

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**SEPSİS TEDAVİSİNDE NUTRİSYONEL
DESTEK VEREREK YANLIŞ MI
YAPIYORUZ? ÇÖZÜM FİZYOLOJİK
AÇLIK MI?**

Dr. Gizem BAKIR ÜSTÜNDAĞ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**SEPSİS TEDAVİSİNDE NUTRİSYONEL
DESTEK VEREREK YANLIŞ MI
YAPIYORUZ? ÇÖZÜM FİZYOLOJİK
AÇLIK MI?**

Dr. Gizem BAKIR ÜSTÜNDAĞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HASAN ÖZKAN

TEŞEKKÜR

Sir Winston Churchill “Başarı, bir yenilgiden diğerine hevesini kaybetmeden koşabilmektir.” demiştir. 2008 yılında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde başlayıp Dokuz Eylül Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ailesinin yetiştirdiği bir uzman doktor olarak şimdilik benim için son bulan bu yolculuğun her noktasında hayatıma dokunan ve adını burada sayamayacağım hocalarım, meslektaşlarım ve arkadaşlarım oldu. Her yenilgimden diğerine hevesle koşmaya çalışırken bugünüme gelmemi sağlayan;

Güler yüzü, sabrı ve enerjisiyle asistanlarıyla bıkmadan ilgilenen Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Ana Bilim Dalı Başkanımız; Sayın Prof. Dr. Murat Duman’a;

Bilimsel duruşu, bakış açısı ile vizyonumu genişleten ve tez çalışmasının tasarlanmasında gerçekleştirilmesine kadar her noktada desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan Özkan’a;

Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndaki yorucu süreçte bilgisini, tecrübesini ve zamanını büyük bir nezaketle paylaşan Sayın Prof. Dr. Osman Yılmaz ve desteği için Öğretim Görevlisi Aslı Çelik’e;

Aramızdan vakitsiz ayrılan ve bizi yasa boğan, doğru bilginin peşinden gitmeyi öğreten ve özgürce uygulayabilmemize olanaklar yaratan; her gün kendini özleten sevgili hocam Prof. Dr. Tolga Fikri Köroğlu’na;

Yenidoğan Ana Bilim Dalı ailesinin bir ferdi gibi hissetmemi sağlayan, sonsuz destekleri ve sabırlarıyla Sayın Prof. Dr. Nuray Duman’a ve Doç. Dr. Funda Tüzün’e;

Sayamayacağım kadar çok yönden beni destekleyen ve yanımda olan sevgili abim Uzm. Dr. Burak Deliloğlu’na;

Bitmez dediğimiz nöbetlerin sabahını birlikte gördüğümüz, omuz omuza çalıştığımız tüm asistan arkadaşlarıma, içlerinde pek bir değerli olan sevgili eş kıdemim Dr. Yağmur Damla Akçura, Dr. Gökberk Ural Gökpınar, Dr. Coşkun Armağan, Dr. Ali Öksel, Dr. Lale Gökpınar, Dr. Alev Aldemir Sönmez, Dr. Mehmet Pektanç ve Dr. Abdullah Sağlık'a;

Her konuda hayatıma kattıklarıyla kimseyle değişemeyeceğim canım dostum Dr. Nazlı Kahraman'a;

Asistanlık sürecinde tanıştığımız ve birlikte hayat kurduğumuz, hayallerimi desteklemekten bir an bile vazgeçmeyen canım kocam Dr. Hüseyin Öncü Üstündağ'a;

Emeklerini bizden cefakarca esirgemeyen başta annelerimiz olmak üzere canım ailelerimize en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gizem Bakır Üstündağ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	4
ŞEKİL LİSTESİ.....	5
RESİM LİSTESİ.....	6
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	7
ÖZET.....	7
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.Sepsis.....	5
2.1.1. Epidemiyoloji.....	5
2.1. 2. Sepsis Tanımı.....	6
2.1.3. Organ yetmezliğinin tanımlanması.....	9
2.1.4. Risk faktörleri ve Etiyoloji.....	12
2.1.5. Patofizyoloji.....	15
2.1.5.1. Doğal bağışıklık ve inflamatuvar araçılar.....	15
2.1.5.2. Homeostazın bozulması.....	16
2.1.5.3. İmmunosupresyon.....	17
2.1.5.4. Hücre, organ ve doku düzeyinde görülen değişiklikler.....	18
2.1.5.5. Kompanse edici mekanizmalar.....	20
2.1.6. Klinik bulgular.....	21
2.1.7. Yönetim ve tedavi.....	21
2.1.8. Gelecekte öngörülen tedaviler.....	22
2.2. Hayvan sepsis modelleri.....	23
2.3.Otofaji.....	25
2.3.1. Otofagozom Oluşumunun Çekirdek Moleküler Mekanizmaları.....	28

