uyaranlarla HO-1 enzimi uyarılabilmektedir (Şekil-20)¹⁸⁷.



Şekil-20: Heme oksijenaz enzimi ve son ürünler¹⁸⁷.

2.5.1.3. HO İzofomları ve Moleküler Özellikleri

Günümüze kadar hem oksijenazın genetik olarak farklı iki izoformu tanımlanmıştır: indüklenabilir formu HO-1 ve yapısal formu HO-2¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. HO-1 ve HO-2 aynı reaksiyonları katalize ederler. Katalize ettikleri reaksiyonda kullandıkları substrat, kofaktör ve koenzim aynıdır. Ancak farklı enzim kinetikleri, K_m değerleri, termostabiliteleri ve immünoaktiviteleri vardır^{188,189}. Bu enzimler farklı gen ürünleri olmalarına rağmen aminoasit veya nükleotid dizileri, amino asit kompozisyonları ve transkrip numaraları benzerlik gösterir. HO-1 aynı zamanda stress proteini Hsp32 olarak da bilinir¹⁹¹. HO-1'in moleküler ağırlığı yaklaşık 32 kDa¹⁹², HO-2'nin ise yaklaşık 36 kDa'dır¹⁹³. İnsan HO-1 ve HO-2 enzimleri, %42 oranında amino asit homolojisi gösterir. Ayrıca

her iki enzimde hücre membranlarına tutunmalarını sağlayan ve karboksil (-COOH) uçlarında bulunan benzer hidrofobik bölgelere sahiptir¹⁹⁴.

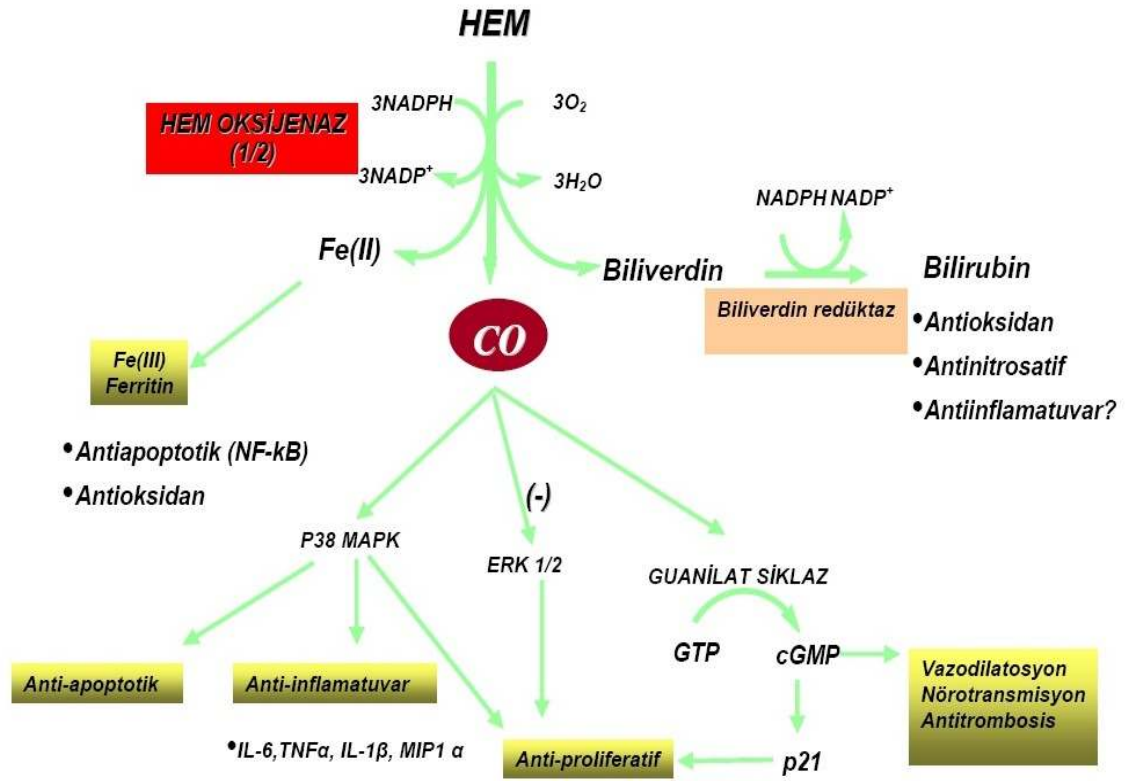
2.5.1.4. HO-1/HO-2 İndüksiyonu ve Regülasyonu

Yapısal hem oksijenaz formu olan HO-2 sadece adrenal glukokortikoidlere yanıt verirken, HO-1 kimyasal ve fiziksel birçok uyarıdan etkilenir. HO-1 ve HO-2 arasındaki bu farklılık enzimlerin promotör bölgelerinde regülatör elementlerin olup olmaması ile ilgilidir. Örneğin nükleer faktör kappa B (NF-κB), heat shock faktör, aktivatör protein veya metal regülatör element gibi regülatör elementlerin bağlanma bölgeleri HO-1'in promotör bölgesinde bulunur. Buna karşın HO-2 geni sadece fonksiyonel glukokortikoid cevap elementi içerir¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

HO-1 geni reaktif oksijen türlerinin de dahil olduğu hücresel oksidatif stres oluşturan ajanlar ve kimyasallar tarafından güçlü bir şekilde indüklenir. Bu nedenle strese yanıt veren gen olarak bilinir^{198,199}.

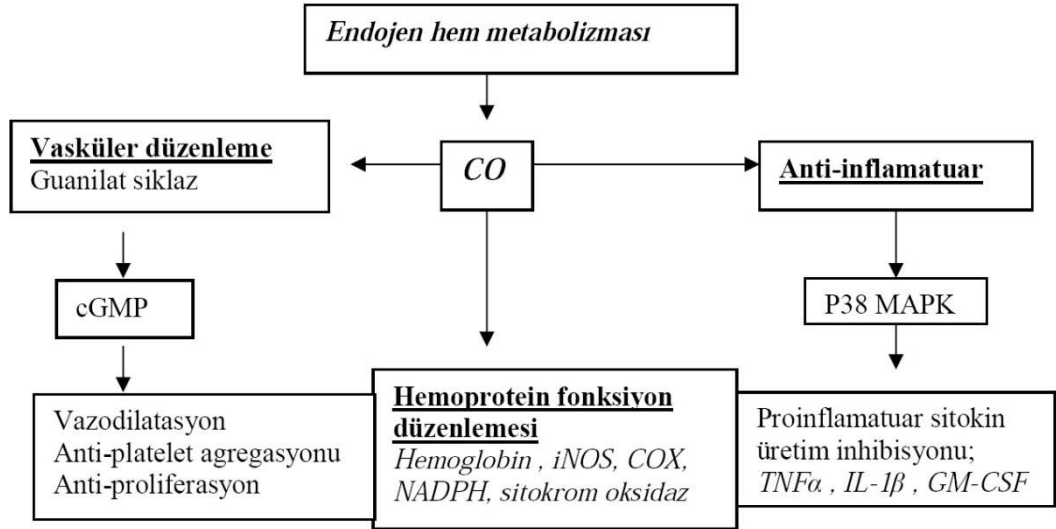
2.5.1.5. HO-1'in Reaksiyon Ürünleri ve Fonksiyonları

HO-1 hem molekülünün parçalanması üzerinden gelişen hücre farklılaşması, eritrosit döngüsü ve demir konsantrasyonunu dengede tutmak gibi bilinen etkilerinin yanı sıra reaksiyon ürünleri üzerinden gelişen önemli sitoprotektif etkilere de sahiptir. Şekil-21'de CO, bilirubin ve Fe/Ferritin üzerinden gelişen etkiler kısaca özetlenmiştir.



Şekil-21: Hem molekülünün parçalanma ürünleri ve fonksiyonları.

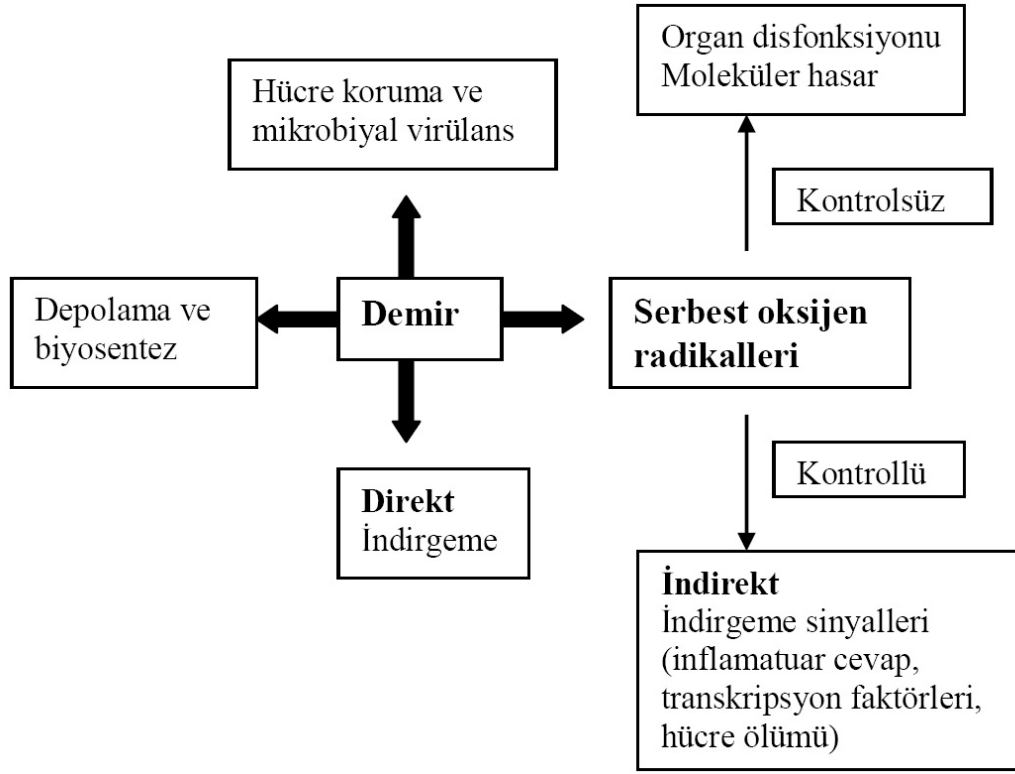
CO; endojen olarak hem katabolizmasının direk bir göstergesidir. Egzojen CO ise; oksijene yüksek afinite ile bağlanması ve hipoksi, anoksi gibi ciddi sonuçlar doğurabilmesi nedeniyle toksik bir gazdır. Biyolojik CO; hem'in α -methan karbon köprüsünün oksidasyonu sonucu hücre ve dokulardan kaynaklanır. Endojen CO'in %15'den azı ise lipid oksidasyonu ve ksenobiyotik metabolizma gibi hem dışı kaynaklardan üretilir. Demir şelatlarına bağlanabilir. Böylece hemoglobinin dışında; miyoglobulin, sitokrom p-450, nitrik oksit sentaz gibi diğer hemoproteinler için potansiyel bir ligand olarak etkisini gösterir. Yapılan son çalışmalarda; vazodilatör, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, anti-proliferatif özelliklerinden bahsedilmiştir(Şekil-22)^{200,201}.



Şekil-22: CO'nin muhtemel etki mekanizmaları²⁰².

(iNOS= uyarılabilir nitrik oksid sentaz, COX= siklooksijenaz, P38 MAPK= 38 kilodalton proteinli mitojen aktive protein kinaz, hücre içi sinyal molekülü)

Serbest Fe; aerobik hayatın devamı, DNA sentezi ve demir içerikli proteinlerin üretimi için gereklidir. Aynı zamanda birçok bakterinin sahip olduğu LPS oksidatif stresini yaratabilmesi için anahtar rol oynar. Hem yıkımı sırasında açığa çıkan serbest Fe; Fe bağlama yetenekleri nedeniyle antioksidan özellik kazanan transferrin ve serüloplazmin ile yeni hem biyosentezi için kemik iliğine aktarılır. Hem yıkım ürünlerinin oksidatif stres üzerindeki etkinliğini incelemek amacıyla oluşturulan bir test sisteminde, bilirubinin antioksidan etkisine göre Fe'in pro-oksidatif etkisinin daha baskın olduğu gözlenmiştir²⁰³.



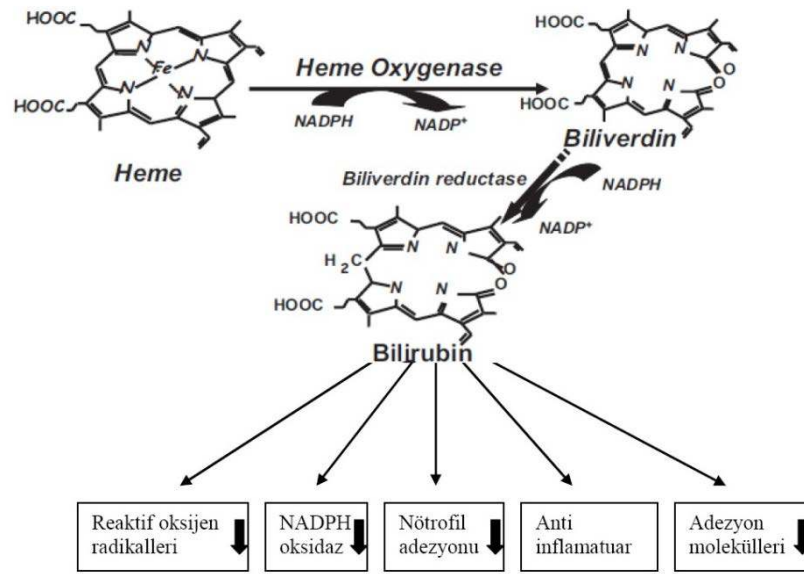
Şekil-23: Serbest demirin normal ve patolojik durumlardaki rolü²⁰⁴.

Fe'in tetiklediği akciğer hasarında HO-1 enziminin yerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada; HO-1 gen delesyonu olan farelerin HO-1 enzimi uyarıldığında, artmış serbest Fe'e bağlı olarak oksidatif hasar ve hiperoksiye bağlı mortalitede artış olduğu görülmüştür²⁰⁵. Bu noktada HO-1 enziminin hücre koruyucu mu yoksa zararlı mı olduğunu belirleyecek noktanın, enzim düzeyi ve aktivasyon süresi olduğu düşünülmektedir²⁰⁶.

Bilirubin; bilirubin memelilerde en bol bulunan endojen antioksidandır (Şekil-24). Bilirubinin en sık bilinen toksik etkisi, yüksek düzeylerde beyinde birikimi ile yeni doğanda yaptığı *Kernikterus*'tur, ancak yeni doğan sarılığının aslında bebeği yeni girdiği dış ortama karşı bir koruyucu olduğu düşüncesi de mevcuttur²⁰⁷.

Stocker ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma'da invitro modellerde bilirubin ve biliverdinin potansiyel antioksidan kimyasallar olabileceklerini

göstermişlerdir²⁰⁸. Bu hipotez egzojen bilirubin uygulamaları sonrası farklı hücre kültürlerinde oksidanlara karşı hücre korumasının güçlendiğinin gösterilmesiyle desteklenmiştir²⁰⁹. Hastalıkların oluşması ve ciddiyet düzeyinin belirlenmesi amacıyla egzojen bilirubin uygulamalarıyla bazı durumlarda avantaj sağlanmıştır. Bunlar; iskemi-reperfüzyon hasarı²¹⁰, organ reddi²¹¹, septik şok²¹², otoimmün nöroinflamasyon²¹³ durumlarıdır.



Şekil-24: Bilirubin biyokimyasal yapısı ve işlevleri²⁰⁴.

Bilirubin ve biliverdinin kalbe etkilerine yönelik; ratlara öldürücü dozlarda lipopolisakkarit verilmesi sonrası uygulanan egzojen biliverdinle, sistemik inflamasyon ve kalp hasarı incelenmiş. Koruyucu etkilerini serumda proinflamatuvar sitokinleri (ör: TNF- α) azaltıp, anti-inflamatuvar sitokinleri (ör: IL-10) yükselterek, kalp permeabilitesini ve farklı kalp hasar belirteçlerini azaltarak göstermişlerdir²¹⁴.

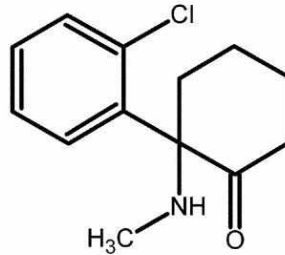
2.6. İntravenöz (IV) Anestezikler

İdeal bir IV anestezik; solüsyon halindeyken stabil olmalı, enjeksiyon sırasında ağrı (venöz irritasyon) veya ekstrasvazasyonuna bağlı doku hasarı oluşturmamalı, histamin salınımına yol açma olasılığı düşük olmalı, etkisi hızlı başlamalı, hızla inaktif metabolitlerine dönüşmeli, etkili klirens ve redistribüsyon mekanizması olmalı, benign kardiyovasküler ve/veya solunumsal etkilere sahip olmalı, serebral kan akımını ve metabolizmasını azaltmalı, bilinci hızla ve tam olarak geri döndürmeli, istenmeyen postoperatif etkileri olmamalı (bulantı, kusma, deliryum, baş ağrısı v.s.)²¹⁵⁻²¹⁸.

IV anestezikler kimyasal yapıları, solüsyonlarının şekli, etki şekli ya da etki hızlarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Etki şekli ve kimyasal yapılarına göre; IV opioid anestezikler ve IV nonopioid anestezikler şeklinde ayrılır. Propofol, tiyopental sodyum, midazolam, ketamin ve deksmedetomidin IV nonopioid anestezikler grubundadır^{215,216,218}.

2.6.1. Ketamin

Ketamin 1962'de Stevens tarafından sentez edilmiştir ve insanlarda ilk olarak 1965'de Corssen ve Domino tarafından kullanılmıştır. Ketamin diğer anestezik indüksiyon ajanlarından farklıdır. Ketaminin belirgin analjezik etkisi vardır. Ketaminin iki stereoizomeri vardır; S-(+) ve R-(-) dir. S-(+) izomer daha potenttir²²⁰.



Şekil-25: Ketaminin Kimyasal Yapısı.

2.6.1.1. Fiziko-kimyasal Özellikleri

Ketaminin moleküler ağırlığı 238kd'dur. Kısmen suda çözünebilir, berrak renksiz, asit iyonizasyon katsayısı pKa 7,5 'dir. Ketamin hafif asidik (pH=3,5-5,5) solusyon olarak hazırlanır. Her bir mililitre sodyum klorid solusyonu 10-50-100mg ketamin içerir ve koruyucu olarak benzethonium klorid bulunmaktadır. Ticari rasemik karışım iki optik izomerin eşit miktarda karışımıdır. S-(+)-ketamin 5 ve 25 mg/ml konsantrasyonlardadır²²⁰.

2.6.1.2. Metabolizma ve Farmakokinetik

Ketamin hepatik mikrosomal enzimlerce metabolize edilir. Önce N-demetilasyona uğrar ve norketamine dönüşür ve sonra hidroksilasyona uğrar ve hidroksinorketamin oluşur. Bu ürünler konjugasyona uğrar ve suda çözünebilir derivelere dönüşür ve idrarla atılır. Norketamin belirgin düşük aktivite göstermekle birlikte asıl aktif metabolit ketamindir²²⁰.

Ketaminin yüksek lipid çözünürlüğünden dolayı geniş bir dağılım hacmi vardır ve yaklaşık olarak 3 L/kg. Eliminasyon yarı ömrü 2-4 saattir²²¹. Ortalama tüm vücut klirensi (1.4L/dk) hemen hemen karaciğer kan akımına eşittir.

Ketaminin iki izomerinde farmakokinetiği farklıdır. S-(+)-ketamin, R-(+)-ketaminden daha geniş dağılım hacmi ve daha geniş eliminasyon klirensine sahiptir²²².

2.6.1.3. Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Ketamin kardiyovasküler sistemi uyarır ve kan basıncı, kalp hızı, kardiyak output artar. Bunun sonucu miyokardın iş yükü ve oksijen tüketimi artar. Kan basıncı ve kalp hızında enjeksiyonu izleyen 3-4 dk içinde ortaya çıkan ve 10-20 dk sonra geçen bir artış olur^{220,221,223}.

2.6.1.4. Solunum Sistemine Etkileri

Ketaminin indüksiyon dozunun (2mg/kg İV) bolus uygulamasından sonra dakika ventilasyonunda geçici bir azalma gözlenebilir. Ketamin bronş düz kaslarını gevşetir. Reaktif hava yolu hastalığında ve bronkospazmda pulmoner kompliyansı iyileştirir. Bronkodilatasyonu halotan kadar etkilidir²²⁰.

Ketamin uygulamasından sonra potansiyel bir problemde, özellikle çocuklarda sekresyon artışıdır. Sekresyonlar üst hava yolu obstrüksiyonuna neden olabilir^{220,221,224}.

2.6.1.5. Santral Sinir Sistemine (SSS) Etkileri

Ketamin doza bağlı olarak bilinçsizlik ve analjezi sağlar. Yaptığı anesteziye disosiyatif anestezi denilmektedir. Yüksek lipid çözünürlüğünden dolayı kan beyin bariyerini hızlıca geçer. Ketaminin Uygulanmasından 30sn sonra etki başlar ve maksimum etki 1dk'da oluşur. Ketamin verildikten sonra kataleptik bir durum oluşur, anestezinin diğer evreleri normal uykuya benzer, hastanın gözleri açılır, pupiller dilate olur, horizontal veya vertikal nistagmus görülür. Korneal, öksürük, yutkunma refleksleri devam eder. Sekresyon artışı olur, iskelet kas tonusu artar, baş, kollar, bacaklar, gövdede amaçsız hareketler görülebilir. Tek genel anestezik doz (2mg/kg İV) ketamin uygulamasından sonra etki süresi 10-15 dk'dır. Tam oryantasyon (yer, zaman, kişi) 15-30 dk sürer. Ketamin anestezisinin süresi doza bağlı hesaplanmaktadır. Genel uygulamada birlikte kullanılan benzodiazepin, ketaminin etki süresini uzatabilir. Ketamin önemli derecede postoperatif analjezi sağlar. Ketamin preemtif olarak kullanıldığında postoperatif opiyat gereksinimini azaltır²²⁵. Ketamin SSS'de primer olarak talamokortikal sisteme etkir. Limbik sistemi aktive eder. Ketamin spinal kord ile beynin yüksek merkezleri arasında emosyonel komponentlerin geçişinde önemli olan medial medüller retiküler formasyona impuls geçişini baskılar²²⁰.