2.3.1.1 Otofajinin tetiklenmesi ve otofagozom oluşumu	30
2.3.1.1.1. <i>Membranın kaynağı</i>	30
2.3.1.1.2. <i>mTOR kompleksi</i>	31
2.3.1.1.3. <i>mTORC1</i>	31
2.3.1.1.4. <i>Normal koşullar</i>	32
2.3.1.1.4. <i>Açlık koşulları</i>	32
2.3.1.2. Vezikülün çekirdeklenmesi	33
2.3.1.3. Uzama	33
2.3.1.4. Taşınan maddenin seçimi	34
2.3.1.5. Otofagolizozomun oluşumu	34
2.3.2. Otofajinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal yolları	35
2.4. Otofaji sepsis ilişkisi	35
2.4.1. Sepsiste otofajinin aktivasyonu	35
2.4.2. Sepsiste otofajinin kinetiği	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Deney Hayvanları	41
3.2. Lipopolisakkarit ile endotoksemi modelinin oluşturulması	41
3.3. Beslenme izlemi ve kalori alımının değerlendirilmesi	42
3.4. Deney hayvanları grupları	42
3.5. Ön çalışmada sağlıklı dönem/endotoksemi dönemi beslenme miktarı ve LPS dozunun etkinliğinin belirlenmesi	43
3.8. Örneklem büyüklüğünün hesaplanması	44
3.9. Deney protokolü ve deney hayvanlarının izlemi	44
3.9.1. Sıçanların orogastrik sonda ile beslenmesi	46
3.9.2 Deney Hayvanlarında Yüzde (%) Vücut Ağırlık Oranının Tespiti	47
3.9.3 Deney hayvanlarında günlük yem ve su tüketiminin ölçülmesi	47

3.9.4. Sıçanlarının vücut ısılarının ölçülmesi	47
3.9.5 Sıçanların sepsis bulgularının skorlama sistemi ile değerlendirilmesi	48
3.9.6. Sıçanların izlemi ve doz değişimi ile protokolün yeniden oluşturulması.....	51
3.10. Otofaji aktivitesinin değerlendirilmesi	54
3.10.1. Kan Örneklerinin Taşınması, Ayırma ve Saklama İşlemleri.....	54
3.10.2. Kas dokusu ve homojenizasyonu.....	54
3.10.3. İmmüno blot yöntemiyle kaspaz-1, NLRP3 ve IL-1 β protein tayini.....	54
3.11. Araştırmada kullanılan istatistiksel yöntemler	55
3.12. Etik Kurul Onayı	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Sıçanlarda Vücut Ağırlığı ve Yüzde (%) Değişimine Ait Bulgular.....	56
4.2. Sıçanların Gruplar Arası Ortalama Yem Ve Su Tüketimine Ait Bulgular.....	61
4.3. Gruplar arası Sepsis Skorlamalarının Değerlendirilmesi	65
4.4. Gruplar arası Vücut Sıcaklığı Ölçümlerinin Değerlendirilmesi.....	71
4.5. Gruplar arası sağ kalım oranına ait bulgular	74
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇLAR	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: SIRS kriterleri	7
Tablo 2: Şok tipleri ve klinik özellikleri	9
Tablo 3: SOFA Skorlama Sistemi	10
Tablo 4: qSOFA Skorlaması	11
Tablo 5: Organ yetmezlik kriterleri.....	11
Tablo 6: Sepsis sağ kalım 1 saat algoritması.....	21
Tablo 7: Deney Protokolü	45
Tablo 8: Sepsis Skorlaması 1	50
Tablo 9: Sepsis skorlaması 2.....	50
Tablo 10: Sıçanların 0. saat verilerinin tanımlayıcı özellikleri	56
Tablo 11: Sıçanların vücut ağırlığı ölçmelerinin Friedman's 2 pair analiz sonuçları .	57
Tablo 12: Gruplara göre Sıçanların Vücut Ağırlığı Değişimi.....	58
Tablo 13: Sıçanların vücut ağırlığı yüzde değişimi Friedman's 2 pair analiz sonuçları	59
Tablo 14: Gruplara göre Sıçanların Vücut Ağırlığı Yüzde Değişimi	61
Tablo 15: Gruplara göre Sıçanların Ortalama Yem Tüketimleri	63
Tablo 16: Gruplara göre Sıçanların Ortalama Su Tüketimleri.....	64
Tablo 17: Gruplara göre sıçanların sepsis skoru 1 toplam değerleri.....	67
Tablo 18: Gruplara göre sıçanların sepsis skoru 2 toplam değerleri	71
Tablo 19: Sıçanların gruplara göre vücut ısısı özellikleri	72

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:Sepsis tanımlamasının yıllar içindeki değişimi	8
Şekil 2:Otofaji tipleri: makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji.....	26
Şekil 3:Otofaji biyogenetiğinin moleküler mekanizması	29
Şekil 4: A.Güncel otofagozom oluşumu şeması, B. Otofagozom oluşumu için önerilen yeni model	30
Şekil 5:Sepsiste otofaji aktivasyonu yolları.....	36
Şekil 6: Otofajinin aktivasyonunun zaman içindeki değişimi	39
Şekil 7: Gruplara göre Sıçanların Vücut Ağırlığı Değişimi	60
Şekil 8:Sıçanların gruplar arası ortalama yem tüketimi	62
Şekil 9:Sıçanların gruplar arası ortalama su tüketimi.....	64
Şekil 10: Sıçanların gruplara göre sepsis skorlaması 1 toplam değerleri	67
Şekil 11:Sıçanların gruplara göre sepsis skorlaması 2 toplam değerleri	70
Şekil 12: Gruplara göre sıçanların vücut ısılarının değişim grafiği.....	73
Şekil 13: Gruplara göre sıçanların sağ kalım grafiği. Error! Bookmark not defined.	

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Sıçanların orogastrik yoluyla mama ile beslenmesi.....	46
Resim 2: Sıçanların rektal ve infrared termometre yardımı ile vücut ısılarının ölçülmesi	48
Resim 3: Grup kafeslerinin randomize edilmesi	49