Ketamin serebral kan akımını, oksijen tüketimini, intra kraniyal basıncı artırır^{216,221}.

2.6.1.6. Kullanım Alanları

Ketamin premedikasyon, sedasyon, genel anestezi indüksiyonu ve idamesi amacıyla kullanılabilir^{220,221,224}.

Ketamin, midazolam veya diazepam ile kombine edilerek iskemik ve valvüler kalp hastalığı olan hastaların anestezisinde infüzyon yoluyla kullanılmaktadır. Ketamin düşük dozlarda toraks cerrahisi sonrası analjezik olarak kullanılmaktadır²²⁶. Preoperatif olarak küçük dozlarda uygulanan ketamin postoperatif analjezik tüketimini azaltır. Epidural ve kaudal olarak kullanılabilir fakat koruyucu madde içeren karışım potansiyel nörotoksiktir. Koruyucu içermeyen S-(+)-ketamin güvenli olabilir. Ketamin, pediatrik girişimlerde (kardiyak kataterizasyon, radyasyon tedavisi, pansuman, radyolojik ve dental girişimler) güvenli ve etkin sedasyon sağlar²²⁴.

Ketamin, İV, İM, oral, nasal, rektal, ve koruyucu içermeyen solusyon epidural yolla kullanılabilir. Ketamin pik etkisine İV uygulamadan 30-60 sn sonra ulaşır, etki 5-10 dk sürer. İM uygulamadan 20 dk sonra pik etki oluşur, etki 10-20 dk sürer. Oral (3-10mg/kg) uygulamada sedatif etki 20-45 dk'da oluşur. Ketamin, propofolle birlikte kullanılırsa aditif etki gösterir²²⁰.

2.6.1.7. Yan Etkiler ve Kontraendikasyonlar

Ketamin intrakraniyal basıncı artırdığı için, intrakraniyal kitlesi olan hastalarda verilmemelidir. Açık göz yaralanmaları ve diğer oftalmolojik yetersizliklerde göz içi basıncının artışı indüklediği için kontraendikedir. Kontrol edilmemiş hipertansiyonda kontraendikedir. İskemik kalp hastalıklarında temel anestezi olarak kullanılması kontraendikedir. Çünkü hipertansiyon ve taşikardiye neden olur buda miyokardiyal oksijen tüketimini artırır^{220,221}.

Ketaminin koruyucu maddesi olan klorobutanol nörotoksiktir ve subaraknoid uygulama kontraendikedir. Psikiyatrik bozukluklar ve epilepside kontraendikedir^{220,221}.

Psikomimetik etkiler, ilacın dozu, veriliş şekli, hastanın yaşı, cinsiyeti ve kişiliğine göre değişen sıklık ve şiddette olup, ketamin kullanımını sınırlayan en önemli etkilere dendir²²³.

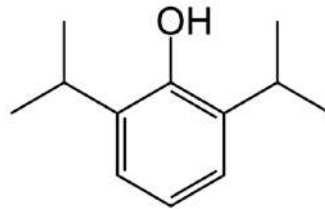
2.6.1.8. Ketaminin İnflamatuvar Üzerine Etkisi:

Hem in vivo hemde in vitro LPS ile sepsis sonucu, ketamin; makrofajlar ve periferel lökositler gibi çeşitli immün hücrelerde anti-inflamatuvar etki gösteren anesteziiktir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar gösteriyor ki LPS ile astrositlerde aktive olan TNF- α üretimini ketaminin inhibe etmesi ile anti-inflamatuvar etkisinin olduğu rapor edilmiştir. LPS tarafından indüklenen astrositlerdeki anti-inflamatuvar etkisinin detaylı mekanizması henüz açıklığa kavuşmuş değıl. LPS ile indüklenen astrositlerde NF- κ B aktivasyonu ve Toll-like receptor 4 (TLR4) ekspresyonunu ketaminin inhibe ettiğı bulunmuştur^{255,314}.

2.6.2. Propofol

Propofol (2,6-diisopropylphenol) bugün oldukça sık kullanılan intravenöz anesteziiktir. 1970'li yılların başlarında fenolün hipnotik türevi olarak üretilmiş ve ilk klinik uygulama 1977 yılında Kay ve Rolly tarafından yapılmıştır. Ancak Cremophor EL içindeki solüsyonunun anaflaktoid reaksiyonlara yol açmasından dolayı terkedilmiştir ve sonra ilaç emülsiyon olarak tekrar formüle edilmiştir.

Propofol anestezi indüksiyonu ve idamesinde, amaliyathane içi ve dışı sedasyonda kullanılır²¹⁵. Propofol, bir fenol halkasına bağı iki isopropil grubundan oluşmaktadır (Şekil-26)²¹⁹. Alkilfenol grubunun yan bağı uzunluğu, ajanın etkisini, indüksiyon ve derlenme karakteristiklerini oluşturmaktadır.



Şekil-26: Propofolün Kimyasal Yapısı²¹⁹.

2.6.2.1. Fiziko-kimyasal Özellikleri

Propofol hipnotik özelliği olan alkilfenol grubunun bir üyesidir. Kimyasal yapısı; 2,6 diizopropilfenolfenoldür^{215,216,223}. Formülü %1 propofol, %10 soya yağı, % 2.25 gliserol, %1,2 pürifiye yumurta fosfatidi içerir. Emülsiyona bakteriyel gelişimi önlemek için %0.005 disodyum asetat eklenmiştir. Formülün pH'sı 7, hafif viskoz ve süt beyazı rengindedir. Oda ısısında stabildir ve ışığa hassas değildir²¹⁵.

2.6.2.2. Metabolizma ve Farmakokinetik

Propofol karaciğerde konjugasyon ile hızlıca metabolize olur ve suda çözünen bileşikler olan glukronid ve sülfata dönüşür ve böbreklerden atılır. Propofolun %1 den azı değişmeden idrarla atılır ve sadece %2 si feçesle atılır. Metabolitleri aktif değildir. Plazma proteinlerine %98 oranında bağlanır. İntravenöz verilen dozun yalnızca %20'si kanda değişmeden kalır. Propofol vücut klirensinin, hepatik kan akımı değerlerinin üzerinde olması, ekstra hepatik mekanizmaların metabolik klirens katkıda bulunduğunu, propofolün karaciğer dışında da metabolize olduğunu veya atıldığını göstermektedir. Hızlı metabolizma ve yüksek klirens oranı çabuk uyanmayı açıklamaktadır^{215,216,223}.

Propofolle anestezi ve sedasyondan sonra uyanma aşamasında dozu azaltmak gerekir (genellikle % 50 den aşağı). İnfüzyonun kesilmesinden sonra 30 dakika içerisinde canlı yardımsız yürüyebilir. Uzamış infüzyondan sonra dahi propofolden iyileşme hızlıdır. Propofol klirensi oldukça yüksektir 1,5-2,2 mL/dk. Propofolun farmakokinetiği çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bunlar; cinsiyet, ağırlık, önceden var olan hastalık, yaş, birlikte olan tedavidir. Dişilerde daha geniş dağılım volümü ve daha hızlı klirensi varken; eliminasyon yarı ömrü erkeklerle aynıdır. Yaşlı canlılarda klirens hızı azalmıştır fakat santral kompartman volümü daha düşüktür. Genç canlılarda ise klirens hızlı olduğundan daha büyük doz gereksinimi vardır^{215,227}.

2.6.2.3. Kardiyovasküler Etkiler

En belirgin etkisi anestezi indüksiyonu sırasında arter kan basıncında düşmedir. 2-2,5 mg/kg indüksiyon dozuyla sistolik kan basıncında %25-40 azalma oluşur. Ortalama ve diastolik kan basıncında da benzer değişiklikler görülür. Arteriyel basınçta düşme; kardiyak output/kardiyak indeks (%15), atım volümünde (%20) ve sistemik vasküler rezistansta azalmaya (%15-20) bağlıdır²²⁸. Sol ventrikül atım işi indeksi de azalmıştır (%30). Sağ ventriküle bakıldığında ise propofol sağ ventrikül endsistolik basınç-volüm ilişkisi eğrisinde anlamlı bir azalmaya neden olur. Propofol indüksiyon dozundan sonra oluşan hipotansiyon vazodilatasyona ve belki de miyokardiyal depresyona bağlıdır. Klinik olarak miyokardiyal depresyon etkisi ve vazodilatasyon, hem doz hem plazma konsantrasyonunun ikisine de bağlı gibi görünmektedir. Vazodilatör etkisi sempatik aktivitede azalmaya, intraselüler düz kas kalsiyum mobilizasyonu üzerine direkt etkisine, endotel hücrelerinde prostosiklin sentezinin inhibisyonuna, Anjiotensin-II aracılıklı Ca^{+} girişinde azalmaya, K^{+} bağımlı ATP kanallarında aktivasyona ve nitrik oksid stimülasyonuna bağlı gibi görünmektedir. Nitrik oksid stimülasyonu propofolden ziyade intralipid ile değiştirilebilir. Propofol indüksiyonundan sonra kalp hızında anlamlı değişiklik olmaz. Propofol baroreseptör refleksi engeller ya da inhibe eder. Böylece hipotansiyona taşikardi cevabını baskılamış olur^{215,216}.

2.6.2.4. Solunum Sistemine Etkileri

Propofolun indüksiyon dozundan sonra apne meydana gelir. Apnenin insidansı ve süresi doza, injeksiyon hızına, birlikte premedikasyon almasına bağlıdır. İndüksiyon dozundan sonra hastaların %25-30'unda apne gelişir. Propofolle uzamış apne (30sn üzerinde) görülür. Uzamış apne, propofole ek olarak premedikasyon ya da indüksiyondan hemen önce opiyat yapılmasıyla daha sık gözlenir. Propofolun 2,5 mg/kg indüksiyon dozundan sonra solunum hızı 2 dk içinde belirgin olarak düşer ve dakika volumu 4 dk'nın üzerinde belirgin azalır. Propofolun idame infüzyonu sonucu tidal volumde %40 azalma ve

solunum hızında %20 artış görülmüştür. Propofol 1,5-2,5 mg/kg dozunda Pa_{CO_2} akut yükselme ve pH da azalma ile sonuçlanır. Pa_{O_2} belirgin olarak değişmez. Propofol (50-120µg/kg/dk) hipoksiye ventilatör cevabı baskılar. Propofol kronik obstrüktif akciğer hastalığında bronkodilatasyon yapar^{215,229}.

2.6.2.5. Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Propofol 2,5 mg/kg dozunda hızlıca hipnoz oluşturur. Pik etkisi 90-100sn dir. Bilinç kaybı için median efektif doz (ED_{50}) 1-1,5 mg/kg bolustur. Hipnoz süresi doza bağlıdır. 2-2.5mg/kg'lık doz 5-10 dk hipnoz oluşturur. Yaş artıkça bilinç kaybı oluşturmak için kullanılan dozu azaltmak gerekir. Subhipnotik dozda propofol amnezi ve sedasyon sağlar²¹⁵.

Propofol intrakranial basıncı (İKB) normal ve artmış hastaların herikisinde de basıncı düşürür. İntrakranial basıncı normal hastada; İKB'yi %30 ve serebral perfüzyon basıncını %10 düşürür. İntrakranial basıncı artmış hastada; İKB'yi %30-50 ve serebral perfüzyon basıncını belirgin düşürür. Propofol serebral metabolik oksijen tüketim hızını azaltır^{215,230}.

Propofol uygulaması sonrası halusinasyon, seksüel fantezi, opistotonus bildirilmiştir²³¹. Propofol intraoküler basıncı akut %30-40 düşürür^{232,233}.

2.6.2.6. Diğer Etkileri

Propofol nondepolarizan ve depolarizan nöromusküler blokerlerle oluşan nöromusküler blokajı potansiyalize etmez. Yalnız kullanıldığında iyi entübasyon koşulları sağladığı bildirilmektedir. Propofol malign hipertermiyi tetiklemez ve belki de bu durumdaki hastalarda seçilecek anesteziiktir. Propofol tek doz ya da uzamış infüzyon sonrası kortikosteroid sentezini etkilemez. ACTH stimülasyonuna normal cevabı değiştirmez. Emülsiyon formundaki propofol hepatik, hematolojik ya da fibrinolitik fonksiyonu değiştirmez. Ama lipid

emülsiyonu, in vitro platelet agregasyonunu azaltır. İntralipid içindeki propofol histamin salınımını tetiklemez^{215,234}.

Propofolün düşük dozlarda önemli bir antiemetik aktivitesi vardır. 10 mg bolus dozunda postoperatif bulantı tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca postoperatif refrakter bulantı ve kusmanın tedavisinde de kullanılır. 10-20mg yükleme dozundan sonra 10 µg/kg/dk infüzyonuyla bu kan konsantrasyonuna ulaşılabilir. Göğüs cerrahisinde anestezinin idamesi için kullanıldığında postoperatif bulantı ve kusmanın önlenmesinde 4 mg ondansetron profilaksisinden daha etkili olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada sürekli propofol infüzyonunun, işlemin sonunda propofol uygulanmasına üstün olduğu gösterilmiştir (sandviç tekniği). Propofol antikanser kemoterapisinden sonra 1mg/kg/saat hızında uygulandığında mükemmel bir antiemetik etkinlik sağlar^{215,235,236}.

2.6.2.7. Kullanım Alanları

Propofol anestezinin hem indüksiyon hem de idamesinde uygun bir ilaçtır. Nörolojik ve kardiyak anestezide kullanımı ayrıca tavsiye edilmektedir. Kardiyak cerrahi uygulanan ya da kritik hastalarda hipotansiyonu önlemek için tolere edilebileceği kadar sıvı yüklenmeli ve şuur kaybı olana kadar minimal olarak artan dozlarda uygulanmalıdır. Farmakokinetik farklardan dolayı çocuklarda indüksiyon için ED₉₅ %50 artmıştır. Olası antiemetik özelliğinden dolayı diğer indüksiyon ajanlarına göre bulantı ve kusma sıklığı düşüktür²¹⁵.

Propofol anestezi idamesinde aralıklı bolus dozlarda ya da sürekli infüzyon şeklinde verilebilir. Yeterli indüksiyon dozundan sonra anestezinin idamesi için birkaç dakikada bir 10-30 mg dozlar gereklidir. Bu dozların sıkça uygulanması gerektiğinden sürekli infüzyon şeklinde uygulanması daha uygundur. Genellikle indüksiyon dozundan sonra 100-200 µg/kg/dk hızda infüzyonu gereklidir. Daha sonra infüzyonun hızı bireysel ihtiyaca ve cerrahi uyarıya göre ayarlanabilir²¹⁵.

2.6.2.8. Yan Etkiler ve Kontrendikasyonlar

Propofolle anestezi indüksiyonunun pek çok yan etkisi vardır; Enjeksiyon sırasında ağrı, myoklonus, apne, arter kan basıncında azalma ve nadiren enjekte edilen vende tromboflebit oluşabilir. Daha geniş venlerin kullanımı, enjeksiyona lidokain eklenmesi ve el sırtındaki venlerin kullanılmaması gibi önlemlerle ağrı azaltılabilir. Propofolün 30 saniyeden daha uzun süreli apne oluşturma sıklığı daha fazladır. Opioid eklenmesi apne sıklığını özellikle de uzamış apne sıklığını artırır. İndüksiyondaki en önemli yan etkisi sistemik kan basıncında azalmadır. İndüksiyondan hemen önce opioid eklenmesi arter kan basıncındaki azalmayı artırır. Yavaş uygulama ve uygun hidrate edilmiş hastalarda daha düşük dozlar arter kan basıncındaki düşüşü azaltır²¹⁵.

2.6.2.9. Propofolün İnfalmatuar Üzerine Etkisi:

Propofol endotoksemiye karşı nonsedativ koruyucu etkiye sahiptir. Sepsisli hastalarda ve endotoksemi oluşturulmuş hayvan modellerinde propofolün kullanımının anti-inflamatuar etki gösterdiğini, protein agregasyonunu engellediği, nötrofil infiltrasyonunu baskıladığı ve endotel disfonksiyonu iyileştirdiği saptanmıştır. Propofol aynı zamanda kalp düz kas hücrelerini oksidatif hasara karşı ve oksidatif hasar sonucu oluşan damar endotelini koruduğu bilinmektedir. Buna ek olarak propofol iNOS aktivitesini engeller ve endotoksemi sırasında NO üretimini inhibe eder. Propofolün tüm bu koruyucu etkileri endotoksemide yararlı olduğu rapor edilmiştir³¹⁵.

2.6.3. Ketofol

Ketofol, Ketamin ile Propofolün 1:1 karıştırılması ile elde edilen anesteziktir. Ketamin ile Propofol bir araya gelerek aditif etki gösterir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 01/2011-50 kodlu bu çalışma, 16.05.2011 tarih ve G.Ü.ET-11.051 kod'lu Gazi Üniversitesi hayvan yerel etik kurul onayını almıştır. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM) sağlanan 250-300 gr ağırlığındaki Wistar cinsi erkek albino ratlar (sıçan) kullanılmıştır.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

- Gel Logic 2200 PRO Imaging System
- Hermle z323 K soğutmalı santrifüj
- Edmund Bühler KL-2 çalkalayıcı
- Bandelin sonopuls sonikatör
- Biorad protean tetra cell elektroforez tankı
- Biorad protean tetra blotting modülü
- Biorad powerpac universal güç kaynağı
- Molecular devices M3 mikrolaka okuyucu
- Biotek ELX 50 mikrolaka yıkayıcı
- Sanyo -80°C derin dondurucu
- Vorteks (Heidolf Reax 200)
- Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)
- pH metre (Jenway)
- Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)

- Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 100 µL) (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP)
- Steril Enjektör (2ml) (Ayset)
- Steril Enjektör (5ml) (Medplast-S)
- Steril Enjektör (10ml) (Hayat)
- İnsülin enjektörü (Hayat)
- 0.2-0.5-1.5 µl'lik ependorf tüpler (CLP)
- Azot tankı (GT212 EINOX Air liquide)
- Filtre kağıdı (Whatman)
- Usn Life Science Inc. ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFa)
- Usn Life Science Inc. ELISA Kit for Nuclear Factor Kappa B (NFkB)

3.2. Deneylerin Yapılışı

GÜDAM'dan sağlanan 30 adet Wistar cinsi erkek albino ratlar (sıçan) 5 gruba ayrıldı. Gruplara uygulanan işlemin 3. saatinin sonunda intra-kardiyak kan alınarak ötenazi uygulanan ratların kalp dokuları alındı, SF ile yıkanıp steril spanç yardımı ile kurutuldu ve ependorf tüplerine alınarak deney gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.1. Deney Grupları

1.Kontrol Grubu (n=6): %0.9 NaCl Serum Fizyolojik (SF) Bolusu (1ml/kg) ve SF (1ml/kg/saat) devamlı infüzyonu olacak şekilde uygulandı.

2.Endotoksin Grubu (n=6): Endotoksin şoku 15mg/kg LPS verilerek oluşturuldu. Endotoksin enjeksiyonu sonrası SF (1 ml/kg/saat) devamlı infüzyon uygulandı.

3.Ketamin Grubu (n=6): Endotoksin şoku 15mg/kg LPS verilerek oluşturuldu. Endotoksin enjeksiyonu sonrası ketamin (10mg/kg/saat) devamlı infüzyon uygulandı.

4.Propofol Grubu (n=6): Endotoksin şoku 15mg/kg LPS verilerek oluşturuldu. Endotoksin enjeksiyonu sonrası propofol (10mg/kg/saat) devamlı infüzyon uygulandı.

5.Ketofol Grubu (n=6): Endotoksin şoku 15mg/kg LPS verilerek oluşturuldu. Endotoksin enjeksiyonu sonrası ketamin (5mg/kg/saat) ve propofol (5mg/kg/saat) devamlı infüzyon uygulandı.

3.2.2. Dokuların Hazırlanışı

Tüm gruplara ait kalp dokularından 50 µg tartılıp 1:10 oranında distile su ile homojenizasyon yapıldı ve sonikatörde sonike edildi. 10000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındı.

3.2.3. TNF-α’nın ELISA Yöntemi ile Ölçümü

Süpernatant ve TNF-α ELISA kiti (Uscn Life Science Inc. ELISA kit) kullanılarak TNF-α düzeyleri ölçüldü ve pg/mg protein olarak verildi.

3.2.4. NF-κB’nın ELISA Yöntemi ile Ölçümü

Süpernatant ve NF-κB ELISA kiti (Uscn Life Science Inc. ELISA kit) kullanılarak NF-κB düzeyleri ölçüldü ve ng/mg protein olarak verildi.