SİMGELER VE KISALTMALAR

SIRS: Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu

LPS: Lipopolisakkarit

SOFA: Sepsis İlişkili Organ Yetmezliği Değerlendirmesi

qSOFA: Hızlı Sepsis İlişkili Organ Yetmezliği Değerlendirmesi

ARDS: Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu

DİK: Dissemine İntravasküler Koagülopati

ABY: Akut Böbrek Yetmezliği

MV: Mekanik Ventilator

GKS: Glasgow Koma Skoru

GBS: Grup B streptokok

TNF α : Tümör Nekrozis faktör Alfa

IL-1 β : İnterlökin 1-beta

DNA: Deoksiribonükleik Asit

ATP: Adenozin Trifosfat

ROS: Reaktif Oksijen Ürünleri

NOD: Nükleotit Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı

MRSA: Metisilin Dirençli Staphylococcus Aureus

GBS: Grup B streptokok

PAMPs: Patojen İlişkili Moleküler Örnekler

DAMPs: Hasarla İlişkili Moleküler Örnekler

HMGB 1: Yüksek Hareketlilik Grubu Kutusu 1

PPRs: Örnek Tanıyıcı Reseptörler

TLRs: Toll Benzeri Reseptörler

NOD: Nükleotit Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı

RIG-1: Retinoik Asitle İndüklenebilir Gen 1

IL-1: İnterlökin-1

IL-6: İnterlökin-6

IL-1 β : İnterlökin 1 Beta

IL-18: İnterlökin 18

PAI-1: Plazminojen İnhibitör Tip 1

CD4: Farklılaşma Yığılım Molekülleri 4

CD8: Farklılaşma Yığılım Molekülleri 8

TNF α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

Tregs: Düzenleyici T Hücreleri

GM-CSF: Granülosit-makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

CLP: Çekum Ligasyon ve Ponksiyonu

CASP: Çıkan Kolona Yerleştirilen Stent Aracılığıyla Peritonit Oluşturulması

CMA: Şaperon aracılı Otofaji

ATG: Otofaji İlişkili Gen Proteinleri

Hsc70: Isı Şok Protein 70

LAMP-2A: Lizozom İlişkili Membran Proteini Tip 2

ER: Endoplazmik Retikulum

DAPk: Ölüm İlişkili Protein Kinazlar

MHC II: Majör Histokompatibilite Kompleksi 2

ERGIC: ER ile Mitokondrinin Temas Noktaları

TRAF6: TNF Reseptörü ile İlişkili Faktör 6

LAMP2A: Lysosome –associated membrane Protein Tipi 2A

mTOR: Memeli Rapamisin Hedef Molekülü

ULK1: Unc-51 benzeri Kinaz

ÖZET

Giriş ve Amaç: Sepsis; vücudun enfeksiyona verdiği aşırı cevap olarak tanımlanabilir ve hayatı tehdit eden bir durumdur. Otofaji hücre içi homeostazisinde önemli rol oynayan yolaklardan biridir, açlık ve sepsis tarafından aktive olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda hastalık döneminde beslenme desteği verilen sıçanlarda otofajik aktivitenin baskılandığını kanıtlamak ve sağ kalıma etkisini gözlemlemek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 90-150 gr 3-4 haftalık Wistar-Albino suşu erkek sıçanlar, rasgele, kontrol grubu (n:9), 3 mg/kg LPS+SF grubu (n:7), 3 mg/kg LPS+SF+izlem grubu (n:7), 3 mg/kg LPS+mama grubu (n:7), 3 mg/kg LPS+mama+izlem grubu (n:7), 1,5 mg/kg LPS+SF grubu (n:7), 1,5 mg/kg LPS+SF+izlem grubu (n:3), 1,5 mg/kg LPS+mama grubu (n:7), 1,5 mg/kg LPS+mama+izlem grubu (n:4) olarak dokuz gruba ayrıldı. Sepsis modeli, 3 mg/kg/doz ve 1.5 mg/kg/doz E.Coli O5:B5 serotipi LPS ile intraperitoneal enjeksiyon yapılarak oluşturuldu. Endotoksin uygulaması sonrası 48 saat boyunca yakın aralıklarla sepsis skorlaması, vücut ısı ölçümü, kilo takibi ve ortalama yem ve su tüketimleri izlenerek kaydedildi. 48. Saatin sonunda izlem grubu dışındaki sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilerek gastrokinemius kas dokusu ve kan örneği alınarak dokuda immunblot yöntemiyle beclin-1, LC3-I/LC3-II kaspaz-1, IL-1 β , NLRP3 proteinlerinin tayini yapılarak otofajik aktivitenin çalışılması planlandı. İzlem grupları 12 gün boyunca günlük değerlendirilerek mortalite açısından izlendi. 12. günün sonunda sıçanlar sakrifiye edildi.

Bulgular: LPS uygulanan sıçanlarda endotoksinin kilo kaybı, hipotermi ve yem, su tüketiminde azalma etkilerinin kontrol grubuna göre anlamlı farklı olduğu gözlenmiştir. Kontrol ve LPS uygulanan sıçan grupları iki farklı sepsis skorlaması ile değerlendirilmiş olup, LPS uygulanan gruplarda her iki skorlama puanlarının kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu görülmüştür. 1. Sepsis skorlamasında 24. Saatte 1,5 mg/kg/doz LPS uygulanan sıçan grupları arasında mama desteği alan sıçanların sepsis skorlamasının almayanlara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı. 2. Sepsis skorlaması değerlendirildiğinde ise 3 mg/kg/doz LPS uygulanan sıçan grupları arasında ise mama desteği alan grupta sepsis skorunun anlamlı olarak daha şiddetli

olduğu gözlendi. 1,5 mg/kg/doz LPS uygulanan sıçan grupların mama desteği alan grubun 48. Saate dek tüm sepsis skorlamaları mama desteği almayan gruba göre anlamlı olarak daha düşük saptandı. Kontrol ve LPS uygulanan gruplar arasında vücut sıcaklığı ölçümleri arasında anlamlı fark izlenmekle birlikte LPS uygulanan sıçan grupları arasında fark saptanmamıştır. Gruplar arasında sağ kalım açısından fark saptanmamıştır.

Sonuç: Klinik bulguların dokuda çalışılacak otofaji belirteçleri ile desteklenmesi önem taşımaktadır. Nutrisyon desteğinin sepsis şiddeti üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: sepsis, otofaji, açlık

ABSTRACT

Background and Aim: Sepsis; It can be defined as the body's excessive response to infection and is a life-threatening condition. Autophagy is one of the pathways that play an important role in intracellular homeostasis, it is known to be activated by hunger and sepsis. In our study, it was aimed to prove that autophagic activity is suppressed in rats given nutritional support during the disease period and to observe its effect on survival.

Materials and Methods: 90-150 gr 3-4 week old Wistar-Albino strain male rats, randomly, divided into nine groups: Control group (n: 9), 3 mg / kg LPS + SF group (n: 7), 3 mg / kg LPS + SF + follow-up group (n: 7), 3 mg / kg LPS + food group (n: 7), 3 mg / kg LPS + food + follow-up group (n: 7), 1.5 mg / kg LPS + SF group (n: 7), 1.5 mg / kg LPS + SF + follow-up group (n: 3), 1.5 mg / kg LPS + food group (n: 7), 1.5 mg / kg LPS + food + follow-up group (n: 4) The sepsis model was created by intraperitoneal injection with serotype LPS E. coli O5: B5 with 3 mg / kg / dose and 1.5 mg / kg / dose. It was recorded by monitoring sepsis scoring, body temperature measurement, weight follow-up and average food and water consumption at close intervals for 48 hours after endotoxin administration. At the end of the 48th hour, rats outside the follow-up group were sacrificed under ether anesthesia and gastrocnemius muscle tissue and blood samples were taken, and the autophagic activity was planned to be determined by determining beclin-1, LC3-I / LC3-II caspase-1, IL-1 β , NLRP3 proteins in the tissue. The follow-up groups were evaluated daily for 12 days and monitored for mortality. At the end of the 12th day, the rats were sacrificed.

Findings: It was observed that the effects of endotoxin weight loss, hypothermia and feed, water consumption reduction in rats treated with LPS were significantly different than the control group. Control and LPS-treated rat groups were evaluated with two different sepsis scores, and both scoring scores were found to be significantly higher in the LPS-treated groups compared to the control group. 1st sepsis scoring was significantly lower in the sepsis scoring at the 24th hour among rats that received 1.5 mg / kg / dose of LPS. When 2nd sepsis scoring was evaluated, it was observed that the sepsis score was significantly more severe in the group receiving food support

among the groups of rats administered 3 mg / kg / dose LPS. All sepsis scores of the group who received food support of 1.5 mg / kg / dose LPS of rats were significantly lower than the group without food support until 48th hour. Although there was a significant difference between body temperature measurements between control and LPS treated groups, there was no difference between LPS treated rat groups. There was no difference in survival between the groups.

Result: It is important to support the clinical findings with autophagy markers to be studied in the tissue. Nutritional support was found to have a significant effect on the severity of sepsis.

Keywords: sepsis, autophagy, starvation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis; vücudun enfeksiyona verdiği aşırı cevap olarak tanımlanabilir ve hayatı tehdit eden bir durumdur. Etkin ve hızlı bir tedavi uygulanmadığı takdirde hızla doku hasarı, organ yetmezliği ve ölüme sebep olur. Sepsis ilişkili morbidite ve mortalite antimikrobik ajanların keşfinden sonra dramatik şekilde azalmış olsa da bu sendromun yönetimi ve tedavisinde çok az bir ilerleme sağlanmıştır. Gelişmekte olan antibiyotik direnci ve immunsupresif hastaların izleminde enfeksiyonların agresif seyretmesi sepsisin patofizyolojisini ve kliniğini anlamayı ve böylelikle yeni tedavi yöntemleri geliştirmeyi zorunlu hale getirmiştir.(1)

Enfeksiyon gelişimi sonrası, vücutta immun sistemin inflamatuvar yanıtının başlamasıyla eş zamanlı olarak inflamasyonu sınırlayıcı antiinflamatuvar yanıtlar devreye girer ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) sınırlandırılmaya çalışılır. Bu yanıtın dengelenememesi önce ciddi sepsis ve septik şok tablosuna, multiorgan yetmezliğinin gelişmesi ile de ölüme sebep olur. En iyi merkezlerde ve en iyi tedavi altında bile septik şok sonrası mortalite oldukça yüksektir.(2)