3.2.5. Dokuda NOx Ölçümü: Griess yöntemi ile çalışıldı.

Reaktifler:

- 0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH:7)
- Griess I: % 0,2’lik Naftiletilediamin Dihidroklörür (NEDD)
- Griess II: % 10’luk Fosforik asit (H₃PO₄) içinde % 2’lik Sülfanilamid
- 1 M Hidroklörük asit (HCl) içinde 400 mg Vanadyum (III) Klorür (VCl₃)

Dokuların Hazırlanması:

Tüm gruplara ait kalp dokularından 50 µg tartılıp sodyum fosfat tamponu ile 1:10 dilüsyonu yapıldı. Homejenizatör ile homojenizasyon yapıldı ve sonikatörde sonike edildi. 10000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. 200 µL süpernatant, ortamdaki nitrati nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda VCl₃ eklendi ve 37°C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklendi. 37°C’de 10 dk inkübasyonundan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm’de okundu.

Standartın Hazırlanması:

1 mM’lık stok sodyum nitrit (NaNO₂) standardı günlük olarak dilüe edilerek, 50, 25, 12.5 ve 0 µM konsantrasyonlarda standartlar elde edildi. Dokulardaki NOx miktarı, hazırlanan standart eğriye göre hesaplandı ve µmol/mg protein olarak verildi.

3.2.6. Dokuda MDA Ölçümü

MDA lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. MDA içeriği ölçülmesinde MDA’nın TBA ile reaksiyona girmesi esas alınır. Yöntem MDA ile tiyobarbitürik asidin (TBA) oluşturduğu pembe renkli bileşiğin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesine dayanır.

Reaktifler:

- Fosfat tamponu (pH:6 , 100mM).
- Tiyobarbitürik asit çözeltisi (TBA, %2 m/v).
- Trikloroasetik asit çözeltisi (TCA, %20 m/v).
- 0,6 M HCl.
- Etil alkol(%95 v/v).

Dokuların Hazırlanması:

Tüm gruplara ait kalp dokularından 50 µg tartılıp 450µl fosfat tamponu eklendi, homojenizasyon yapıldı ve sonikatörde sonike edildi.

MDA Ölçüm Protokolü:

Tablo-6: MDA ölçüm protokolü.

	Deney	Kör
Numune (Homojenat)	100µL	100µL
Etil Alkol	200µL	200µL
Fosfat Tamponu	1mL	1mL
%20 TCA	1mL	1mL
%2 TBA	1mL	---
• Deney ve Kör tüpleri 30 dk kaynar su banyosunda (85-100°C) Kaynatıldı. • 10 dk süreyle 10000 rpm’de santrifüj yapıldı.		
%2 TBA	---	1mL
• Deney ve Kör tüplerinin absorbansları saf suya karşı 532nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü.		

- ❖ Her bir numune için Lowry metodu ile total protein tayini yapıldı.
- ❖ Lambert Beer yasası ($Abs = \epsilon \cdot b \cdot c$) kullanılarak nmol/ml cinsinden MDA protein miktarı hesaplandı. Daha sonra her bir numunenin MDA protein miktarı o numune için hesaplanan total proteine bölünerek nmol/mg cinsinden MDA miktarı hesaplandı.

3.2.7. HO-1 ve Cox-2'nin Western-Blot ile Ölçümü

Reaktifler:

- Lizis Solüsyonu: 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Na-deoksikolat.
- 3xYükleme Tamponu: 2.4 ml 1M Tris-HCl, 3 ml % 20 SDS, 3 ml Gliserol, 1.6 ml β -merkaptoetanol, 0.006 Bromofenol mavisi toplam hacim 10 ml olacak şekilde hazırlandı.
- %5'lük Paketleyici Jel: Distile su, % 30 Akrilamid/bisakrilamid karışımı (29/1), 1 M Tris HCl pH:6.8, % 10 Sodyum dedosil sülfat (SDS), % 10 Amonyum persülfat (APS), TEMED (Tetrametiletilendiamid).

Tablo-7: %5 Paketleyici Jel.

% 5 Paketleyici Jel	Toplam 4 ml	Toplam 5 ml	Toplam 6 ml
Distile su	2.7 ml	3.4 ml	4.1 ml
% 30 Akrilamid karışımı	0.67 ml	0.83 ml	1 ml
1.0 M Tris-HCl pH:6.8	0.5 ml	0.63 ml	0.75 ml
% 10 SDS	0.04 ml	0.05 ml	0.06 ml
% 10 APS	0.04 ml	0.05 ml	0.06 ml
TEMED	0.004 ml	0.005 ml	0.006 ml

- %12'lik Ayırıcı Jel: Distile su, % 30 Akrilamid/bisakrilamid karışımı (29/1), 1.5 M Tris HCl pH:8.8, % 10 Sodyum dedosil sülfat, %10 Amonyum persülfat, TEMED (Tetrametiletilendiamid).

Tablo-8: %12 Ayırıcı Jel.

% 12 Ayırıcı Jel	Toplam 10 ml	Toplam 15 ml	Toplam 20 ml
Distile su	3.3 ml	5 ml	6.6 ml
% 30 Akrilamid karışımı	4 ml	6 ml	8 ml
1.5 M Tris-HCl pH:8.8	2.5 ml	3.8 ml	5 ml
% 10 SDS	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
% 10 APS	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
TEMED	0.004 ml	0.006 ml	0.008 ml

- Elektroforez Yürütme Tamponu: 30 gr Tris baz, 144 gr Glisin, 10 gr Sodyum dedosil sülfat tartılıp pH: 8.3 ayarlandıktan sonra 1 litreye distile su ile tamamlandı.
- Transfer Tamponu: Sodyum dedosil sülfat içermeyen, %20 metanol içeren elektroforez yürütme tamponu.
- TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH: 7.4
- TBST: % 0.1 Tween 20 içeren TBS.
- Bloklama solüsyonu: % 3 yağsız süt tozu (Pierce) içeren TBST.
- Western-Blot'ta kullanılan primer antikorlar ve sekonder antikorlar.

Tablo-9: Primer ve Sekonder Antikorların Marka ve Dilüsyon Oranları.

Primer Antikor	Dilüsyon	Marka	Sekonder Antikor	Dilüsyon	Marka
HO-1	1:500	Santa Cruz	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling
COX-2	1:200	Santa Cruz	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling

Dokuların Hazırlanması:

2ml'lik eppendorf tüplerinde tartılan kalp dokuları liziz solüsyonu ile 1:10 oranında dilüsyonu yapılır. Homojenizatör ile buz içinde homojenizasyon işlemi yapılır. Dokunun proteinli kısmı ayrıştırılması için 10000 rpm'de, +4°C derecede, 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınır.

Elde edilen her bir numuneye ait süpernatantların total protein tayini yapılır. Total protein miktarları Western-Blot deneyine başlamadan önce kuyucuklara yüklenecek protein miktarını belirlemek amacı için hesaplanır.

3xYükleme tamponu ve β -merkaptoetanol eklenip daha önce 95°C'ye kadar ısıtılmış Dryblock'ta 5 dakika kaynatılarak denatüre edilir. β -merkaptoetanol denatüre olmuş proteinlerin kükürt gruplarını bloke ederek tekrar katlanmasına engel olur. Bu işlem proteinlerin jel üzerinde düzgün yürümesini sağlayacaktır.

Western-Blot Deney Protokolü:

Her bir numunede 20 μ g protein olacak şekilde kuyucuklara eklenecek örneklerden μ L cinsinden hesaplandı. % 5 paketleyici, % 12 ayırıcı sodyum dedosil sülfat içeren poliakrilamid jele yüklenerek 200 volt da yaklaşık 60-75 dk elektroforeze tabi tutuldu moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler 90 dakika 200 mAmp sabit akımla % 20 metanol içeren transfer tampon içerisinde PVDF (0.22 μ m Poliviniliden florid) membrana transfer edildi.

Membran bloklama solüsyonu ile 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Süt tozu ile bloklama işlemi tamamlanan membran 3 kez 10 dakika TBST ile yıkandıktan sonra 10 ml primer antikor ile gece boyu +4°C de inkübasyona bırakıldı.

Primer antikorlarla immün işaretlenen membranlar 3 kez TBST ile yıkandıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında 10 ml HRP (Horse radish peroksidaz) işaretli sekonder antikorla inkübasyona bırakıldı.

Sekonder işaretlemeden sonra membran 2 kez TBST 1 kez TBS ile yıkandıktan sonra 10 ml ECL (Kemiluminesans reaktif) içersine atıldı ve membrandan gelen sinyaller "Gel Logic 2200 PRO Imaging System" görüntüleme cihazı ile alınan dijital görüntüler üzerinde piksel analizi ile kantitatif tayin yapıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SigmaPlot 12 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Değerlendirmede unpaired Student's *t* testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Western-Blot ile elde edilen protein band yoğunlukları Image J programı kullanılarak ölçüldü.

4.BULGULAR

Sadece SF verilen kontrol grubu, LPS ile indüklenerek ratlarda oluşturulan endoksemi sonrasında sadece SF verilen, sadece ketamin verilen, sadece propofol verilen ve ketamin ile propofolun 1:1 oranında karışımı olan ketofolün verilmesi ile oluşturulan grupların herbirinin kalp dokularında; TNF- α , NF- κ B, oksidatif stres belirteçleri olan NO ve MDA düzeyleri, prostaglandin proteininin sentezinden sorumlu olan Cox-2 enzimi ve stres proteini olan ve ısı şok proteini (Hsp) olarak adlandırılan HO-1 (Hsp32) enzimi ölçümleri yapıldı.

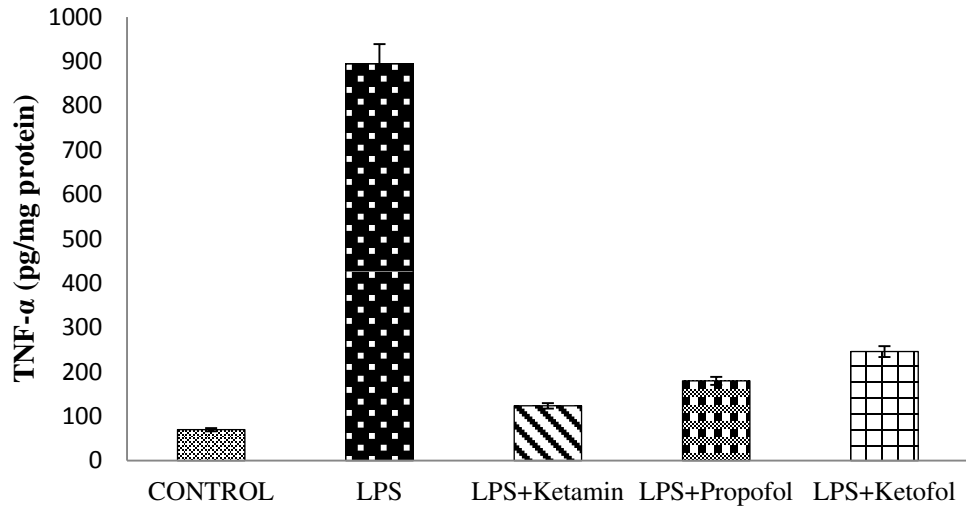
4.1. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda TNF- α Düzeylerindeki Bulguları

Sıçanda oluşturulan endotoksemi sonrasında verilen anestezikler sonucu kalp dokularındaki TNF- α düzeyleri (pg/mg protein) incelendiğinde kontrol grubunda en düşük düzey, LPS grubunda ise en yüksek düzeyin gözlemlendiği ve ketamin, propofol ve ketofole verilen gruplar sırasıyla gitgide arttığı gözlemlendi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde $p<0.05$ olacak şekilde anlamlı olduğu gözlemlendi.

Tablo-10: Ratların Kalp Dokusundaki TNF- α Değerleri ve İstatistiksel Analizleri.

Grup Sırası	Gruplar	pg/mg protein	SS	P değerleri
1	Kontrol	69,83	6,87	<0,001 ^a <0,001 ^b <0,001 ^c <0,001 ^d =0,012 ^e =0,020 ^f =0,009 ^g
2	LPS	894,17	41,31	
3	LPS+Ketamin	123,58	9,87	
4	LPS+Propofol	179,77	20,18	
5	LPS+Ketofol	245,9	13,81	

Kontrol-LPS^a, LPS-Ketamin^b, LPS-Propofol^c, LPS-Ketofol^d, Ketamin-Propofol^e, Ketamin-Ketofol^f, Propofol-Ketofol^g ($p<0.05$).



Şekil-27: Ratların Kalp Dokusunda Ketamin, Propofol ve Ketofolün, TNF- α Düzeylerine Etkisi.

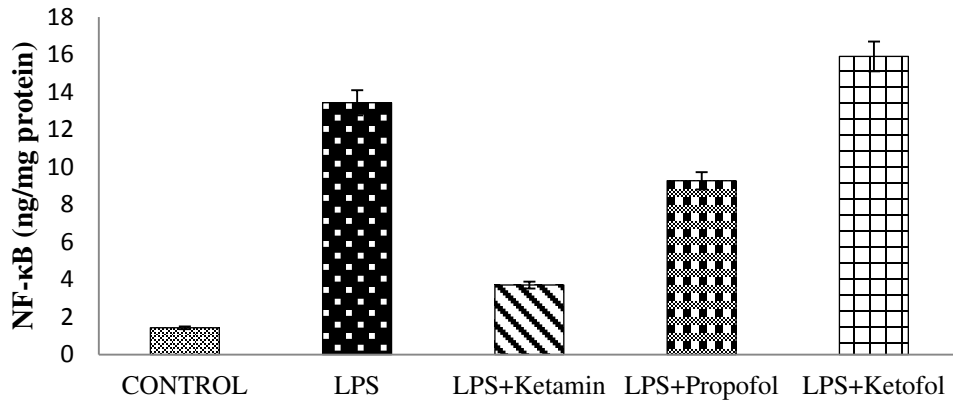
4.2. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda NF- κ B Düzeylerindeki Bulguları

Sıçanda oluşturulan endotoksemi sonrasında verilen anestezikler sonucu kalp dokularındaki NF- κ B düzeyleri (ng/mg protein) incelendiğinde kontrol grubu ile LPS grubu arasında, LPS grubu ile ketamin grubu arasında istatistiksel anlamlılık görüldü ($p < 0.05$). Ama propofol ve ketofol grupları ile LPS ve ketamin grupları arasında istatistiksel anlamlılık görülmedi ($p < 0.05$).

Tablo-11: Kalp Dokusundaki NF- κ B Gen Ekspresyonu ve İstatistiksel Analizleri.

Grup Sırası	Gruplar	ng/mg protein	SS	P değerleri
1	Kontrol	1,43	0,17	=0,003 ^a
2	LPS	13,43	3,34	=0,010 ^b
3	Ketamin	3,71	1,57	=0,324 ^c
4	Propofol	9,27	5,48	=0,673 ^d
5	Ketofol	15,9	8,81	=0,136 ^e
				=0,077 ^f
				=0,330 ^g

Kontrol-LPS^a, LPS-Ketamin^b, LPS-Propofol^c, LPS-Ketofol^d, Ketamin-Propofol^e, Ketamin-Ketofol^f, Propofol-Ketofol^g ($p < 0.05$).



Şekil-28: Ratların Kalp Dokusunda Ketamin, Propofol ve Ketofolün, NF-κB Düzeylerine Etkisi.

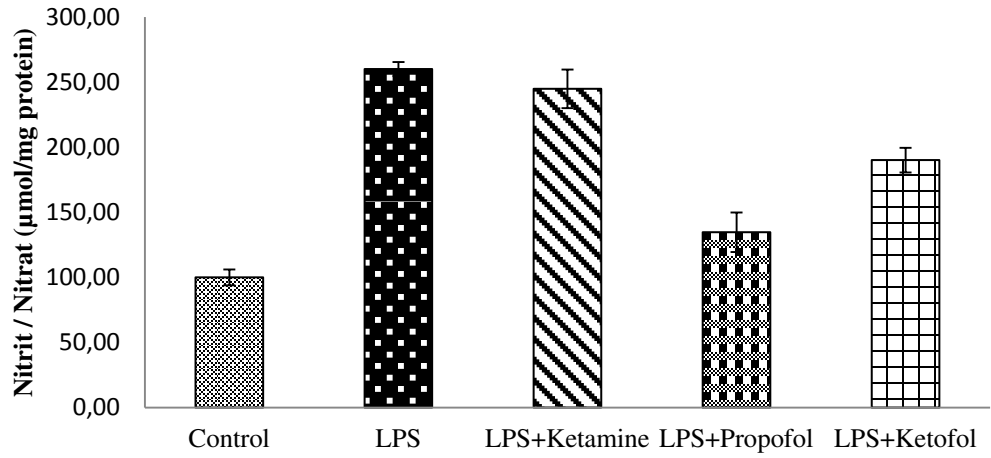
4.3. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda Nitrit/Nitrat Düzeylerindeki Bulgular

Sıçanda oluşturulan endotoksemi sonrasında verilen anestezikler sonucu kalp dokularındaki Nitrit/Nitrat düzeyleri ($\mu\text{mol/mg}$ protein) incelendiğinde kontrol grubunda en düşük düzey, LPS grubunda ise en yüksek düzeyin gözlemlendiği ve anestezik ilaç verilen gruplar içinde en düşüğün ketamin grubu, en yüksek propofol grubu olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizin anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

Tablo-12: Kalp Dokusundaki Nitrit/Nitrat Değerleri ve İstatistiksel Analizleri.

Grup Sırası	Gruplar	$\mu\text{mol/mg pro.}$	SS	P değerleri
1	Kontrol	3,28	0,20	$<0,001^a$ $=0,021^b$ $<0,001^c$ $=0,004^d$ $<0,001^e$ $=0,032^f$ $<0,001^g$
2	LPS	8,53	0,18	
3	LPS+Ketamin	8,03	0,49	
4	LPS+Propofol	4,42	0,15	
5	LPS+Ketofol	7,55	0,21	

Kontrol-LPS^a, LPS-Ketamin^b, LPS-Propofol^c, LPS-Ketofol^d, Ketamin-Propofol^e, Ketamin-Ketofol^f, Propofol-Ketofol^g ($p < 0.05$).



Şekil-29: Ratların Kalp dokusundaki Nitrit/Nitrat düzeyleri.

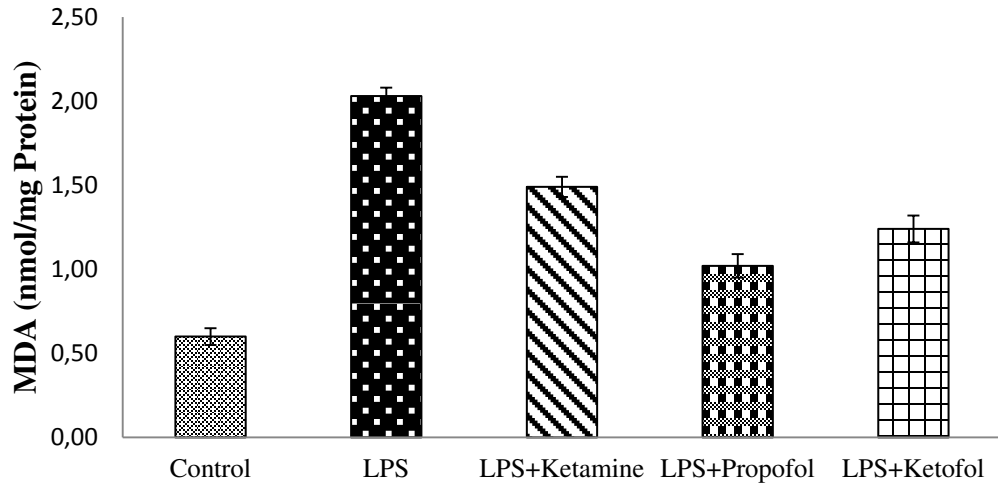
4.4. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda MDA Düzeylerindeki Bulgular

Sıçanda oluşturulan sepsis sonrasında verilen anestezikler sonucu kalp dokularındaki lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyleri (nmol/mg protein) incelendiğinde kontrol grubunda en düşük düzey, LPS grubunda ise en yüksek düzeyin gözlemlendiği ve anestezik ilaç verilen gruplar içinde en düşüğün propofol grubu, en yüksek ketamin grubu olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizin anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

Tablo-13: Kalp Dokusundaki MDA Değerleri ve İstatistiksel Analizleri.

Grup Sırası	Gruplar	nmol/mg pro.	SS	P değerleri
1	Kontrol	0,60	0,05	$<0,001^a$ $<0,001^b$ $<0,001^c$ $<0,001^d$ $<0,001^e$ $=0,006^f$ $=0,012^g$
2	LPS	2,03	0,05	
3	LPS+Ketamin	1,49	0,06	
4	LPS+Propofol	1,02	0,07	
5	LPS+Ketofol	1,24	0,08	

Kontrol-LPS^a, LPS-Ketamin^b, LPS-Propofol^c, LPS-Ketofol^d, Ketamin-Propofol^e, Ketamin-Ketofol^f, Propofol-Ketofol^g ($p < 0.05$).



Şekil-30: Ratların Kalp dokusundaki MDA düzeyleri.

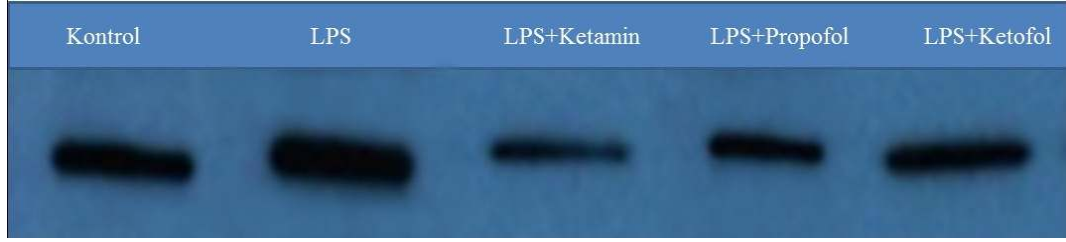
4.5. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda Cox-2 Protein Düzeylerindeki Bulgular

Sıçanda oluşturulan endotoksemi sonrasında verilen anestezikler sonucu kalp dokularındaki Siklooksijenaz-2 band yoğunlukları piksel analizi ile incelendiğinde LPS verilen ratlarda kontrol grubuna göre Cox-2 enziminde artış olduğu ve bu enzimi en fazla azaltıcı etkiye sahip olan anestezinin ketamin olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde $p < 0.05$ olacak şekilde anlamlı olduğu gözlemlendi.