Otofaji, organizmanın kendi biyolojisini sürdürmede ve hayatta kalmasında rol alan hayati bir mekanizmadır. “Geri dönüşüm fabrikası” olarak çalışarak hem artık işlevini sürdüremeyen protein, organel ve diğer yapıların lizisini sağlayarak hücrenin disfonksiyonunu engeller; hem de yeni sentez edilecek ürünlere ve organellere hammadde sağlar. Böylelikle hücrenin biyosentez fonksiyonunun devamlılığı dış ortama minimum bağımlılıkla sağlanır. Bunun dışında otofaji fagosite edilen patojenlerin lizisini sağlayarak vücudun enfeksiyonlara karşı immun yanıtında da rol almaktadır.(3) Bu nedenle de doku homeostazında anahtar rol oynamaktadır ve kanser, nörodejenerasyon, otoimmünite ve yaşlanmanın da içinde olduğu çeşitli patolojiler otofaji regülasyon bozukluğuyla ilişkilendirilmiştir.(4)

Sindirilecek maddelerin lizozoma ulaşma mekanizmalarına göre şimdiye dek 3 farklı otofaji yolu tanımlanmıştır. Makro-otofaji en çok üzerinde çalışılan mekanizmadır (dolayısıyla otofaji olarak adlandırılmıştır).(5)

Otofajiyi en iyi tetikleyen uyaranlardan birinin açlık olduğu bilinmektedir.(6) Hastalık döneminde ve sonrasında nekahat döneminde görülen iştahsızlık organizmanın otofaji yolağını aktive etme yolu mudur? Bu sorunun yanıtı henüz tam olarak bilinmemektedir. Nekahat döneminde beslenmedeki azalma otofajiyi aktive ederek organizmanın hastalık dönemindeki strese yanıtını arttırmasına; böylelikle mikroorganizmayı hızla vücuttan uzaklaştırmasına ve hasarlı dokuyu daha etkili bir şekilde onarmasına neden olabilir. Nutrisyon desteğinin kritik hastalık döneminde erken başlamanın hastalığın seyrindeki etkisiyle ilgili birçok çalışma devam etmektedir. Hayvan sepsis modelinde beslenmenin otofajiye etkisi ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Bu çalışmada amaç, sepsis modeli ile hastalanan ve kalori alımı azalan sıçanların dokularındaki otofaji aktivasyonunu ve sepsis sonrası sağ kalımlarını; sağlıklı sıçanlar ve ek sıvı mamayla beslenme desteği verilen hasta sıçanlarla kıyaslamaktır.

Bu çalışma ile:

- i. Hastalık döneminde iştah azalmasının otofaji aktivasyonuna ve dolayısıyla iyileşmeye katkısı olduğunun saptanması
- ii. Nutrisyonel desteğin akut hastalık dönemindeki iyileşmeye etkisinin anlaşılması planlanmıştır.

Çalışma sonucunda akut hastalık döneminde erken başlanan nutrisyon desteğinin hastalık sağ kalımına katkısı olmadığına anlaşılmıştır; sepsis ve diğer sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ile giden hastalıkların yönetim ve tedavi stratejilerine yeni bir bakış açısı kazandırabilir. Otofajinin akut hastalık döneminde etkinliğinin önemini anlamak otofajiyi arttıracak terapötik ajanlar geliştirilmesinin önünü açarak aşırı inflamatuvar yanıtın açtığı hasarları aza indirebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Sepsis

Sepsis; konağın enfeksiyon ajanına karşı bozulmuş inflamatuvar yanıtı ile karakterize, kompleman sistemi, koagülasyon yolları ve nöroendokrin sistemin de aktive olduğu; tedavi yanıtı alınamadığı takdirde çoklu organ yetmezliği ve ölüme sebep olabilen önemli bir klinik sendromdur. Sepsis ilişkili morbidite ve mortalite sepsis tanısının gecikmeden konması, hasta yönetimindeki gelişmeler ve antimikrobik ajanların keşfinden sonra dramatik şekilde azalmış olsa da bu sendromun yönetimi ve tedavisinde 1990’lardan sonra çok az bir ilerleme sağlanabilmiştir. Gelişmekte olan antibiyotik direnci ve immünsüpresif hastaların izleminde enfeksiyonların agresif seyretmesi sepsisin patofizyolojisini ve kliniğini anlamayı ve böylelikle yeni tedavi yöntemleri geliştirmeyi zorunlu hale getirmiştir. (7–9)