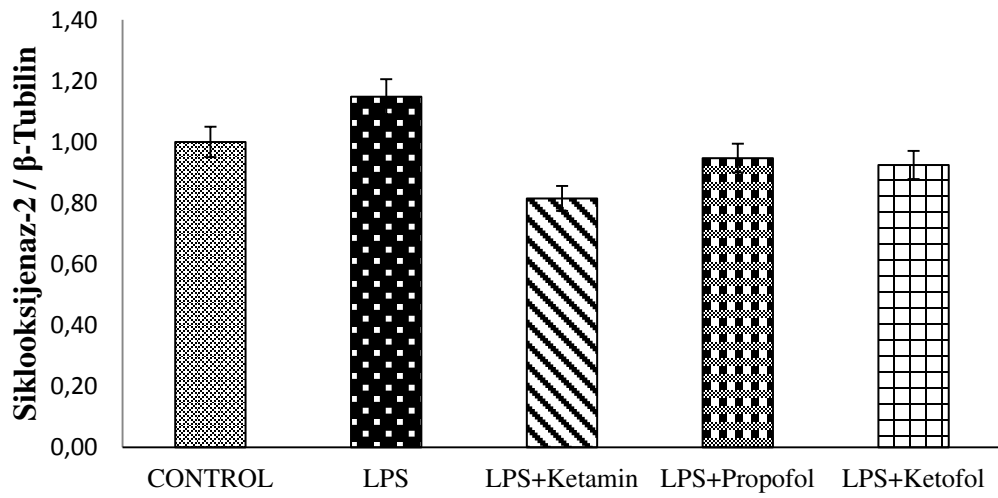
Tablo-14: Kalp Dokusundaki Cox-2 Değerleri ve İstatistiksel Analizleri.

Grup Sırası	Gruplar	Cox-2	SS	P değerleri
1	Kontrol	1,00	0,07	$=0,027^a$ $<0,001^b$ $<0,001^c$ $<0,001^d$ $=0,005^e$ $=0,012^f$ $=0,007^g$
2	LPS	1,15	0,03	
3	LPS+Ketamin	0,82	0,04	
4	LPS+Propofol	0,95	0,01	
5	LPS+Ketofol	0,92	0,00	

Kontrol-LPS^a, LPS-Ketamin^b, LPS-Propofol^c, LPS-Ketofol^d, Ketamin-Propofol^e, Ketamin-Ketofol^f, Propofol-Ketofol^g ($p < 0.05$).



Şekil-31: Ratların Kalp Dokularındaki Cox-2 Enzim Bant Yoğunluğu.



Şekil-32: Ratların Kalp Dokularında Ketamin, Propofol ve Ketofolün, COX-2 Protein İfadelemesi Üzerine Etkisi..

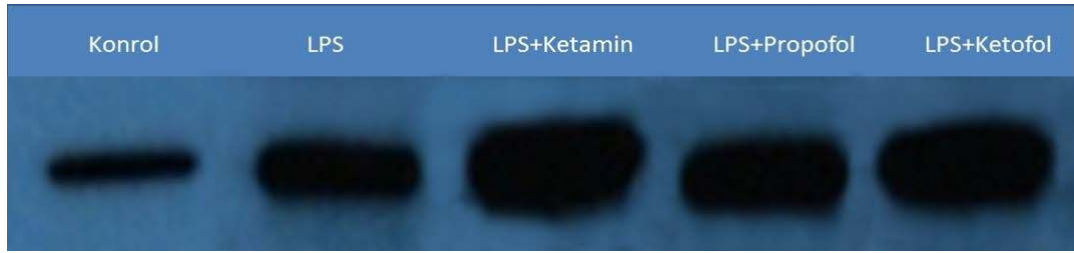
4.6. Endotoksemi Sonrası Verilen Anestezikler Sonucunda HO-1 Protein Düzeylerindeki Bulgular

Sıçanda oluşturulan endotoksemi sonrasında verilen anestezikler sonucu kalp dokularındaki Hemoksijenaz-1 band kalınlıklarının piksel analizi ile incelendiğinde LPS verilen ratlarda kontrol grubuna göre HO-1 enziminde artış olduğu ve bu enzimi en fazla arttırıcı etkiye sahip olan anestezinin ketamin olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizin anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

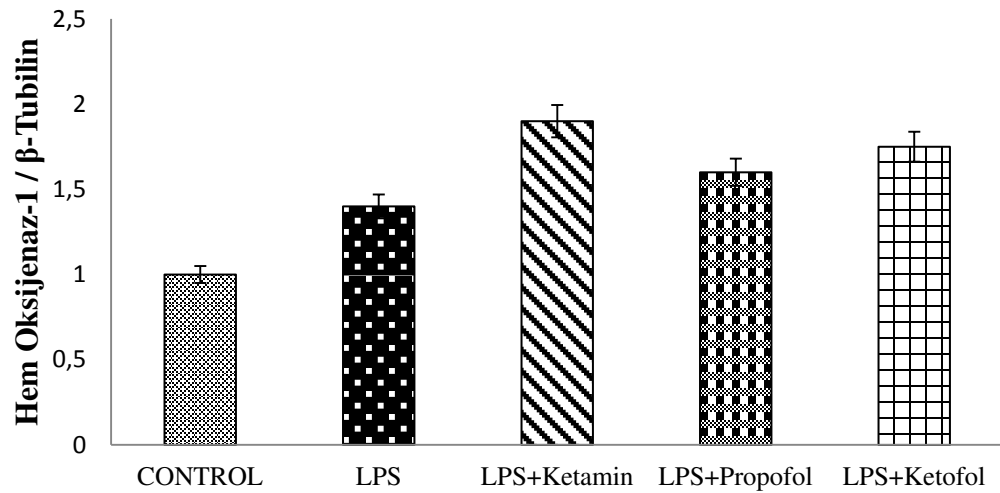
Tablo-15: Kalp Dokusundaki HO-1 Değerleri ve İstatiksel Analizleri.

Grup Sırası	Gruplar	HO-1	SS	P değerleri
1	Kontrol	1	0,03	<0,001 ^a <0,001 ^b =0,015 ^c =0,003 ^d =0,007 ^e =0,035 ^f =0,048 ^g
2	LPS	1,4	0,06	
3	Ketamin	1,9	0,08	
4	Propofol	1,6	0,06	
5	Ketofol	1,75	0,07	

Kontrol-LPS^a, LPS-Ketamin^b, LPS-Propofol^c, LPS-Ketofol^d, Ketamin-Propofol^e, Ketamin-Ketofol^f, Propofol-Ketofol^g (p<0.05).



Şekil-33: Ratların Kalp Dokularındaki HO-1 Enzim Bant Yoğunluğu.



Şekil-34: Ratların Kalp Dokularında Ketamin, Propofol ve Ketofolün, HO-1 Protein İfadelenmesi Üzerine Etkisi.

5.TARTIŞMA

Gram(-) bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan LPS, laboratuvar hayvanlarında deneysel endotoksemi oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Organizmaya giren LPS, ilk olarak *LPS bağlayan protein'e (lipopolysaccharide binding protein/LBP)* bağlanır. Daha sonra LPS-LBP kompleksi, hücre membranlarındaki CD₁₄-TLR4 reseptör kompleksine bağlanarak, pek çok hücre tipinde özellikle makrofajlarda, inflamatuvar sitokinlerin, adezyon moleküllerinin, bir çok proteinin, iNOS'un ve diğer genlerin ekspresyonunu artırır. Böylece, bu hücreler tarafından inflamatuvar sitokinler, Hsp proteinleri, ROS ve RNS'nin (NO[•], O₂^{•-}, ONOO[•], OH[•], H₂O₂) üretiminde aşırı bir artış meydana gelir^{237,238}.

Çalışmamızda LPS grubunda kalp TNF- α düzeyi artmaya başlayarak kısa sürede pik seviyeye ulaşmıştır. Miller ve ark²³⁹ yaptıkları çalışmada plazma TNF- α düzeyinin 6. saatte en yüksek seviyede olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Jiang ve ark²⁴⁰, intratrakeal LPS verilmesinden sonra serum TNF- α düzeyinin belirgin bir şekilde artmadığını, Klein ve ark²⁴¹ ise TNF- α düzeyinin belirleyemediklerini rapor etmişlerdir.

TNF- α 'nin septik şok veya endotoksemide esas rol oynayan mediatör olduğuna ilişkin görüşler, son yıllarda deney hayvanlarında ve insanlarda gerçekleştirilen bir dizi araştırmaların sonuçlarına dayanmaktadır. Sağlıklı bireylere endotoksin enjeksiyonundan sonra 60–90 dakika içinde TNF- α düzeyleri artar. TNF- α 'nın etkileri endotoksik şokta gelişen doku yıkımı ve metabolik bozuklukları taklit eder. İnsanlardaki septik şokta, dolaşımdaki TNF- α konsantrasyonu yüksektir ve TNF- α düzeyiyle yaşam oranı arasında ters bir ilişki vardır²⁴².

Y. Saito Shibakawa ve arkadaşları²⁴³, LPS ile endotoksemi oluşturdukları hücre kültürlerine verilen ketamin ve propofol sonrası TNF- α ve NO düzeylerini incelemişlerdir. 4 farklı dozda ketamin ve propofol verilerek oluşturulan gruplarda ketamin ve propofol miktarı arttıkça TNF- α düzeylerinde

azalma görülmekle birlikte propofolün azaltıcı etkisinin ketamin kadar etkili olmadığı rapor edilmiştir.

Bizim çalışmamızda da LPS sonucu artan TNF- α düzeyleri ile LPS+Ketamin verilen grup ve LPS+Propofol verilen grubun TNF- α düzeyi karşılaştırıldığında, LPS grubuna göre hem ketamin hem de propofol grubunda TNF- α düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir ancak propofolün ketamin grubunda ki kadar etkili olmadığı saptandı. Y. Saito Shibakawa ve arkadaşları²⁴³ tarafından yapılan çalışmada bu anesteziklerin davranışlarını destekler niteliktedir. Bunların yanında 5. grubumuz olan ketofol grubu ketamin grubundan daha az etkili olması ve propofol grubundan daha fazla etkili olmasını beklerken ketofol grubunun ketamin ve propofol gruplarından daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Holff G. ve arkadaşları²⁴⁴ LPS ile oluşturulan endotoksemi sonrasında verilen ketamin ve propofolün TNF- α üzerindeki etkisi genetik düzeyde incelenmiş ve sonuçların bizim çalışmamızla örtüştüğü görülmüştür. T. Taniguchi ve arkadaşlarının²⁴⁵ yaptığı bir başka çalışmada da TNF- α düzeylerinde aynı azaltıcı etki sonuçlarının alındığını ve aynı zamanda IL-6'nın da ölçüldüğü bu çalışma ketamin ve propofolün rollerini destekler niteliktedir.

NF- κ B immün cevap, inflamatuvar süreç, hücre büyümesi ve apoptozunda rol oynayan çoğu genin ekspresyonunu modüle etmekten sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B'nin uygunsuz aktivasyonunun astım, inflamatuvar artrit, septik şok, akciğer fibrozisi, diabetes, kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ateroskleroz gibi birçok hastalık ve patolojik durumla ilişkili inflamasyonda rolü olduğu belirtilmiştir^{246,247}. Ayrıca, birkaç anti-inflamatuvar ilaç (Örn., aspirin ve glukokortikoidler) ve kanser ilaçları NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla işlev görmektedir²⁴⁸.

LPS'nin immün sistem hücrelerinde NF- κ B'yi uyarak sitokin üretimine neden olabileceği bildirilmiştir²⁴⁹. Araştırmada LPS uygulaması sonrasında serumda artan sitokin düzeyleri, LPS'nin sistemik dolaşıma taşınması

sonrasında, kan monosit ve makrofajlarında NF-κB'yi uyarmasından kaynaklanabilir.

Endotoksemi boyunca NF-κB aktive olmuş haldedir ve birçok proinflamatuvar sitokin (kemokinler ve adezyon molekülleri) gen ekspresyonunda önemli rol oynar. Ayrıca, NF-κB yolu, hem pro hem de anti apoptotik yolu regüle eder²⁵² ve böylece, NF-κB inhibisyonu, in vivo şartlarda inflamasyonun gerilemesi sırasında apoptozisi de inhibe eder, dolayısıyla inflamatuvar cevabı uzattığından lökosit apoptozisi, inflamasyonun gerilemesi için oldukça önemlidir^{253,254}.

M. Yu ve arkadaşları²⁵⁵ ratlarda yaptıkları bir çalışmada; sepsis modeli oluşturmada bir başka metod olan çekumu bir toplu iğne ile delerek endotoksemi oluşturulmuş, ratlarda TNF-α ve NF-κB düzeyleri incelenmiş ve daha sonrasında farklı dozlarda ketamin enjeksiyonu yapılmış ve hem TNF-α hemde NF-κB düzeylerinde, enjeksiyonu yapılan ketaminin dozajıyla ters orantılı olacak şekilde azalma meydana geldiği rapor edilmiştir. Huai-Chia Chang ve arkadaşları²⁵⁶ hücre kültüründe oluşturdukları endotoksemide ketamin uygulaması sonrasında NF-κB düzeylerinde anlamlı bir şekilde azalma meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Chung-Hsi Hsing ve arkadaşları²⁵⁷ farelerde yaptıkları bir çalışmada LPS ile indüklenen endotoksemide propofol enjeksiyonundan sonra NF-κB seviyelerinde azalma meydana geldiği rapor edilmiştir. Wen-Ta Chiu ve arkadaşları²⁵⁸ hücre kültüründe yaptıkları bir çalışmada; sepsis modeli oluşturmada LPS yerine lipoteikoik asit (LTA) kullanılarak oluşturulan endotoksemi sonrasında propofol uygulamasından sonucu incelenen NF-κB düzeylerinde azalma meydana geldiği rapor etmişlerdir. Gong-Jhe Wu ve arkadaşları²⁵⁹ da hücre kültüründe LPS ile oluşturulan endotoksemi modeline propofol uygulamasından sonra NF-κB seviyelerinde azalma meydana geldiği bildirmişlerdir.

Bu alışmalar ışığında ketamin ve propofolün endotoksemiye ne de koruduğu incelendiğinde her iki anesteziğinde koruduğunu ve ketaminin propofole oranla daha etkili bir koruma gerçekleştirdiğini dşenebiliriz. Bizim alışmamızda da LPS grubu ile propofol grubu arasında yapılan istatistiksel analiz sonucu anlamlı çıkan sonuç yukarıdaki çalışmaları desteklemektedir. Ancak propofol ve ketofol grupları ile diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlılık olmamasından dolayı aynı yorumu yapmamız mümkün değildir.

Endotoksemide ortaya çıkan oksidatif stres, oksidanların artması yada antioksidanların azalmasıyla ortaya çıkan oksidan-antioksidan dengesinin bozulması sonucu gelişmektedir. Endotokseminin doğal bir sonucu olarak Kupffer hücrelerinde ve renal tübüler endotel hücrelerinde ksantin oksidaz aktive olmakta ve bu da ROS düzeylerini ve lipid peroksidasyonunu artırmaktadır. Lipid peroksidasyonu hücre membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. Septik şok modellerinde lipid peroksidasyonunda görülen bu döngünün anesteziklerin uygulanması ile azaltılabildiği gösterilmiştir.

Oluşan hasarın azaltılması oksidatif stresin ortadan kaldırılmasına bağlıdır. Her ne kadar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, alfa tokoferol ve karoten gibi endojen antioksidanlar olsa bile, septik şok ile üretimi artan ROS'ni tamponlamaya yetmemektedir. Değişik antioksidanların, septik şok sonrası karaciğerde, böbrekte ve kalpte ortaya çıkan oksidatif strese bağlı hasarını azaltıcı etkileri olduğu gösterilmiştir.

MDA değerlerinin, ketamin anestezisi altında LPS verilen gruplarda yükselmemesi, ketaminin dokuyu hasara karşı koruduğunu ve bunu da ROS'u azaltarak yapabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, anestezik dozda verilen ketamin kalbi sepsis'e karşı korumaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayanarak, bu anestezikin etkisi ROS miktarlarını azaltarak ortaya koyduğu söylenebilir. Ancak, ROS miktarını nasıl azalttıkları konusunda kesin bir yargıya varmak zordur²⁶⁰.

Ketaminin oksidatif hasara karşı korumasını araştırmayı amaçlayan bir çalışmada Fatma Saricaoglu ve arkadaşları²⁶¹ oksidatif hasara maruz kalmış dokularda MDA düzeylerin ketamin enjeksiyonu sonrasında azaldığı ancak kan serumlarında anlamlı bir değişme olmadığı rapor edilmiştir.

Propofol ile anestezi altına alınan hastalarda yapılan ve kalp dokusunu konu alan bazı çalışmalar da vardır. Kahraman S. ve arkadaşları²⁶² tarafından yapılan bir çalışmada, periferik arter operasyonu dolayısıyla turnike uygulanan hastalarda gerek plazma gerekse kardiyak dokudaki MDA düzeylerinin propofol ile uyutulan hastalarda izofloran ile uyutulanlara göre daha düşük bulunmuş ve yazarlar propofolün doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu ifade etmişlerdir. Propofolün *in vitro* deneylerde antioksidan etkisinin olduğu ve ROS ile reaksiyona girip fenoksil radikale dönüştüğü dikkate alındığında, yukarıda işaret edilen MDA üzerindeki etkisini ROS miktarını azaltarak yapabileceği söylenebilir²⁶². Zira propofolün kimyasal yapısı bir antioksidan olan E vitaminine yakından benzemektedir²⁶³.

Turan R. ve arkadaşları²⁶⁴ tarafından yapılan benzer bir çalışmada, propofol üç değişik protokolde verilerek sepsis'deki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada; birinci grupta spinal anestezi yapılan hastalara propofol sedatif dozda verilmiş, ikinci grupta propofol ile sadece indüksiyon yapılmış ve üçüncü grupta ise hem indüksiyon hem de idame propofol yapılmıştır. Sonuçta anestezi öncesi bazal değerlerle karşılaştırıldığında, turnikeden hemen önce ve 5 ve 20 dakika sonra alınan kan numunelerinde MDA değerleri ikinci grupta yüksek çıkarken, birinci ve üçüncü grupta ise düşük bulunmuştur²⁶⁴.

H. Yagmurder ve arkadaşları²⁶⁵ tarafından yapılan bir çalışmada oksidatif hasara karşı ketamin ve propofol kıyaslanmış. Hem ketaminin hemde propofolün oksidatif strese karşı koruma sağlayarak MDA düzeylerinde düşüş gözlemlendiği rapor edilmiş ve bunlara ek olarak oksidatif hasara karşı propofol ketaminden daha fazla etki gösterdiği MDA düzeylerinden anlaşıldığı rapor edilmiş.

Bütün bu bulgular dikkat alındığında, bizim çalışmamızda ketamin ve propofolün MDA düzeylerini düşürmesi antioksidan etkisi ile açıklanabilir. Üstelik, Runzen T.D. ve arkadaşları²⁶⁶ yaptığı benzer bir çalışmada propofolün antioksidan kapasiteyi arttırıcı etkisinin in vivo şartlarda rat eritrositlerinde, akciğerinde, karaciğerinde ve kalbinde spesifik olarak gösterilmiş olması, bu yargıyı destekler niteliktedir. Antioksidan kapasitedeki bu artış anesteziğin ROS'dan elektron yakalamasına ve daha stabil bir ara ürüne dönüşmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir²⁶⁶. Ek olarak, eritrositlerin propofol etkisiyle, in vivo şartlarda arttırılan antioksidan kapasitelerinin in vitro olarak da ortaya çıkması, antioksidan etkinin, belirli bazı aracı maddeler olmaksızın, anesteziğin direkt etkisine bağlı olduğunu desteklemektedir²⁶⁶. Mouithys-Mickalad A. ve arkadaşları²⁶⁷ yaptığı bir çalışmada propofolün antioksidan enzimleri modifiye etmekten ziyade primer olarak ROS yakalayıcısı olarak hareket ettiğini önermektedir. Diğer taraftan propofolün glutasyon ile ilişkili antioksidan sistemleri modifiye ettiği diğer bazı çalışmalarda gösterilmiştir²⁶⁸. Propofolün benzer yararlı etkilerine başka dokularda da rastlanmıştır: Ratlarda oluşturulan torsiyon/detorsiyon modelinde, propofol ile uyutulan ratlarda doku hasarının ve MDA düzeylerinin kontrole göre anlamlı olarak düşük çıktığı bulunmuştur²⁶⁹. Benzer olarak rat bağırsak İskemi Reperfüzyon Hasarında'da propofolün, MDA, TNF- α ve IL-6 düzeylerini karaciğer ve ileumda tiopental ile uyutulan gruba göre azalttığı gösterilmiş ve propofolün inflamasyonda önemli rolü olan bu sitokinler üzerinden etkisini, kısmen de olsa, meydana getirebileceği ifade edilmiştir²⁷⁰.

Bizim çalışmamızda da LPS sonucu artan MDA düzeyleri ile LPS+Propofol verilen grup ve LPS+Ketamin verilen grubun MDA düzeyi karşılaştırıldığında, LPS grubuna göre ketamin ve propofol grubunda MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlemlenmiştir. Bunun yanında propofol ketamine oranla daha etkili olduğu gözlemlendi. Buna ek olarak 5. grubumuz olan ketofol grubu ketamin grubundan daha etkili olması ve propofol grubundan daha az etkili olması propofolün ketamine oranla oksidatif strese karşı daha etkili koruma sağladığını destekler niteliktedir.

Ratlarda sepsise bağı olarak meydana gelen doku hasarı, artmış MDA, NO ve endotelin-1 düzeyleri ve azalmış SOD aktivitesi propofol tarafından normale çevrildiği ayrıca MDA, NO ve endotelin-1 arasındaki pozitif korelasyon lipid peroksidasyonundan bu üç bileşenin sorumlu olduğunu düşündürmüştür²⁷¹. Öte yandan, propofolün iNOS ekspresyonunu LPS ile aktive edilen makrofajlarda inhibe ettiği gösterilmiştir²⁷¹⁻²⁷³. Endotelin-1'in O₂⁻ açığa çıkardığı gerçeğinden hareketle, propofolün MDA'yı, endotelin-1 düzeyini azaltarak, düşürebileceği aynı çalışmada iddia edilmiştir²⁷¹. Görüldüğü gibi propofolün antioksidan etkisinden çeşitli mekanizmalar sorumlu olabilir. Antioksidan yönde çalışan bir enzim olan HO-1'in de propofolün etkisinden kısmen sorumlu olabileceği ratlarda yapılan ve böbrek dokusu mercek altına alınan bir sepsis modelinde mRNA ve protein ekspresyonu üzerinden gösterilmiştir²⁷⁴. Dahası, kültür astrositlerinde ONOO⁻'e bağı DNA hasarının ve apoptozisin propofol tarafından HO-1 aracılığıyla azaltıldığı gösterilmiştir²⁷⁵.

Her ne kadar anestezik dozda verilen propofol ve ketaminin sepsise karşı kalbi koruyan etkisini araştıran çalışmalar pek yoksa da, bizim çalışmamızda propofol ve ketamin koruyucu etki göstermiştir. İndüklenebilir NO sentaz enziminin (iNOS) aşırı aktivitesi sonucu açığa çıkan NO'un ise zararlı etkilerinin olduğu da genel olarak kabul edilmektedir²⁷⁶. Bununla ilişkili olarak, propofol ve ketamin anestezisinin, endotoksemiye bağı mide hasarında iNOS ekspresyonunu baskılayarak koruyucu etki yaptığı tespit edilmiştir²⁷⁷. Bu mekanizmanın kalp dokusunda geçerli olup olmadığı mevcut verilerle ileri sürülemez de, iNOS'un ürettiği yüksek miktardaki NO'un oksidan travmaya yol açabileceği ihtimali de göz ardı edilmemelidir. Üstelik iNOS'un sepsis'deki aşırı aktivasyonunun zararlı etkisi deney hayvanlarında gösterilmiştir^{278,279}.

Molina ve arkadaşları, 1 mg/kg intravenöz (iv) LPS enjeksiyonundan 90 dakika sonra ötenazi uyguladıkları ratların kalplerinde, NO üretimini bir indeksi olan Nitrit/Nitrat konsantrasyonunu Griess yöntemi ile ölçmüşler ve sonuç olarak, LPS uygulamasının kalpteki NO miktarını anlamlı bir şekilde arttırdığını bulmuşlardır²⁸¹.

Y. Saito Shibakawa ve arkadaşları²⁴³, LPS ile endotoksemi oluşturdukları hücre kültürlerine düşük doz ve yüksek dozda LPS verdikleri grublara ketamin ve propofol uygulaması sonucu ketaminin düşük doz LPS’de daha iyi etki gösterdiğini propofol yüksek doz LPS’de daha iyi etki gösterdiğini rapor edilmiştir. Chung-Hsi Hsing ve arkadaşları²⁵⁷ tarafından hücre kültüründe yapılan bir çalışmada LPS ile oluşturulan sepsiste propofolün hem dozaj etkisi hem de zamanla etkisinin nasıl değiştiği incelenmiştir. Propofolün düşük dozajlarında bile koruyucu etkisini göstermiştir ve zamanla koruyucu etkisini koruyarak ROS ve NO düzeylerinde sürekli azalma meydana geldiği bildirilmiştir. LPS ile aynı şekilde endotoksemik model oluşturan lipoteikoik asit ile hücre kültüründe oluşturulan sepsis modeli Wen-Ta Chiu ve arkadaşları²⁵⁸ tarafından çalışılmış ve propofolün yüksek NO düzeylerini anlamlı bir şekilde düşürerek koruyucu etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Kenneth S. Helmer ve arkadaşları²⁷⁷ tarafından yapılan bir çalışmada iki farklı grup oluşturularak iNOS düzeyleri incelenmiştir. Grup 1; sadece serum fizyolojik verilen ve sadece ketamin verilen grup karşılaştırılmıştır, iNOS seviyelerinde herhangi bir değişikliğin olmadığı rapor edilmiştir. Grup 2; LPS ile endotoksemi oluşturulan grup ve LPS sonrası ketamin verilen grup karşılaştırıldığında sadece LPS verilen grupta iNOS düzeylerinde oldukça ciddi artış meydana geldiği ve ketaminin verildiği grupta iNOS seviyelerinde anlamlı düşüş olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmanın bire bir aynısı olan James W. Suliburk ve arkadaşları²⁸² tarafından elde edilen sonuçlar ile bir birlerini desteklemektedirler.

York A. Zausig ve arkadaşları²⁸³ tarafından yapılan bir çalışmada septik şoktaki hastalarda aralarında ketamin ve propofolünde olduğu beş anesteziik ilaçların kalp dokularındaki koruyucu etkisi araştırılmış ve propofolün ketamine oranla daha etkili koruma sağladığı yazarlar tarafından rapor edilmiştir.

Bizim çalışmamızda da LPS sonucu artan Nitrit/Nitrat (NO) düzeyleri ile LPS+Propofol verilen grup ve LPS+Ketamin verilen grubun NO

düzeyi karşılaştırıldığında, LPS grubuna göre ketamin ve propofol grubunda NO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlemlenmiştir. Bunun yanında propofolün ketamine oranla daha etkili olduğu gözlemlendi. Buna ek olarak 5. grubumuz olan ketofol grubu ketamin grubundan daha etkili olması ve propofol grubundan daha az etkili olması propofolün ketamine oranla oksidatif strese karşı daha etkili koruma sağladığını destekler niteliktedir.

Çoğu anesteziğin ağrı kesici etkileri de vardır ve bu etkilerini prostoglandin sentezinin inhibisyonunun bir sonucudur. Bunlara ketamin ve propofol bileşikleri örnek olarak verilebilir. Bunlar siklooksijenaz yolunu non-selektif olarak inhibe ederek etkirler. Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) izoenzimlerinin her ikisini de inhibe ederler. Siklooksijenaz arasıdonik asitten tromboksan ve prostaglandin yapımında katalizör görevi görür. Prostaglandinler inflamasyon oluşum sürecinde diğer görevli maddelerle birlikte iletim molekülü olarak rol oynar. Bu etki mekanizması John Robert Vane tarafından ortaya çıkarılmasıyla 1982’de Nobel ödülü sahibi oldu.

COX-2 enzimi LPS gibi ekzojen uyarılara veya endojen olarak salınan TNF- α gibi proinflamatuvar stokinlere bağlı olarak indüklenebilmektedir²⁸⁴.

COX-2 geninin transkripsiyonu çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. COX-2 geninin 5’ ucunda TATA kutusu ve çeşitli transkripsiyon faktörleri için bağlanma dizisi yer alır. COX-2 geninin 5’ promotör bölgesinde 2 varsayılan nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) bağlanma bölgesi vardır. Bu transkripsiyon faktörleri NF- κ B, Aktivatör protein-1 (AP-1), siklik AMP cevap elemanı bağlanma proteini (CREB), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP β ve δ), USF-1 (upstream uyarıcı faktör-1)’dir. NF- κ B ve AP-1, inflamasyon ve hücrel uyarım gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alan hedef genlerin ifadenmesini bağımsız olarak ve koordineli bir şekilde düzenler. Her iki

transkripsiyon faktörü de septik şok sırasında oksidatif stresin gelişimine neden olur^{156,164,165}.

COX-2 ifadelenmesi ve buna bağlı olarak PGE₂ ve PGF₂ düzeyi inflamasyon durumlarında artar. Bundan dolayı da COX-1 ve COX-2 enzimlerinin düzeyleri septik şokta önem kazanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada COX-1 ve COX-2 miktarlarının septik şokun başlamasından sonra değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir^{156,166,167}.

Ratlarda peritoneal makrofajlarında bazal koşullarda LPS ile stimülasyonu takiben COX-2'nin indüklendiğini ve buna paralel olarak PGE₂ oluşumunda belirgin artış olmasıyla hipotermiye neden olduğu rapor edilmiştir²⁸⁵. Kemirgen beyinde LPS ile uyarılmasıyla akut dönemde predominant olarak sentezlenen siklooksijenaz ürününün PGD₂ olduğu bilinmektedir ve PGD₂'nin hipotermik etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir²⁸⁶. LPS enjeksiyonu takiben dokularda COX-2 indüklenmesi yaklaşık 4 saat içinde maksimuma ulaşmaktadır²⁸⁴. O halde LPS ile ilk iki saat içinde termoregülatuar etkiler COX-1 aracılığı ile salgılanan prostaglandinlere bağlı olmalıdır. Bu yüzden ki bizim çalışmamızda LPS enjeksiyonundan 3 saat sonra ötenazi yapıldığından, COX-2 enzimine bakmayı uygun gördük.

Kenneth S. Helmer ve arkadaşları²⁸⁸ tarafından yapılan bir çalışmada ratlara LPS enjeksiyonu ile birlikte ketamin ve ksilazin verilmesinden sonra TNF- α , iNOS ve COX-2 düzeyleri incelendiğinde sadece LPS verilen gruba göre her üç parametrede de anlamlı bir şekilde düşüşün dözlemlendiği rapor edilmiştir. James W. Suliburk ve arkadaşları²⁸⁹ tarafından yapılan bu çalışmada ratlara LPS enjeksiyonu ile birlikte ketamin verilmesinden sonra NF- κ B, iNOS ve COX-2 düzeyleri incelendiğinde sadece LPS verilen gruba göre her üç parametrede de anlamlı bir düşüşün dözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu çalışmalara ışık tutacak endotoksemik modellerin kalp dokularındaki COX-2 düzeylerine propofolün etkisi araştırılmadığından, bizim çalışmamızı bu konuda bir ilk olduğunu söyleyebiliriz.

Ketamin ile ilgili yapılan tüm bu çalışmalar ışığında bizim çalışmamız incelendiğinde LPS ile artan COX-2 düzeyleri ketamin ve propofolün verilmesi ile daha düşük değerlere gerilediğini rapor edebiliriz. Aynı zamanda yapılan çalışmaları destekler nitelikte olan NO, TNF- α ve NF- κ B düzeylerindeki düşüşte bizim çalışmamızı daha güvenilir kılmaktadır. Propofolü ketamine göre kıyasladığımızda ise propofol ketamine göre daha az koruyucu olduğu söylenebilir. Ancak TNF- α , NO ve COX-2 birlikte karşılaştırıldığında propofol TNF- α ile COX-2'ye göre daha az koruyucu etki gösterdiğini ve NO'ya göre ise ketaminden daha fazla koruyucu etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Propofol yapısal olarak E vitaminine benzediğinden direk antioksidan etki gösterdiğini düşünürsek bu sonucun çıkması oldukça doğal olduğunu söyleyebiliriz.

HO-1 stres sonrası artış gösteren *hem* içerikli proteinlere yanıt olarak artmakla kalmayıp *hem* içermeyen NO, prostaglandin, sitokin, endotoksin ve ROS'leri tarafından da provoke edilir. Hipoksi, hiperoksi ve septik şok gibi durumlarda artış gösterdiği de ispatlanmıştır. HO-1'in anti-oksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuar özellikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir²⁹⁰.

HO-1'in ve katalitik ürünlerinin (CO, bilirubin, ferritin) koruyucu etkileri çeşitli şekillerde açıklanmaya çalışılmıştır. Bu metabolitlerin kimi şartlarda hücreye toksik kimi şartlarda ise koruyucu olduğu bilinmektedir²⁹⁰⁻²⁹⁴.

Bu metabolitlerden CO, diatomik benzeri NO gibi bir nörotransmitter ve vasküler gerim düzenleyici olarak çalışmaktadır. Eksojen olarak verilen CO'nin endotoksemiye karşı koruduğu gösterilmiştir. İlaveten CO prositokin oluşumunun engellenmesi ile endotelyal apoptozun önlenmesinde de etkilidir. CO'nin bu etkisini NF- κ B üzerinden gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca hücrenin yaşlanması ile beraber artış gösteren NF- κ B'nin HO-1 düzeyini arttırdığı öne sürülmektedir²⁹⁵⁻²⁹⁷. Biliverdinden redüksiyon ile oluşan ve güçlü bir redoks siklusüne dayanarak üretilen bilirubin de toksik potansiyelinin yanı sıra güçlü bir antioksidandır²⁹².

Son dönem çalışmalar HO-1'in diğer antioksidan ajanlarla etkileşimi üzerinedir. Bunların bazılarında oksidatif stres durumlarında arttığı bilinen diğer ajanlardan GSH'nun etkileri bloke edilmeye çalışılmış ve bunun HO-1 enzim sistemi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. L-butyonin-sulfoksimin adlı inhibitörün kullanımı sonrası GSH'nun devre dışı kalması ile HO-1'in yükseldiği gösterilmiştir²⁹⁸. HO-1 ile pozitif etkileşim gösteren diğer bir madde de NO'tir. Glukozun tüketilmesi ile hücrede oluşan oksidatif stres durumunda NO koruyucu etkisini HO-1'i arttırarak ortaya koymaktadır²⁹⁹.

Maulik³⁰² ve Sharma³⁰³ tarafından iskemi-reperfüzyon uygulanmış dokularda yaptıkları çalışmalarda miyokardın korunmasında olaya karışan NO'nun, cGMP bağımlı koruyucu mekanizmasının CO tarafından modüle edildiği göstermiştir. Her geçen gün artarak gelen kanıtlar CO üretimine öncülük eden HO aktivitesi ve NOS tarafından NO oluşumu arasında sıkı bir ilişkinin varlığını ortaya koymaktadır³⁰⁴. Vos ve arkadaşları³⁰⁵, endotoksemik ratlarda iNOS aktivitesinin GSH-redoks statüsü tarafından modüle edildiğini, GSH azaldığında iNOS aktivitesine yönelik bir durumun hücrenin korunmasına yönelik olduğunu ve bu modülasyonun NF-κB yoluyla gerçekleştiğini ve HO-1 ile bağlantılı olduğunu ifade etmişlerdir. Rahman ve arkadaşları³⁰⁶ da glutatyon redoks statüsündeki değişim oksidanların etkisi sonucu NF-κB ve diğer bazı transkripsiyon faktörleri yoluyla hem HO-1 hem de iNOS'un transkripsiyonel regülasyonu sağlanarak gen ifadelerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

ROS'un hepatositlerde ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile artırılması sonucunda iNOS mRNA'da doza bağımlı olarak NF-κB aracılı bir artışın gerçekleştiği gösterilmiştir. ROS'un ortadan kaldırılması ise NF-κB'yi inhibisyon yönünde regüle etmiştir³⁰⁷.

James W. Suliburk ve arkadaşları²⁸² tarafından ratların karaciğerinde yapılan bir çalışmada LPS grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında HO-1'in arttığını ve ketaminin LPS grubuna verilmesi ile HO-1 düzeyini arttırıcı yönde regüle ettiğini, yine aynı bilim adamının önderliğinde yapıldığı bir başka

çalışmada da³⁰⁹ aynı sonuçları bularak destekledikleri, yazarlar tarafından rapor edilmiştir.

Kenneth S. Helmer ve arkadaşları³¹⁰ tarafından yapılan bir başka çalışmada kontrol grubuna kıyasla sadece ketamin verilen grupta HO-1 enzim düzeyinde artış görüldüğü, LPS verildiğinde bu her iki gruptan neredeyse 4 kat daha fazla HO-1 düzeyinin bulunduğunu LPS enjeksiyonu ile ketamin verilmesinden sonra HO-1 düzeyinin sadece LPS verilen gruba kıyasla daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Tüm bu çalışmalar gösteriyor ki ketamin HO-1 enzimini arttırıcı yönde regülasyonunu sağlamaktadır. Kenneth S. Helmer ve arkadaşlarının yaptığı çalışma³¹⁰ ile bire bir aynı olan sadece ketamin yerine propofol kullanılan bir çalışmada Hui-hua WANG ve arkadaşları³¹¹ tarafından yapılarak, propofolün de ketamin ile aynı etkiyi göstererek HO-1 enzimini arttırıcı yönde regüle ettiği rapor edilmiştir.

Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna kıyasla LPS verilen grupta HO-1 enziminde artışın olduğunu, LPS enjeksiyonu sonrası ketamin, propofol, ketofol verilen guruplarda, LPS grubuna oranla daha fazla artışın olduğu ancak ketamin grubunda en fazla artışın olduğunu gözlemledik. Böylece ketamin propofole göre HO-1 enzimini daha fazla arttırarak hücreleri daha iyi koruduğunu söyleyebiliriz.

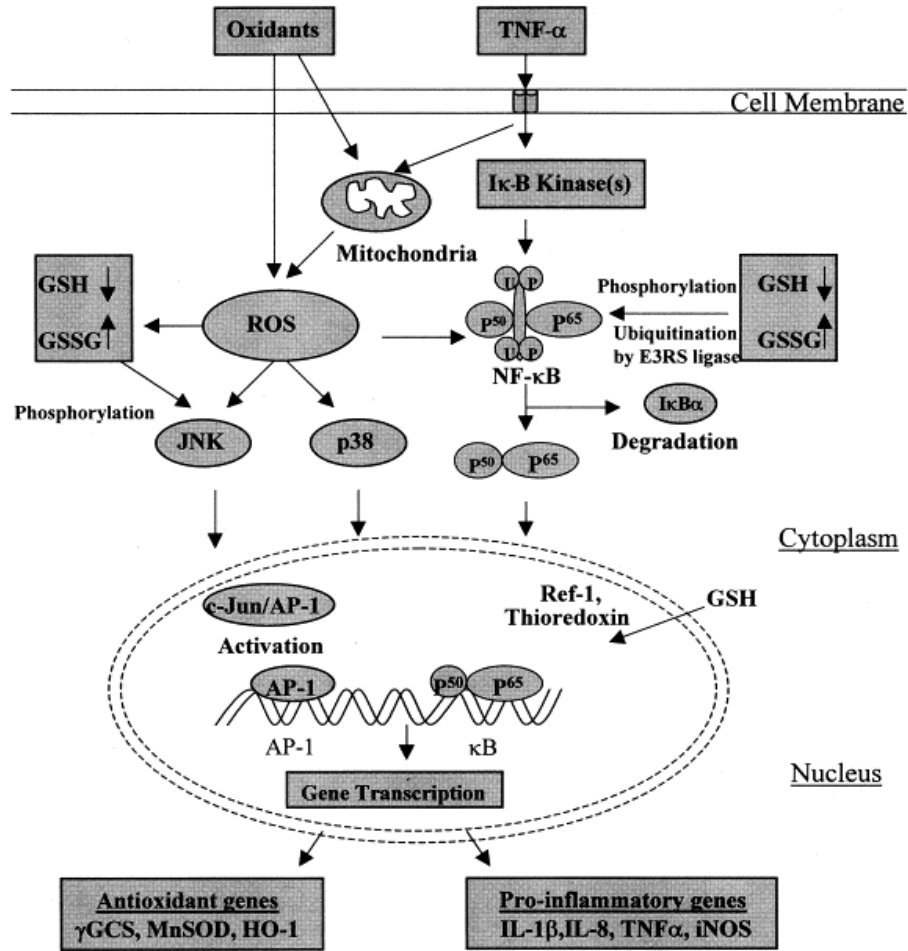
HO-1 ile COX-2, NO, MDA, NF-κB ve TNF-α arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda; ratlarda endotoksemi veya hücre kültüründe sepsis oluşturduktan sonra ketamin ve/veya propofol verilmesiyle COX-2, NO, MDA, NF-κB ve TNF-α düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırılmış ayrıca HO-1 enziminin tüm bu parametrelere ne düzeyde etki yaptığını belirlemek için HO-1 enziminin inhibitörü olan Sn-Protoporfirin (Sn-PPN) veya Zn-Protoporfirin (Zn-PPN) verilerek HO-1 enzimini inhibe edilmesi ile COX-2, NO, MDA, NF-κB ve TNF-α düzeyleri incelenmiş. Bu çalışmaları aşağıdaki tabloda 8 grup oluşturarak parametreler aralarındaki ilişkiyi açıklayabiliriz.

	1.Enjeksiyon	2.Enjeksiyon	3.Enjeksiyon
1.Grup	SF	SF	SF
2.Grup	SF	SF	LPS
3.Grup	SF	Ketamin ve/veya Propofol	SF
4.Grup	SF	Ketamin ve/veya Propofol	LPS
5.Grup	Sn-PPN	SF	SF
6.Grup	Sn-PPN	SF	LPS
7.Grup	Sn-PPN	Ketamin ve/veya Propofol	SF
8.Grup	Sn-PPN	Ketamin ve/veya Propofol	LPS

Böylece 1. grup ile 2. grup karşılaştırıldığında LPS'nin etkisini, 2. grup ile 3. grup karşılaştırıldığında ketamin ve/veya propofolün etkisini, 2. grup ile 6. grup ve 3. grup ile 7. grup karşılaştırıldığında Sn-PPF'nin HO-1'i inhibe etmesi ile HO-1'in COX-2, NO, MDA, NF- κ B ve TNF- α üzerine etkisini araştırılmış. Bu çalışma protokolü ile James W. Suliburk ve arkadaşları²⁸² HO-1'in iNOS, COX-2 ve NF- κ B düzeyleri arasındaki ilişkiyi, Yusuf Ergün ve arkadaşları³¹² HO-1'in MDA ve TNF- α düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelediğinde sadece LPS verilen grupta kontrol grubuna göre tüm parametrelerin arttığını, LPS sonrası ketamin veya propofol verilen grup sadece LPS verilen gruba göre tüm parametrelerin azaldığını, LPS sonrası ketamin veya propofol ile birlikte Sn-PPN verilerek inhibe edilen HO-1 sonucu tüm parametrelerin aşırı arttığını yazarlar tarafından rapor edilmiştir. Buna ek olarak LPS sonrası ketamin veya propofol verilmeden sadece Sn-PPF verilen gruplarda tüm bu hücre hasar belirteçlerinde daha da fazla artışın olduğu rapor edilmiştir. Daha önce bahsettiğimiz çalışmalarda da ketamin ve propofolün HO-1 enzimini arttırarak hücreleri koruduğunu söylemiştik. Bu çalışmalarda da septik hücreye verilen Sn-PPF ile HO-1'i inhibe ettiğinde tüm hücre hasar belirteçleri olan COX-2, NO, MDA, NF- κ B ve TNF- α parametrelerini arttırdığını düşünebiliriz.

Canlı organizmada, LPS ile oluşan sepsis sonucunda makrofajlar hücrelerinde pro-oksidanlar oluşur²⁷¹⁻²⁷³. Bu oksidanlar aktive kupffer hücreleri, proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α 'ı üretir ve salgılar^{250,251}. ROS ve TNF- α

hücrede sinyal yollarını protein kinaz veya protein fosfatazlar yoluyla yönlendirebileceği gibi doğrudan NF- κ B ve benzeri transdüksiyon faktörlerini de etkileyerek yönlendirebilmektedir. NF- κ B, ROS tarafından regüle edildiği gösterilen ilk transkripsiyon faktördür ve genellikle hücrede oksidatif strese en duyarlı transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir³⁰⁸. Aktive olmuş NF- κ B hem HO-1'in hem de iNOS'un transkripsiyonal regülasyonunu sağlayarak gen ifadelerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (Şekil-35)³⁰⁶.



Şekil-35: HO-1 ve iNOS aktivitesinin NF- κ B yolu ile transkripsiyonal regülasyonu³⁰⁶.

COX-2 geninin transkripsiyonu çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. Bunlardan en önemlisi COX-2 geninin 5' promotör bölgesinde 2 varsayılan nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) bağlanma bölgesidir.

NF- κ B, sepsis’de önemli bir ROS kaynağı olan nötrofillerin dokuya migrasyonunu sağlayan birçok maddenin ve iNOS ekspresyonunun yanında COX-2 ve HO-1’i de nükleus düzeyindeki etkilerini arttıran bir maddedir. Ketamin ile propofol rahatlıkla bunun üzerinden etki yapabilir²⁸⁰.

Anestezik dozda verilen propofol ve ketaminin NF- κ B’yi azalttığını ve bunlar ile birlikte apoprotein1(AP1) gibi transkripsiyon faktörlerinin miktarını da azalttığı bulunmuştur²⁷⁷.

Propofol ve ketamin doğrudan antioksidan etkisi ile MDA ve NO, NF- κ B üzerinden dolaylı yoldan NO, TNF- α ve COX-2 seviyelerinde düşüşe neden olduğu göz önüne alınırsa bu anesteziklerin koruyucu etkisinin olduğu söylenebilir. Bunun ile birlikte NF- κ B’nin bloke edilmesinin apoptotik yanıtta artışa ve büyümede azalışa neden olduğunu göstermesi, HO-1’in büyüme ile ilişkisini ve antiapoptotik etkisini kanıtlayan çalışmaların varlığı nedeni ile HO-1’in NF- κ B ile bağlantısının ve bu yolda regülasyonunun organizmayı korumasına yönelik olduğunu kanıtı olarak değerlendirildiği rapor edilmiştir³⁰⁸.

Bizim çalışmamızda da; sadece SF verilen kontrol grubuna göre LPS verilen sepsis grubu incelendiğinde ROS belirteci olan MDA düzeyi, ROS artışına bağlı olarak TNF- α düzeylerinin arttığı, ROS ve TNF- α ’nın hücreye girişi ile NF- κ B’nin aktive olduğu, NF- κ B aktivasyonu ile COX-2, HO-1 ve iNOS’un transkripsiyonal gen regülasyonu sağlanarak COX-2, HO-1 ve iNOS’dan dolayı da NO’nun arttığı gözlemlendi.

LPS sonrasında verilen anestezik ilaçların, tüm bu parametreler doğrultusunda canlı organizmayı koruduğu açıkça ortadadır.

6.SONUÇ

Lipopolisakkarit ile indüklenen endotoksemik rat modelinde birçok inflamatuvar sitokin salınımını, oksidatif stres ürünleri, birçok proteinin salınımını etkimektedir. Bu çalışmada anestezi ilaçları olan ketamin ve propofolün endotoksemi sonrası salınımını etkileyen parametrelerden olan TNF- α , NF- κ B, MDA, NO, COX-2 ve HO-1 düzeyleri incelendi.

Çalışmaların sonucu olarak MDA ve NO düzeylerindeki artışın LPS ile endotokseminin neden olduğu aşırı stresin bir sonucudur.

LPS ile endotoksemi oluşturulduğunda hücrelerde aşırı stres meydana geldiğini böylece NF- κ B aktivasyonu gerçekleştiğini. Bu aktivasyonunda TNF- α sentezini uyardığını söyleyebiliriz.

İndüklenen NF- κ B'nin bloke edilmesinin apoptotik yanıtta artışa ve büyümede azalışa neden olduğunun bilinmesi, ayrıca HO-1'in büyüme ile ilişkisini ve antiapoptotik etkisini kanıtlayan çalışmaların varlığı nedeni ile, HO-1'in NF- κ B ile bağlantısının ve bu yoldan regülasyonunun, organizmayı korunmasına yönelik olduğunun kanıtı olarak değerlendirilebilir.

Oksidatif stres ürünlerinden biride prostaglandin proteinleridir. Bu proteinler COX enzim sistemlerinin son ürünüdür. COX enzim sistemlerin 2 ila 4. saatler arasında COX-2 enziminin maksimum olması ve bizim ratlara 3. saatte ötenazi uygulamamız COX-2'nin bizim ilgi odağımız olmasına neden oldu. COX-2 enziminin de yapılan çalışmalar ışığında NF- κ B ile bağlantısının olduğunu söylememiz bizim çalışmamızdaki TNF- α , NF- κ B, MDA, NO, COX-2 ve HO-1 aralarındaki bağlantının varlığını ve endotoksemi sonucu oluşan oksidatif strese etkili olduğu sonucunu çıkarabiliriz.

Tüm bu bilgiler kullanılarak ketamin ve propofolün de endotoksemi ile gelişen oksidatif strese karşı koruyucu olduğu sonucu çıkarılabilir.

7.ÖZET

Lipopolisakkarit ile indüklenen endotoksemik rat modelinde ketamin, propofol ve ketafol kullanımının inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkisi.

LPS, Gram (-) bakterilerin duvarlarında bulunan ve canlılar için oldukça toksik olan bir moleküldür. LPS canlı vücuduna nüfuz ettiği zaman endotoksemi meydana gelir ve ileri seviyelere ilerlediği durumlarda septik şok oluşur. LPS ile oluşturulan endotoksemi sonucu inflamasyon ve oksidatif stres meydana gelir. Biz bu çalışmada ratların kalbinde, endotoksemi sonrası verilen ketamin, propofol ve ketofolün (ketamin ve propofolün 1:1 oranında karışımı) hücre hasarına karşı dolaylı yoldan ve/veya direk olarak ne düzeyde koruyucu olduğunu incelemek için prositokin olan TNF- α ve bir çok proteinin gen ekspresyonundan sorumlu NF- κ B, oksidatif stres sonucu oluşan NO ve lipid peroksidasyonunun belirteci olan MDA, inflamasyondan sorumlu bir enzim olan COX-2 ve hücre hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olan HO-1 enzim düzeylerini ölçerek birbirleri ile ilişkisini araştırdık.

TNF- α ve NF- κ B düzeyleri ELİSA, NO ve MDA düzeyleri spektrofotometrik, Cox-2 ve HO-1 enzim düzeyleri Western-Blot yöntemi ile ölçüldü.

LPS ile oluşturulan endotoksemide çalışılan tüm parametrelerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$).

Endotoksemi sonrası ketamin verilmesiyle çalışılan tüm parametrelerde LPS grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,05$).

Endotoksemi sonrası propofol verilmesiyle TNF- α , NO, MDA, COX-2, HO-1 düzeyleri LPS grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,05$). Ancak NF- κ B seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte hafif bir yükselme gözlemlendi.

Endotoksemi sonrası ketofol verilmesiyle TNF- α , NO, MDA, COX-2, HO-1 düzeyleri LPS grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,05$). Ancak NF- κ B seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yükselme gözlemlendi.

Endotoksemi sonrası propofol verilmesiyle ketamin grubuna göre MDA düzeyleri istatistiksel olarak düşük ($p<0,05$), NF- κ B dışında diğer tüm parametrelerde anlamlı derecede yükselme gözlemlendi ($p<0,05$).

Endotoksemi sonrası ketofol verildiğinde NO, Cox-2 ve HO-1 düzeyleri ketamin grubuna göre daha yüksek, propofol grubuna göre ise daha düşük bulundu ($p<0,05$). MDA düzeyleri ketamin grubuna göre düşük, propofol grubuna göre yüksek gözlemlendi ($p<0,05$). TNF- α ($p<0,05$) ve NF- κ B ($p>0,05$) düzeyleri hem ketamin hem propofol verilen gruplara göre daha yüksek saptandı.

Bulgularımız endotoksemi sonrası uyguladığımız anesteziğin TNF- α , NF- κ B, MDA, NO ve Cox-2 düzeylerini düşürerek, dolaylı yoldan ve/veya direk olarak oksidatif hasara karşı koruduğunu düşünebiliriz, canlı organizmayı koruyucu etkisi olarak bilinen HO-1 (Hsp-32) enzim düzeylerini de dolaylı yoldan artırarak hücre hasarına karşı koruduğunu söyleyebiliriz.

Bu koruyucu etkinin anesteziğin arasında yapılan kıyaslamada da ketaminin propofolden daha fazla koruyucu etki gösterdiğini, ketofolün de aditif etki gösterdiği bulgularımızla desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lipopolisakkarit, Tümör Nekrozis Faktör–Alfa, Nükleer Faktör–Kappa B, Siklooksijenaz–2, Hem Oksijenaz–1, Malondialdehit, Nitrik Oksit, Ketamin, Propofol.

8.SUMMARY

Effects of ketamine, propofol and ketofol on the inflammation and oxidative stress in LPS-induced endotoxemic rat model.

LPS, is a highly toxic molecule, which is being in the wall of gram negative bacteria, for all the living creatures. An endotoxemia occurs when the LPS penetrates into a body and a septic shock occurs in the advanced endotoxemia levels. Inflammation and oxidative stress appears as a result of the endotoxemia made by LPS. In this study, we research the directly and/or indirectly protective levels of ketamine, propofol and ketofol which are administered after the endotoxemy, against the cell injuries, by reviewing the enzyme levels of TNF- α , which is a proinflammatory; NF- κ B, which is responsible for the gene expression of a great numbers of the proteins; NO, which appears as a result of the oxidative stress; MDA, which is an indicator of the lipid peroxidation; COX-2, which is an enzyme responsible for the inflammation, and HO-1, which has an protective impact on the cell injuries in the rats.

The levels of TNF- α and NF- κ B were measured by ELISA, the levels of MDA and NO were measured by spectrophotometric, the levels of COX-2 and HO-1 were measured by Western-Blot.

The all parameters studied in created endotoxemia with LPS were significantly found higher than control group ($p < 0,05$).

The all parameters studied in injected ketamine after endotoxemia were significantly found lower than LPS group ($p < 0,05$).

The levels of TNF- α , NO, MDA, COX-2, HO-1 in injected propofol after endotoxemia were significantly found lower than LPS group ($p < 0,05$). But the levels of NF- κ B were found little rise with not a statistically significant.

The levels of TNF- α , NO, MDA, COX-2, HO-1 in injected ketofol after endotoxemia were significantly found lower than LPS group ($p<0,05$). But the levels of NF- κ B were found little rise with not a statistically significant.

The level of MDA in injected propofol after endotoxemia was significantly found lower than ketamine group ($p<0,05$). And the all parameters other than NF- κ B were significantly found higher ($p<0,05$).

The levels of NO, Cox-2 ve HO-1 in injected ketofol after endotoxemia were significantly found higher than ketamine group, lower than propofol group ($p<0,05$). The level of MDA was significantly found lower than ketamine group, higher than propofol group ($p<0,05$). The levels of TNF- α ($p<0,05$) and NF- κ B ($p>0,05$) in injected ketofol after endotoxemia were significantly found higher than both ketamine and propofol group.

We can express that the anaesthetics are protective against the cell injuries by reducing the levels of TNF- α , NF- κ B, MDA, NO and Cox-2, which indicates to inactivate the free radicals in a directly and/or indirectly manner, and that it has also an indirect protective effect against the cell injuries by increasing HO-1 (Hsp-32) enzyme levels, which is known its protective effect.

We can also express that ketamine has a more protective effect than the propofol in a comparison between the anaesthetics. Show additive effect of ketofol supported with our findings.

Key Worlds: Lipopolysaccharide, Tumor Necrosis Factor–Alpha, Nuclear Factor–Kappa B, Cyclooxygenase–2, Heme Oxygenase–1, Malondialdehyde, Nitric Oxide, Ketamine, Propofol.

9.KAYNAKLAR

1. Mackay RJ. Endotoxemia, Large Animal Internal Medicine, Ed: Thomson B., Mosby, Miisouri 1996; 733-741.
2. Lohuis JACM, Verheijden YHM, Burvenich C, Van Miert ASJPAM. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 1.Changes in body temparature and reticulo-rumen motility and the effect of repeated administration, The Veterinary Quarterly 1988; 10,2, 109-116.
3. Fısgın NT. Sepsis, OMÜ Tıp Dergisi 2004; 21,2 100-109.
4. Levi M, Van der Poll T, Ten CH, van Deventer SJH. The cytokine-mediated imbalance between coagulationt and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxemia, Europen Journal of Clinical Investigation 1997; 27,3-9.
5. Hardaway RM. A Review of Septic Shock, Am Surg 2000; 66,22-29.
6. Levi M, de Jonge E, Van der Poll T, Ten CH. Novel approaches to the management of disseminated intravascular coagulation, Crit Care Med 2000; 28,9,20-24.
7. Çöl R, Durgun Z. Tavsanlarda endotoksin ile olusturulan dissemine intravasküler koagulasyon üzerine vitamin e ve prednisolon'un etkileri, Vet Bil Derg 2004; 20,1,29-38.
8. Costable PD. General Medicine, Veterinary Medicine Ed Radostits OM, 10th ed. Salinders, USA 2007; 51,58.
9. Tizard I. Veterinary Immunology An Introduction, 4th. ed. W.B Saunders Co, 1992,Philadelphia, USA.
10. Elmas M, Yazar E, Uney K, Karabacak A. Pharmacokinetics of flunixin after intravenous administration in healthy and endotoxaemic rabbits, Vet Res Commun, 2006; 30, 73-81.
11. Elmas M, Yazar E, Uney K. and Karabacak A. Influence of escherichia coli endotoxin-induced endotoxaemia on the pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous administration in rabbits, Journal of Veterinary Medicine A, 2006; 53, 410-414.

12. Elmas M, Yazar E, Uney K, Karabacak A, Tras B. Pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine and interactions between both drugs after intravenous co-administration in healthy and endotoxaemic rabbits, *Vet J*, 2007; 16.
13. Turgut B, Vural Ö, Demir M, Kutlu K, Kayapınar R. Effect of pentoxifylline and indomethacin on rabbits with endotoxin induced disseminated intravascular coagulation (DIC) and comparison with heparin, *Türk J. Hematol*, 2006; 23,1,37-46.
14. Yazar E, Çöl R, Uney K, Atalay B, Elmas M, Tras B. Effect of pentoxifylline on biochemical parameters in endotoxaemic New Zealand White rabbits *Bull Vet Ins Pulawy* 2004;48,297-299.
15. Yazar E, Çöl R, Konyalıoğlu S, Birdane YO, Elmas M, Bas AL. Effect of vitamin E and prednisolone on biochemical parameters in endotoxaemic New Zealand White rabbits *Bull Vet Ins Pulawy* 2004; 48,105-108.
16. Engin A, Kurukahvecioglu O, Bukan N, Dursun A. Ratlarda lipopolisakkarid ve lipoteikoik asit ile olusan karaciger hasarında l-arginin ve ng- nitro-l-arginin metilester'in etkisi, *TJTES*, 2003; 9,3,163,168.
17. Liu L, Kıtı L, Tanaka N, Kınoshita Y The Expression Of Tumour Necrosis Factor In The Hypothalamus After Treatment With Lipopolysaccharide, *International Journal Of Experimental Pathology*, 1996; 77,1,37-44.
18. Liu HH, Zhao TB, Li ZL. Changes of serum urea and creatinine concentrations in rats with lipopolysaccharide and heat co-exposure *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2008; 28,1,86-88.
19. Yaşar MA, Ödes R, Kizirgil A, Üstündağ B, Yaşar D, Bulut Y, Demirel İ. Sepsis oluşturulan ratlarda kan glukoz düzeyinin mortaliteye etkisi, *Fırat Tıp Dergisi*, 2007; 12,1,1-4.
20. Yazar E, Er A, Uney K, Altunok V, Elmas M. Effect of flunixin meglumine on cytokine levels in experimental endotoxemia in mice, *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 2007; 54,7,352-355.

21. Inoue G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2000; 6,1,51-60.
22. Declue AE, Cohn LA, Lechner ES, Bryan ME, Dodam JR. Effects of subanesthetic doses of ketamine on hemodynamic and immunologic variables in dogs with experimentally induced endotoxemia *Am J Vet Res* 2008; 69,2,228-232.
23. İsmail M. A Pharmacokinetic Study Of Danofloxacin In Febrile Goats Following Repeated Administration Of Endotoxin, *J Vet Pharmacol Therap*, 2006; 29,313-316.
24. Jacopsen S, Niewold TA, Halling-Thomsen M, Nanni S, Olsen E, Lindegaard C, Andersen PH. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005; 110,15,325-330.
25. Danek J. Effects of Flunixin Meglumine on Selected Clinicopathologic Variables and Serum Testosterone Concentration in Stallions after Endotoxin Administration, *J Vet Med A*, 2006; 53, 357-363.
26. Dardi MS, Sharma SK, Srivastava AK. Pharmacokinetics and dosage regimen of ceftriaxone in E. Coli lipopolysaccharide induced fever in buffalo calves, *J Vet Sci*, 2005; 6,2,147-50.
27. Biniek K, Szuster-Ciesielka A, Kaminska T, Konracki M, Witek M, Kandefer-Szerszen M. Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after reated injection low doses of lipopolisacharide, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1998; 62,297-307.
28. Jacopsen S, Toelboell T, Andersen PH. Dose dependency and inividual variability in salacted clinical response after sistemic lipopolysaccharide challenge in cattle, *Vet Res* 2005; 36, 167-178.
29. Adams JL, Semrad SD, Czuprynski CJ. Administitration of bacterial lipopolysaccharide elicits circulating tumor necrosis factor-alpha in neonatal calves, *American Society for Microbiology*, 1990; 28,5 ,998-1001.

30. Gerros TC, Semrad SD, Proctor RA. Alterations in clinical, hematological and metabolic variables in bovine neonatal endotoxemia, *Can J Vet Res*, 1995; 59,34-39.
31. Fong Y, Moldawet L, Shires GT, Lowry SF. The biological characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170:363–78.
32. Streiter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumour necrosis factor in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 1993; 21:S447– 63.
33. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines, *Adv.Immunol*, 1989; 44,153 205.
34. Gruys E, Obwolo MJ, Toussaint MJM. Diagnostic significance of major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review, *Vet. Bull.*, 1994; 64,1009-1018.
35. Niewold TA, Tousaint MJM, Gruys E. Monitoring health by acute phase proteins Fourth European Colloquium on acute phase proteins 2003; 57-67.
36. Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis, *The Veterinary Journal*, 2004; 168, 28-40.
37. Nukina H, Sudo N, Aiba Y, Oyama N, Koga Y, Kubo C. Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice, *Journal of Neuroimmunology*, 2001; 115,46-52.
38. Yoshioka M, Watanabe A, Shimada N, Murata H, Yokomizo Y, Nakajima Y. Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002; 23,425-433.
39. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr*, 1991; 53:201-205.
40. Sehirli A.Ö, Sener G, Satioglu H, Ayanoglu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in rat. *J Nephrol* 2003; 16: 75-80.

41. Sener G, Sehirli AÖ, Satiroglu H, Keyer UM, Yegen BC. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns*, 2002; 28: 419-425.
42. Youn Y-K, Suh GJ, Jung SE, Oh SK, Demling R. Recombinant human growth hormone decreases lung and liver lipid peroxidation and increases antioxidant activity after thermal injury in rats. *J Burn Care Rehabil* 1998; 19: 542-548.
43. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. Edited by D. Armstrong. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Plenum Press, New York 1994; 1-15.
44. Liew, F.Y. Interactions between cytokines and nitric oxide. *Adv. Neuroimmunol* 1995; 5:201-209.
45. De Groote, M.A. ve Fang, F.C. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 21,162-165.
46. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. Nitric oxide. Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43,109-142.
47. Nathan, C.F. and Hibbs, J.B. Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 1991; 3,65-70.
48. Atilla ENGİN: Yoğun Bakım Hastasında Sepsis Patogenezi ve Tedavi Önerileri, *ANKEM Derg* 11 (No.3) 1997; 353-364.
49. Bone RC: Gram-negative sepsis: Background clinical features, and intervention, *Chest* 1991; 100,802.
50. Bone RC: The pathogenesis of sepsis, *Ann Intern Med* 1991; 115,457.
51. Borden EC, Chin P: Interleukin-6: A cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles, *J Lab Clin Med* 1994; 123,824.
52. Casey LC, Balk RA, Bone RC: Plasma cytokines and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome, *Ann Intern Med* 1993; 119,771.
53. Cassatella MA, Meda L., Bonora S, et al.: Interleukin 10 inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 β in

- mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide, *J Exp Med* 1993; 178: 2207.
54. Dayer J-M, Beutler B, Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin-E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts, *J Exp Med* 1985; 162: 2163.
 55. Dhainaut JF, Tenaillon A, Le Tulzo Y, et al.: Platelet activating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial, BN52021 Sepsis Study Group, *Crit Care Med* 1994; 22: 1720.
 56. Dinarello CA: IL-1 and IL-1 antagonism, *Blood* 1991; 77: 1627.
 57. Dinarello CA: The proinflammatory cytokines IL-1 and TNF and treatment of the septic shock syndrome, *J Infect Dis* 1991; 163: 1177.
 58. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, et al.: TNF (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1, *J Exp Med* 1986; 163: 1433.
 59. Doe WF, Yang ST, Morrison DC, et al.: Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides: Evidence for differentiation signals delivered by lipid A and by a protein-rich fraction of lipopolysaccharides, *J Exp Med* 1978; 148: 557.
 60. Elias JA, Lentz V: IL-1 and TNF synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA, *J Immunol* 1990; 145: 161.
 61. Evans T, Carpenter A, Silva A, et al.: Inhibition of nitric oxide synthase in experimental gram-negative sepsis, *J Infect Dis* 1994; 169: 343.
 62. Fong Y, Tracey KJ, Moldaver LL, et al.: Antibodies to cachectin/TNF reduce IL-1 β and IL-6 appearance during lethal bacteremia, *J Exp Med* 1989; 170: 1627.
 63. Ghexxi P, Dinarello CA: IL-1 induces IL-1: III. Specific inhibition of IL-1 production by IFN- γ , *J Immunol* 1988; 140: 4238.
 64. Go LL, Healey PJ, Watkins SC, et al.: The effect of endotoxin on intestinal mucosal permeability to bacteria in vitro, *Arch Surg* 1995; 130: 53.

65. Hempel L, Korholz D, Bonig H, et al.: IL-10 directly inhibits the IL-6 production in T-cells, *Scand J Immunol* 1995; 41: 462.
66. Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, et al.: The protective role of IL-10 in endotoxin shock, *Prog Clin Biol Res* 1994; 388: 417.
67. Moore FA, Moorw EE, Jones TN, et al.: TEN versus TPN following major abdominal trauma. Reduced septic morbidity, *J Trauma* 1989; 29:916.
68. Munford RS, Hall CL: Detoxification of bacterial lipopolysaccharide (endotoxins) by a human neutrophil enzyme, *Science* 1986; 234: 203.
69. Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, et al.: Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis, *Ann Intern Med* 1994; 120: 771.
70. Petros A, Lamb G, Leone A, et al.: Effect of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock, *Cardiovasc Res* 1994; 28: 34.
71. Szabo C, Wu CC, Mitchell JA, et al.: Platelet-activating factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide, *Circ Res* 1993; 73: 991.
72. Tracey KJ: TNF (cachectin) in the biology of septic shock syndrome, *Circ Shock* 1991; 35: 123.
73. Wright SD, Ramos RA, Patel M, et al.: Septin: A factor in plasma that opsonizes lipopolysaccharide-bearing particles for recognition by CD14 on phagocytes, *J Exp Med* 1992; 176: 719.
74. Marsh CB, Wewers MD: The pathogenesis of sepsis. *Clin Chest Med* 1996; 17:183-197.
75. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, et al. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. In. Rietschel ET, Wagner H (eds). *Pathology of Septic Shock*. 1996, Berlin:Springer-Verlag. S:40-81.
76. Bone RC. The sepsis syndrome. *Clin Chest Med* 1996; 17: 175-181.
77. Sun Z, Andersson R. NF- κ B Activation and Inhibition: A Review. *Shock*. 2002; 18(2): 99-106.

78. Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF- κ B. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:226–232.
79. Eck, M.J., Sprang, S.R. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J.Biol.Chem* 1989; v264: 17595-17605.
80. Davies MG, Hagen PO. Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Br J Surg* 1997; 84:920-35.
81. Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American Collage of Chest Physicans. Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101:1644–55.
82. Lazon V, Barke R.A. Gram (–) bacterial sepsis and the sepsis syndrome. *Urol Clin North Am* 1999; 26:687–699.
83. Edmiston CE Jr, Condon RE. Bacterial translocation. *Surg Gyn Obst.* 1991; 173:73–78.
84. Bone RC. Sepsis syndrome. New insights into its pathogenesis and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 1991; 5:793-805.
85. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg.*1997; 84:920–35.
86. Parillo JE. Pathogenetic Mechanisms of Septic Shock. *N Engl J Med* 1993; 328:1471–77.
87. Dunn DL. Gram Negative Bacterial Sepsis and Sepsis Syndrome. *Surg Clin North. Am.* 1994; 74:621-35.
88. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *An Intern Med.* 1991; 115:457-69.
89. Koçdar HE. Deneysel sepsis modelinde pentoksifilinin myeloperoksidaz, nitrik oksit ve tümör nekroz faktör salınımı üzerine etkileri. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak. Tıpta Uzmanlık Tezi* 1998.
90. Giroir BP. Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit. Care Med* 1993; 21:780–86.

91. Wright SD, Tobias P, Ulevitch R et al. LPS binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. J Exp Med 1989; 170:1231-41.
92. Fijen JW, Jones CR, Kobold AC et al. Leukocyte activation and cytokine production during experimental human endotoxemi. Eur J Intern Med 2000; 11:89-95.
93. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling regulation of the immune response in normal and critically ill states. Crit Care Med 2000; 28:3-12.
94. Thijs LG, Hack CE. Time course of cytokine levels in sepsis. Intensive Care Med 1995; 21:56-63.
95. Alkharfy KM, Kellum JA, Matzke GR. Unintended immunomodulation : part II. Effects of pharmacological agents on cytokine activity. Shock 2000; 13:346-60.
96. Cohen S, Cohen MC. Cytokine function: a study in biologic diversity. Am J Clin Pathol 1996; 105:589-98.
97. Casey LC. Immunologic response to infection and its role in septic shock. Crit Care Clin 2000; 16:193-213.
98. Balkwill F. Transgenic and knockout mice in cytokine research, Cytokine Molecular Biology 2000; s: 186.
99. Bruns P. Die heilwirkung des erysipels auf geschwulste. Beitr Klin Chir. 1868; 3: 443-6.
100. Coley WB. Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann Surg 1891; 14: 199-220.
101. Gratia A, Linz RCR. Seances Soc Biol Ses Fil 1931; 108; 421-8.
102. Shear MJ, Turner FC. Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhage producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. J Natl Cancer Ins. 1943; 4: 81-97.
103. Algire GH, Legallales FY, Anderson BF. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. V. The role of hypotension in the action of a bacterial polysaccharide on tumors. J Natl Cancer Ins. 1952; 12: 1279-95.

104. O'Malley WE, Achinstein B, Shear BJ. Action of bacterial polysaccharide on tumors II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide and induced tolerance. J Natl Cancer Ins. 1962; 29: 1169-75.
105. Carswell EA, et al. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Soc. 1975; 72: 3666-70.
106. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor $\kappa\beta$: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. Int Care Med 1998; 24:1131-1135.
107. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa\beta$, a ubiquitous transcription factor in the initiation of disease. Clin Chem 1999; 45: 7-17.
108. Abraham E. NF- $\kappa\beta$ activation. Crit Care Med 2000; 28(4): N100-N104.
109. Li N, Karn M. Is NF- $\kappa\beta$ the sensor of oxidative stress? FASEB J 1999; 13:1137-43.
110. Rahman A, Kefer J, Bando M, Niles WD, Malik AB. E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF- $\kappa\beta$ activation. Am J Physiol 1998; 275: L533-44.
111. Li C, Browder W, Kao LR. Early activation of transcription factor NF- $\kappa\beta$ during ischemia in perfused rat heart. Am J Physiol 1999; 276: H543-H552.
112. Sen, R., Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer binding protein NF- $\kappa\beta$ by a posttranslational mechanism. Cell 1986; 47, 921-928.
113. Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M. New insights into the role of NF- $\kappa\beta$, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. Clinical Chemistry, 1999 45, 7-17.
114. Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. NF- $\kappa\beta$ and Rel proteins: Evolutionary conserved mediators of immune responses. Annual Review of Immunology 1998; 16, 225-260.
115. Heron, E., Deloukas, P.P., Van Loon, A.P. The complete exon-intron structure of the 156-kb human gene NFKB1, which encodes the p105 and

- p50 proteins of transcription factors NF- κ B and I κ B-g: implications for NF- κ B mediated signal transduction. *Genomics* 1995; 30, 493-505.
116. Baldwin, A.S.Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 1996; 14, 649-683.
 117. Yamazaki, S., Muta, T., Takeshige, K. A novel I κ B protein, I κ B- ζ , induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates NF- κ B in the nuclei. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001; 276, 27657-62.
 118. Wu, J.T., Kral, J.G. The NF- κ B/I κ B signaling system: A molecular target in breast cancer therapy. *The Journal of Surgical Research*, 2005; 123, 158-169.
 119. Baldwin, A.S.Jr. Series introduction: The transcription factor NF- κ B and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001; 107, 3-6.
 120. Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/ NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 1999; 18, 6853-6866.
 121. Prajapati S, Gaynor RB. Regulation of IKK /NEMO function by IKK β -mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 2002; 277:24331-24339.
 122. Schmitz ML, Bacher S, Dienz O. NF- κ B activation pathways induced by T cell costimulation. *Faseb J*. 2003; 17:2187–2193.
 123. <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/reac/en/im/ANFkBcyclec.jpg>.
 124. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell* 1997; 90: 373-383.
 125. Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF- κ B-inducing kinase activates IKK α by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3792-3797.
 126. Lee FS, Peters RT, Dang LC, Maniatis T, MEKK1 activates both I κ B kinase α and I κ B kinase β . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9319-9324.
 127. Shimida T, Kawai T, Takeda K. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I κ B kinases. *Int Immunol* 1999; 11:1357-1362.

128. Nomura F, Kawai T, Nakanishi K, Akira S. NF- κ B activation through IKK-i dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes Cells* 2000; 5:191-202.
129. David A. Geller, MD University of Pittsburgh Starzl Transplant Institute, NF- κ B in transplantation: friend or foe?, *Transplant Infectious Disease* 2001; 3: 212–219.
130. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed. Oxford, UK: Oxford University Press 1989; 543pp.
131. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41/12:1819-1828.
132. Altınışık M. Serbest radikaller (belge) 2000-2001 Yılı anabilimdalı seminerleri. Available from: URL: www.mustafaaltinisik.org.uk/sunumlarim.htm
133. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper Biyokimya. Dikmen N, Ozgunen T (Cev). Asım, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2004.
134. Free oxygen and Thiyl radicals (online).2006 (cited 03.09.2008). Available from:URL: <http://www.cyberlipid.org/perox/oxid0003.htm>.
135. Christophersen AG, Jun H, Jorgensen K, Skibsted LH. Photobleaching of astaxanthin and canthaxanthin: quantum-yields dependence of solvent, temperature, and wavelength of irradiation in relation to packaging and storage of carotenoid pigmented salmonoids. *Z. Lebensm. Unters Forsch* 1991; 192:433-439.
136. Moshage H. Nitric oxide determinations: Much ado about NO[•]-Thing? *Clin Chem* 1997; 43:4:553-556.
137. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298:249-58.
138. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109- 42.
139. Candieias LP, Stradford MRL, Wardman P. Free hydroxyl radicals are formed as reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron (II) komplex. *Free Radic Res Commun* 1994; 20:241-9.

140. Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania; 2006.
141. Alan H.B . Clinical Guide to Laboratory Tests. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania; 2006.
142. Akkus İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya; 1995.
143. Gutteridge JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. FEBS Lett 1986; 20:291-295.
144. Vardanian AJ, Busuttil RW, Kepiec-Weglinski J. Molecular mediators of liver Ischemia and Reperfusion Injury: A Brief Review. Mol Med 2008; 14(5-6):337-345.
145. Zhang B, Borderie D, Sogni P, Soubrane O, Houssin D, Calmus Y. NO-mediated vasodilation in the rat liver. Role of hepatocytes and liver endothelial cells. J Hepatol 1997; 26:1348-1355.
146. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. Hepatology 2002; 35: 478-491.
147. Ming Z, Han C, Lauth WW. Nitric oxide mediates hepatic arterial vascular escape from norepinephrine-induced constriction. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1999; 277: 1200-1206.
148. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. Liver 2000; 20: 3-7.
149. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: The role of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. Free Radic Biol Med 1998; 25:392-403.
150. Thiemeermann C, Ruetten H, Wu CC, Vane JR. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. Br J Pharmacol 1995; 116:2845-2851.

151. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 181-200.
152. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* 2nd ed. Oxford, Clarendon Press, 1996; 10-19, 86-130, 187-288.
153. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2 *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol* 1998; 38: 97–120.
154. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem* 2000; 69: 145–182.
155. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin Endoperoxide H. Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 33157-33160.
156. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal* 1998; 12(12): 1063-73.
157. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. *Annu. Rev. Med* 2002; 53: 35–57.
158. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry, Regulatory Strategies: Enzymes and Hemoglobin*. Fifth Edition. New York: W.H. Freeman and Company 2002; 261-295.
159. Champe PC, Harvey RA. *Bioc, Globular and Fibrous Proteins*. Second Edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company 1994 ; 25-47.
160. Simmons DL, Botting RM, Hla T, Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition, *Pharmacol. Rev* 2004; 56: 387–437.
161. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *The FASEB Journal* 2004 May; 18: 791-804.
162. Kosaka T, Miyata A, Ihara H, et al. Characterization of the human gene (PTGS2) prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Eur. J. Biochem* 1994; 221: 889–97.
163. Chandrasekharan NV and Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome biology* 2004; 5: 1-7.

164. Heitmeier MR, Kelly CB, Ensor NJ, Gibson KA. Role of Cyclooxygenase-2 on and Damage by Isolated Rat and Human Islets. JBC Papers in Press 2004; 279(51): 53145-53151.
165. Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. J Biol Chem 2000; 275: 28028-32.
166. Robertson RP. Dominance of cyclooxygenase-2 in the regulation of pancreatic islet prostaglandin synthesis. Diabetes 1998 Sep; 47(9): 1379-83. Review.
167. Tabatabaie T, Waldon AM, Jacob JM. COX-2 Inhibition Prevents Insulin-Dependent Diabetes in Low-Dose Streptozotocin-Treated Mice. Biochemical and Biophysical Research Communications 2000; 273: 699–704.
168. Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenases, the Kidney, and Hypertension. Hypertension 2004; 43: 525-530.
169. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. J Clin Invest. 1994; 94: 2504–2510.
170. Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. Hypertension 1999; 34: 96-101.
171. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Anderson S. Cyclo-Oxygenase-2 Inhibition Attenuates The Progression Of Nephropathy In Uninephrectomized Diabetic Rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2007; 34: 36-41.
172. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci 2002; 99: 13926–13931.
173. Banerji, S. S, Berg, L., and Morimoto, R. I., Transcriptional and post transcriptional regulation of avian HSP70 gene expression. J. Biol. Chem 1986; 261 (33):15740-15745.

174. Rivera, R., E., Christensen V.L., Edens, F.W., and Wineland, M.J., Influence of selenium on heat shock protein 70 expression in heat stressed turkey embryos (*Meleagris gallopavo*). *Comp. Biochem. Physiol. — Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2005; 142 :(4), 427–432.
175. Sonna, L. A., Fujita, J., Gaffin, S. L., and Lilly, C.M., Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.*, 2002; 92: 1725-1742.
176. Saydam, N., Steiner F., Georgiev, O., and Schaffner, W., Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor mtf-1. *J. Biol. Chem* 2003; 278 (34): 31879-31883.
177. Zulkifli, I., Che Norma, M. T, Israf, D. A., and Omar, A. R., The effect of early-age food restriction on heat shock protein 70 in heat stress broilers. *Bri. Poult. Sci.* 2002; 43: 141-145.
178. Hahn, G. M., Shiu, E. C., and Auger, E. A., Mammalian stress proteins Hsp70 and Hsp28 coinduced by nicotine and either ethanol or heat. *Mol. Cell. Biol* 1991; 11 (12): 6034-6040.
179. Feder, M. E., and Hofmann, G. E., Evolutionary and ecological physiology of heat-shock proteins and the heat-shock response: A comprehensive bibliography. Supplement to *Ann. Rev. Physiol* 1999; 61: <http://www.annurev.org/sup/material.htm>.
180. Hightower, L.E., A brief perspective on heat-shock response and stress. *Mar. Environ. Res* 1993; 35: 79-83.
181. Cruse I, Maines MD. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *The Journal of Biological Chemistry* 1989; 263, 3348-3353.
182. Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Thoku J. Exp. Med.* 2003; 200,167-186.

183. Yoshida, T., Kikuchi, G., Reaction of the microsomal heme oxygenase with cobaltic protoporphyrin IX, and extremely poor substrate. *J.Biol.Chem.* 1978; 253, 8479-8482.
184. Yoshida, T., Kikuchi, G., Purification and properties of heme oxygenase from rat liver microsomes. *J.Biol.Chem.* 1979; 254, 4487-4491.
185. Yoshida, T., Noguchi, M., Kikuchi, G., Oxygenated form of heme. heme oxygenase complex and requirement for second electron to initiate heme degradation from the oxygenated complex. *J.Biol.Chem* 1980; 255, 4418-4420.
186. Kikuchi, G., Yoshida, T., Noguchi, M., Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem.Biophys.Res.Comm* 2005; 338, 558-567.
187. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Rad. Bio. And Med.* 2004; Vol.37, No.8, 1097-1104.
188. Maines, M.D., Trakshel, G.M., Differential regulation of heme oxygenase isozymes by Sn- and Zn-protoporphyrins: possible relevance to suppression of hyperbilirubinemia. *Biochim.Biophys.Acta* 1992; 1131, 166-174.
189. Maines, M.D., Trakshel, G.M., Kutty, R.K., Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J.Biol.Chem* 1986; 261, 411-419.
190. Trakshel, G.M., Kutty, R.K., Maines, M.D., Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J.Biol.Chem* 1986; 261, 11131-11137.
191. Keyse, S.M., Tyrrell, R.M., Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989; 86, 99-103.
192. Shibahara, S., Muller, R., Taguchi, H. et al., Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1985; 82, 7865-7869.

193. Rotenberg, M.O., Maines, M.D., Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2. *J.Biol.Chem.* 1990; 265, 7501-7506.
194. Ishikawa, K., Matera, K.M., Zhou, H. et al., Identification of histidine 45 as the axial heme iron ligand of heme oxygenase-2. *J.Biol.Chem.* 1998; 273, 4317-4322.
195. McCoubrey, W.K., Jr., Maines, M.D., The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene.* 1994; 139, 155-161.
196. Muller, R.M., Taguchi, H., Shibahara, S., Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene. *J.Biol.Chem.* 1987; 262, 6795-6802.
197. Raju, V.S., McCoubrey, W.K., Jr., Maines, M.D., Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim.Biophys.Acta.* 1997; 1351, 89-104.
198. Gomer, C.J., Luna, M., Ferrario, A. et al., Increased transcription and translation of heme oxygenase in Chinese hamster fibroblasts following photodynamic stress or Photofrin II incubation. *Photochem.Photobiol.* 1991; 53, 275-279.
199. Keyse, S.M., Tyrrell, R.M., Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 1987; 262, 14821-14825.
200. Kajimura M, Goda N, Suematsu M. Organ design for generation and reception of CO: lessons from the liver. *Antiox. Redox Signal* 2002; 4, 633-637.
201. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003; 24, 449-455.
202. Slebos DJ, Ryter SW, Choi AMK. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. *Respiratory Research* 2003; 4:7.

203. Lamb NJ, Quinlan GJ, Mumby S, Evans TW, Gutteridge JMC. Heme oxygenase shows pro-oxidant activity in microsomal and cellular systems: implications for the release of low molecular mass iron. *Biochem. J.* 1999; 344, pp. 153–158.
204. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 79-127.
205. Dennery PA, Spitz DR, Yang G, Tatarov A, Lee CS, Shegog ML, Poss KD. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 1998; 101 pp. 1001–1011.
206. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28, pp. 289–309.
207. Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 279, pp. L1029–L1037.
208. Stocker R, Yamamoto, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235, 1043-1046.
209. Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2445–2450.
210. Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Bach FH. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2004; 40, 1333–1341.
211. Yamashita K, McDaid J, Öllinger R, Tsui TY, Berberat PO, Usheva A, Csizmadia E, Smith RN, Soares MP, Bach FH. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J.* 2004; 18, 765–767.

212. Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M, Öllinger R, Choi AM, Otterbein LE. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 289, L1131–L1137.
213. Liu Y, Zhu B, Wang X, Luo L, Li P, Paty DW, Cynader MS. Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 2003; 139, 27–35.
214. Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M, Ollinger R, Choi AM, Otterbein LE. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289:L1131–L1137.
215. Miller RD. *Miller's Anesthesia*, Sixth Edition, Elsevier Inc. 2005; 317-326.
216. Kayhan Z, *Klinik Anestezi*, 2. Baskı, Logos Yayıncılık Tic.A. Ş. 1997; 83-108.
217. Elar Z, *Klinik Anestezi El Kitabı*, Logos Yayıncılık Tic.A. Ş. 1999; 103-114.
218. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ, *Clinical Anesthesiology*, third edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies, 2002; 151-177.
219. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ. *Clinical Anaesthesiology*, 3rd Ed, USA. McGraw Hill 2001; 151-77.
220. Miller RD. *Miller's Anesthesia*, Sixth Edition, Elsevier Inc. 2005; 345-350.
221. Cromhout A, Ketamine: its use in emergency department. *Emergency Medicine* 2003; 15:155-159.
222. Geisslinger G, Hering W, ThomannP, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketamine enantiomers in surgical patients using a stereoselective analytical method. *Br J Anaesth* 1993; 70:666-671.
223. Kayaalp SO, *Tıbbi Farmakoloji*, 11. baskı, Feryal Matbaacılık, 2005; 672-677.

224. Priestley SJ, Taylor J, McAdam CM, Francis P, Ketamine sedation for children in the emergency department. *Emerg Med.* 2001; 13:82-90.
225. Guignard B, Coste C, Costes H, Supplementing desflurane-remifentanyl anesthesia with small dose ketamine reduces perioperative opioid analgesic requirements. *Anest. Analg.* 2002; 95:103-108.
226. Dich-Nielsen JO, Svendsen LB, Berthelsen P, Intramuscular low-dose ketamine versus pethidine for postoperative pain treatment after thoracic surgery. *Acta Anaesthesiol scand.* 1992; 36:583-587.
227. Shafer A, Doze VA, Shafer SL, White PF, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol infusions during general anesthesia. *Anesthesiology* 1988; 69:348-356.
228. Van Aken H, Meinshausen E, Prien T, The influence of fentanyl and tracheal intubation on the hemodynamic effects of anesthesia induction with propofol/N₂O in humans. *Anesthesiology* 1988; 68:157-163.
229. Taylor MB, Grounds RM, Mulrooney PD, Morgan M, Ventilatory effects of propofol during induction of anesthesia. Comparison with thiopentone. *Anesthesiology* 1986; 41:816-820.
230. Ravussin P, Guinard JP, Ralley P, Thorin D, Effect of propofol on cerebrospinal fluid pressure and cerebral perfusion pressure in patients undergoing craniotomy. *Anaesthesia* 1988; 43:37-41.
231. Balasubramaniam B, Park GR, Sexual hallucinations during and after sedation and anaesthesia. *Anaesthesia* 2003; 58:549-553.
232. Schafer R, Klett J, Auffarth G, Polarz H, Völcker HE, Martin E, Böttiger BW, Intraocular pressure more reduced during anesthesia with propofol than with sevoflurane: both combined with remifentanyl. *Acta Anaesthesiologica Scand.* 2002; 46:703-706.
233. Neel S, Deitch R, Moorthy SS, Dierdorf S, Yee R, Changes in intraocular pressure during low dose intravenous with propofol before cataract surgery. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79:1093-1097.
234. Van Hemelrijck J, Weekers F, Van Aken H, Propofol anesthesia does not inhibit stimulation of cortisol synthesis. *Anesth. Analg.* 1995; 80:573-576.

235. Soppitt AJ, Glass PSA, Howell S, Weatherwax K, Gan TJ, The use of propofol for its antiemetic effect: A survey of clinical practice in the United States. *J Clin Anesth.* 2000; 12:265-269.
236. Lundstrom S, Zachrisson U, Furst CJ, When nothing helps: propofol as sedative and antiemetic in palliative cancer care. *J Pain Symptom Manage* 2005; 30:570-577.
237. Lin, N.T., Yang, F.L., Lee, R.P., Peng, T.C., Chen, H.I., “Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats”, *Life Sci* 2006; 78 (10): 1038-1043.
238. Sanikidze, T.V., Tkhilava, N.G., Papava, M.B., Datunashvili, I.V., Gongadze, M.T., Gamrekelashvili, D.D., Bakhutashvili, V.I., Role of free nitrogen and oxygen radicals in the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced endotoxemia, *Bull. Exp. Biol. Med* 2006; 141 (2): 211-215.
239. Miller DL, Welty-Wolf K, Carraway MS, Ezban M, Ghio A, Suliman H, Piantadosi CA,. Extrinsic coagulation blockade attenuates lung injury and proinflammatory cytokine release after intratracheal lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002; 26, 650-658.
240. Jiang L, He L, Qu J,. Lipopolysaccharide (LPS) induced pulmonary inflammatory response and effects of TNF in immunocompromised host (ICH) (Abstrakt). *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 1996; 19, 143-146.
241. Klein RD, Su GL, Aminlari A, Alarcon WH, Wang SC,. Pulmonary LPS-binding protein (LBP) upregulation following LPS-mediated injury. *J Surg Res*, 1998; 78, 42-47.
242. Billiau A, Vandekerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest.* 1991; 21:559–73.
243. Y. Saito Shibakawa, Y. Sasaki, Y. Goshima, N. Echigo, Y. Kamiya¹, K. Kurahashi, Y. Yamada¹ and T. Andoh. Effects of ketamine and propofol on inflammatory responses of primary glial cell cultures stimulated with lipopolysaccharide. *British Journal of Anaesthesia* 2005; 95 (6): 803–10.

244. Hoff G, Bauer I, Larsen B, Bauer M. Modulation of endotoxin-stimulated TNF-alpha gene expression by ketamine and propofol in cultured human whole blood. *Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.* 2001 Jul; 50(7):494-9.
245. Taniguchi, T., Kanakura, H., Takemoto, Y., Kidani, Y. And Yamamoto, Y. Effects of Ketamine and Propofol on the Ratio of Interleukin-6 to Interleukin-10 during Endotoxemia in Rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2003; 200 (2), 85-92.
246. Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M. New insights into the role of nuclear factor factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical Chemistry*, 1999; 45, 7-17,.
247. Baldwin, A.S.Jr. Series introduction: The transcription factor NF- κ B and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001; 107, 3-6,.
248. Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NFkappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001; 107(2), 135-142,.
249. Kleinpell RM, Graves BT, Ackerman MH,. Incidence, pathogenesis, and management of sepsis: An overview. *AACN Adv Crit Care*, 2006; 17, 385-393.
250. Bradham CA, Strachlewitz RF, Gao W. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogenactivated protein kinases. *Hepatology* 1997; 25:1128–1135.
251. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:1128–1135.
252. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 1997; 61:375–380.
253. Haslett C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br Med Bull* 1997; 53:669–683.
254. Brandham CA, Stachlewitz RF, Gao W. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogenactivated protein kinases. *Hepatology* 1997; 25:1128–1135.

255. Min Yu, Danbing Shao, Jianjun Yang, Shangwu Feng, Jianguo Xu. Ketamine Suppresses Intestinal TLR4 Expression and NF- κ B Activity in Lipopolysaccharide-treated Rats. *Croat Med J.* 2006;47:825-31.
256. Huai-Chia Chang, Ke-Hsun Lin, Yu-Ting Tai, Juei-Tai Chen, and Ruei-Ming Chen. Lipoteichoic Acid-induced TNF- α and IL-6 Gene Expressions and Oxidative Stress Production in Macrophages are Suppressed by Ketamine Through Downregulation of Toll-Like Receptor 2-Mediated Activation of ERK1/2 AND NF- κ B. *Shock*, 2010; Vol. 33, No. 5, pp. 485-492.
257. Hsing C-H, Lin M-C, Choi P-C, Huang W-C, Kai J-I, et al. Anesthetic Propofol Reduces Endotoxic Inflammation by Inhibiting Reactive Oxygen Species-regulated Akt/I κ B/NF- κ B Signaling. *PLoS ONE* 2011; 6(3): e17598. doi:10.1371/journal.pone.0017598.
258. Wen-Ta Chiu, Yi-Ling Lin, Chih-Wei Chou, Ruei-Ming Chen. Propofol inhibits lipoteichoic acid-induced *iNOS* gene expression in macrophages possibly through downregulation of toll-like receptor 2-mediated activation of Raf-MEK1/2-ERK1/2-I κ B-NF- κ B. *Chemico-Biological Interactions* 2009; 181. 430–439.
259. Gong-JheWu, Ta-Liang Chen, Chia-Chen Chang, Ruei-Ming Chen. Propofol suppresses tumor necrosis factor- α biosynthesis in lipopolysaccharide-stimulated macrophages possibly through downregulation of nuclear factor-kappa B-mediated *toll-like receptor 4* gene expression. *Chemico-Biological Interactions* 2009; 465–471.
260. Darendelioğlu S., Ketamin, Propofol ve Etomidat'ın Çizgili Kas İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı, 2008.
261. Fatma Saricaoglu, Didem Dal, Akgün Ebru Salman, Mahmut Nedim Doral, Kamer Kılınç, and Ülkü Aypar. Ketamine Sedation During Spinal Anesthesia for Arthroscopic Knee Surgery Reduced the Ischemia-Reperfusion Injury Markers. *Anesth Analg* 2005;101:904 –9.

262. Kahraman S, Kılınç K, Dal D, ve ark: Propofol attenuates formation of lipid peroxidases in tourniquet induced ischemia-reperfusion injury. *Br J Anesth*- 1997; 78; 279-281.
263. Aldemir O, Çelebi H, Çevik C, ve ark: The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischeia-reperfusion injury during knee arthroplasty. *Acta Anesthesiol Scan*- 2001; 45: 1221-1225.
264. Turan R, Yağmurdur H, Kavutçu M: Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *Eur J Anaesthesiol*- 2007; 24: 185-189.
265. H. Yagmurder, G. Akca, M. Aksoy, M. Arslan, B. Baltaci and B. Dikmen. The effects of ketamine and propofol on bacterial translocation in rats after burn injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 177—182.
266. Runzer TD, Ansley DM, Godin DV, ve ark: Tissue Antioksidant Capasity During Anesthesia: Propofol Enhances In Vivo Red Cell and Tissue Antioxidant Capasity in a rat Model. *Anesth Analg*- 2002; 94: 89-93.
267. Mouithys-Mickalad A, Hans P, Deby-Dupont G, ve ark: Propofol reacts with peroxynitrite to form a phenoxyl radical: demonstration by electron spin resonans. *Biochem Biophys Res Commun* -1998; 249: 833-837.
268. De La Cruz JP, Seden G, Carmona A, ve ark: The in vitro effects of propofol on tissular oxidative stress in the rat. *Anesth Analg* -1998; 87: 1141-1146.
269. Yağmurdur H, Ayyıldız A, Karaguzel E: The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia- reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scan*- 2006; 50: 1238-1243.
270. Kaplan N, Yağmurdur N, Kılınç K: The protective Effects of Intravenous Anesthetics and Verapamil in Gut Ischemia/Reperfusion-Induced Liver Injury. *Anesth Analg*-2007; 105:1371-1378 .
271. Liu K-X, Rinne T, He W, ve ark: Propofol attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Can J Anesth* - 2007; 54(5):366-374.

272. Chen R-M, Wu G-J, Tai Y-T, ve ark: Propofol reduces nitric oxide biosynthesis in lipopolysaccharide- activated marophages by downregulating the expression of inducible nitric oxide synthase. Arch Toxicol- 2003; 77: 418-423.
273. Yu H-P, Lui P-W, Hwang T-L, ve ark: Propofol improves endothelial dysfunction and attenuates vascular superoxide production in septic rats. Crit Care Med- 2006; 34: 453-460.
274. Wang H-H, Zhou H-Y, Chen C-C, ve ark: Propofol attenuation of renal ischemia-reperfusion injury involves heme oxygenase-1. Acta Pharmacol Sin- 2007; 28: (8):1175-1180.
275. Acquaviva R, Campisi A, Murabito P, ve ark: Propofol Attenuates Peroxynitrite- mediated DNA Damage and Apoptosis in Cultured Astrocytes. Anesthesiology- 2004; 101: 1363-1371.
276. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev-1991; 43: (2): 109-142.
277. Hemler KS, Suliburk JW, MercerDW: Ketamine Induced gastroprotection During Endotoxemia:Role of Heme-Oxygenase-1. Dig Dis Sci- 2006; 51:1571-1581.
278. Barker JE, Knight KR, Romeo R, ve ark: Targeted disruption of the nitric oxide synthase 2 gene protects against ischaemia/reperfusion injury to skeletal muscle. J Pathol- 2001; 194:109-115.
279. Zhang l, Looney CG, Qi W-N, ve ark: Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. J Appl Physiol -2003; 94: 1473-1478.
280. Ergün Y: Çizgili kas iskemi-reperfüzyon hasarı ve nitrik oksit ile ilişkisi. Arşiv- 2006; 15; 133-157.
281. Molina, P.E., Qian, L., Schuhlein, D., Naukam, R., Wang, H., Tracey, K.J., Abumrad, N.N., CNI-1493 attenuates hemodynamic and pro-inflammatory responses to LPS. Shock, 1998; 10 (5): 329-334.

282. Suliburk JW, Ward JL, Helmer KS, Adams SD, Zuckerbraun BS, Mercer DW. Ketamine-induced hepatoprotection: the role of heme oxygenase- 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1360–G1369.
283. York A. Zausig, Hendrik Busse, Dirk Lunz, Barbara Sinner, Wolfgang Zink and Bernhard M. Graf, Cardiac effects of induction agents in the septic rat heart, *Critical Care* 2009; 13:R144 (doi:10.1186/cc8038).
284. Quan N., Whiteside M., Herkenham M., Cyclooxygenase 2 mRNA expression in rat brain after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res* 1998; 802: 189-197.
285. Matsumoto H., Naraba H., Murakami M., Kudo I., Yamaki K., Ueno A., Ohishi S., Concordant induction of prostaglandin E₂ synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E₂ over thromboxane and prostaglandin D₂ in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997; 230(1): 110-114.
286. Narumiya S., Ogorochi T., Nakao K., Hayaishi O., Prostaglandin D₂ in rat brain, spinal cord and pituitary: basal level and regional distribution. *Life Sci* 1982; 31: 2093-2103.
287. Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, Takeuchi K. Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1: a key to NSAID-Induced intestinal damage. *J pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 754-761.
288. Kenneth S. Helmer, Yan Cui, Lily Chang, Ashvin Dewan, and David W. Mercer. Effects of Ketamine/Xylazine on Expression of tumor Necrosis Factor- α , Inducible Nitric Oxide Synthase, and Cyclo-oxygenase-2 in Rat Gastric Mucosa During Endotoxemia. *SHOCK*, 2003; Vol. 20, No. 1, pp. 63–69,.
289. James W. Suliburk, Kenneth S. Helmer, Ernest A. Gonzalez, Emily K. Robinson and David W. Mercer. Ketamine attenuates liver injury attributed to endotoxemia: Role of cyclooxygenase-2. *Surgery* 2005;138:134-40.
290. Mato JM, Corrales FJ, Avila MA. Heat shock: a barrier to hepatic ischemic injury. *J Hepatol* 2001;35:663-665.

291. Amersi F, Buelow R, Kato H, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/ reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999; 104:1631-1639.
292. Kato Y, Shimazu M, Kondo M, et al. Bilirubin rinse: a simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology* 2003; 38:364-373.
293. Tacchini L, Recalcati S, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Induction of ferritin synthesis in ischemic-reperfused rat liver: analysis of the molecular mechanism. *Gastroenterology* 1997; 113:946-953.
294. Yamaguchi T, Terakado M, Horio F, Aoki K, Tanaka M, Nakajima H. Role of bilirubin as an antioxidant in an ischemia-reperfusion of rat liver and induction of heme oxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223:129-135.
295. Wanner GA, Ertel W, Muller P, et al. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996; 5:34-40.
296. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 30:1481-1489.
297. Arai M, Thurman RG, Lemaster JJ. Ischemic preconditioning of rat liver against cold storage-reperfusion injury: role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transplant* 2001; 7:292-299.
298. Horikawa S, Yoneya R, Nagashima Y, Hagiwara K, Ozasa H. Prior induction of heme oxygenase-1 with glutathione depletor ameliorates the renal ischemia and reperfusion injury in the rat. *FEBS Letters* 2002; 510:221-224.
299. Terajima H, Enders G, Thiaener A, et al. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology* 2000; 31:407-415.

300. Maines M. D., Carbon Monoxide and Nitric Oxide Homology: Differential Modulation of Heme Oxygenases in Brain and Detection of Protein and Activity. *Methods in Enzymology* 1996; 268, 473-488.
301. Suematsu M., Wakabayashi Y., Ishimura Y., Gaseous Monoxide: A New Class of Microvascular Regulator in The Liver. *Cardiovascular Res* 1996; 32, 679-686.
302. Maulik N., Engelman D.T., Watanabe M., Engelman R.M., Rousou J.A., Flack J.E., Deaton D.W., Gorbunov N.V., Elsayed N.M., Kagan V.E., Das D.K. : Nitric Oxide/Carbon Monoxide. A Molecular Switch for Myocardial Preservation During Ischemia. *Circulation* 1996; 94(II), II398-II406.
303. Sharma H.S., Maulik N., Gho B.C., Das D.K., Werdouw P.D.: Coordinated Expression of Heme Oxygenase-1 and Ubiquitin in The Porcine Heart Subjected to Ischemia and Reperfusion. *Mol. Cell. Biochem* 1996; 157, 111-116.
304. Tosaki A., Das D.K.: The Role of Heme Oxygenase Signaling in Various Disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002; 232, 149-157.
305. Vos A.T., GoorV.H., Tuyt L., Krikken J.A., Leuvenink R., Kuipers F., Jansen M.L.P., Moshage H.: Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Endotoxemic Rat Hepatocytes is Dependent on the Cellular Glutathione Status. *Hepatology* 1999; 29, 421-427.
306. Rahman I., Macnee W.: Regulation of Redox Glutathione Levels and Gene Transcription Lung Inflammation: Therapeutic Approaches. *Free Rad. Biol. Med* 2000; 28, 1405-1420.
307. Duval D.L., Sieg D.J., Billings R.E.: Regulation of Hepatic Nitric Oxide Synthase by Reactive oxygen Intermediates and Glutathione. *Arch. Biochem. Biophys* 1995; 316, 699-706.
308. Wang T., Zhang X., Li J.J.: The Role of NF- κ B in The Regulation of Cell Stress Responses. *International Immunopharmacology* 2002; 2, 1509-1520.
309. James W. Suliburk, Ernest A. Gonzalez, Sasha D. Kennison, Kenneth S. Helmer, and David W. Mercer, Differential Effects of Anesthetics on Endotoxin-Induced Liver Injury, *J Trauma*. 2005; 58:711–717.

310. Kenneth S. Helmer, James W. Suliburk, David W. Mercer. Ketamine-Induced Gastroprotection During Endotoxemia: Role of Heme-Oxygenase-1. *Dig. Dis. Sci* 2006; 51:1571–1581.
311. Hui-hua WANG, Hai-yan ZHOU, Cong-cong CHEN, Xiu-lai ZHANG, Gang CHENG. Propofol attenuation of renal ischemia/reperfusion injury involves heme oxygenase-1. *Acta Pharmacol Sin* 2007 Aug; 28 (8): 1175–1180.
312. Yusuf Ergün, Hafize Öksüz, Yalcin Atli, Metin Kılınç and Sacide Darendeli. Ischemia Reperfusion Injury in Skeletal Muscle: Comparison of the Effects of Subanesthetic Doses of Ketamine, Propofol, and Etomidate. *Journal of Surgical Research* 2010; 159, e1–e10.
313. Morse D., Choi A.M.K.: Heme Oxygenase-1: The “Emerging Molecule” Has Arrived. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology* 2012; 27, 8-16.
314. Yuqing Wu, Wei Li, Ce Zhou, Fuzhao Lu, Tianhui Gao, Yingchun Liu, Junli Cao, Yongmei Zhang, Yong Zhang, Chenghua Zhou. Ketamine Inhibits Lipopolysaccharide Induced Astrocytes Activation by Suppressing TLR4/NF- κ B Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2012;30:609-617.
315. Liu YC, Chang AY, Tsai YC, Chan JY. Differential protection against oxidative stress and nitric oxide overproduction in cardiovascular and pulmonary systems by propofol during endotoxemia. *J Biomed Sci.* 2009 Jan 15;16:8.

10.EKLER

Teşekkür

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni destekleyen, yeni ve özgür fikirlere açık olarak yetişmemi sağlayan ve ayrıca tez çalışmamın gerçekleşmesine önemli katkıları bulunan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU'na, bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU'na, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çimen KARASU'ya, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde görev yapan Uz. Dr. Derya GÖKÇINAR'a ve tüm Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Ayrıca çalışma sırasındaki engin bilgisi ve tecrübeleri ile hem çok yardımı dokunan hem de çok kolaylık sağlayan ve bir kardeş gibi davranan sevgili Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU'na sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Emekleri ile karşılığını ödeyemeyeceğim, bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren, tüm dert ve sıkıntılarında yanımda olan, sevgili annem Fatma YILDIZ'a, babam Mahmut YILDIZ'a, ablalarım Hülya YALÇIN, Filiz YILDIZ, Melek BEBER'e, biricik kardeşim Yunus YILDIZ'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı : Abdulkerim
Soyadı : YILDIZ
Doğum Yeri ve Tarihi : Batman / 17.06.1985

2010 – 2012 : Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Eğitimi.
2004 – 2010 : Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Lisans Eğitimi.
1999 – 2002 : Fatih Lisesi.
1991 – 1999 : Fatih İlk Öğretim Okulu.

Yabancı Dili : İngilizce.