2.1.1. Epidemiyoloji

Sepsis insidansı her geçen yıl dünya genelinde milyonlarca yeni vakanın eklenmesiyle artmaktadır. Yakın zamanda Birleşik Krallık ’ta yapılan çalışmada genel durumu bozulan hastaların %26’sında sebep sepsis bulunmuştur ve bu hastalarda mortalitenin %22’sinden sepsis sorumludur. Başka bir çalışmada yoğun bakım ünitesi verileri toplanmış, servis yatışı yapılan hastaların % 39’unda sepsis izlenmiş, sepsis için %25 mortalite oranı saptanmıştır.(10,11)

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’de sepsis insidansı 100.000 vakada 437 olarak saptanmıştır. Sepsis nedeniyle hastane başvuru oranı artmış, akut koroner sendrom ve inme nedeniyle başvuran hasta sayısını geçmiştir.(12) Her yıl 750.000 ölüme sebebiyet vermekte ve yıllık 20 milyar dolar sağlık harcamasının sebebi olmaktadır. Bu rakam tüm sağlık harcamalarının %5,2’sini kapsamaktadır.(13)

Çocukluk yaş grubunda sepsis sendromu morbidite ve mortalite sebepleri içinde başta gelmektedir ve tün dünyada bebekler ve çocuklar için sağlık harcamalarında önemli artışa sebep olmaktadır. Sepsis kaynakları mortalite ve morbidite ilişkili sebepler sistemik inflamatuvar cevap sendromu (SIRS), organ yetmezliği komplikasyonları ve uzun süreli hastane yatışı gerekliliği olarak bulunmuştur. 2015 yılında SPROUT çalışması sonrası yayınlanan verilere göre sepsis prevalansı tün dünyada %8,2 olarak bulunmuştur. Buna ek olarak, çocuk yoğun bakım ünitelerinde izlenen hastalarda sepsis ilişkili mortalite %5,6 ve morbidite %17 olarak bulunmuştur.

Sepsis insidansının artmasına rağmen, sepsis ilişkili mortalite oranı ABD’de 2008-2012 yılları arasında %22.2’den %17.3 ‘e gerilemiştir. Bu başarının ardında yoğun bakım uygulamalarının seneler içinde gelişmesi ve sepsisin erken tanınmasını sağlayan klinik ve biyolojik tanımların netleşmesi için yürütülen “Surviving Sepsis Campaing” olarak görülmektedir.(14)

Hastaneden taburcu olduktan sonra bile sepsis, artmış ölüm riskiyle ilişkilendirilmiştir ve tekrarlayan sepsis atakları gelişme riskini arttırmaktadır. Hastaların taburculuk sonrası izlemlerinde günlük fiziksel fonksiyonlarında azalma, psikolojik rahatsızlıklar ve işitme, solunum, sindirim ve kas iskelet sistemleri ilgili devam eden problemler gibi morbiditeler tanımlanmıştır.(15)

2.1. 2. Sepsis Tanımı

Sepsis kelimesi yunan kökenli bozulma, çürüme kelimesinden günümüze ulaşmış bir tanımdır. İlk tanımı mikroorganizmalar keşfedilmeden ve immün sistem yanıtları henüz bilinmeden önce olsa da M.Ö. 1600 yılında Mısır papirüslerine kadar dayanmaktadır. Patojenlere organizmanın karmaşık immün-inflamatuvar yanıtının altında yatan patofizyolojik ve biyolojik değişiklikleri tanımlamak neredeyse 2000 yıl sonrasında başarılabilmektedir.(16)

Sepsis tanımı ile ilgili ortak bir dil kullanma amacıyla 1992’de Amerikan Göğüs Hastalıkları Uzmanlık Derneği / Yoğun Bakım Tıbbı Derneği tarafından yapılan uluslararası bir toplantıda ilk adımlar atılmıştır. Bu dönemde herkesin kullanabileceği enfeksiyon belirtileri ve SIRS tanımlarını içeren basit ve homojen bir tanım bulunması amaçlanmıştır.(17)

Tanımlamalara göre SIRS kriterleri aşağıda Tablo 1’de özetlenmiştir.(18)

Tablo 1:SIRS kriterleri

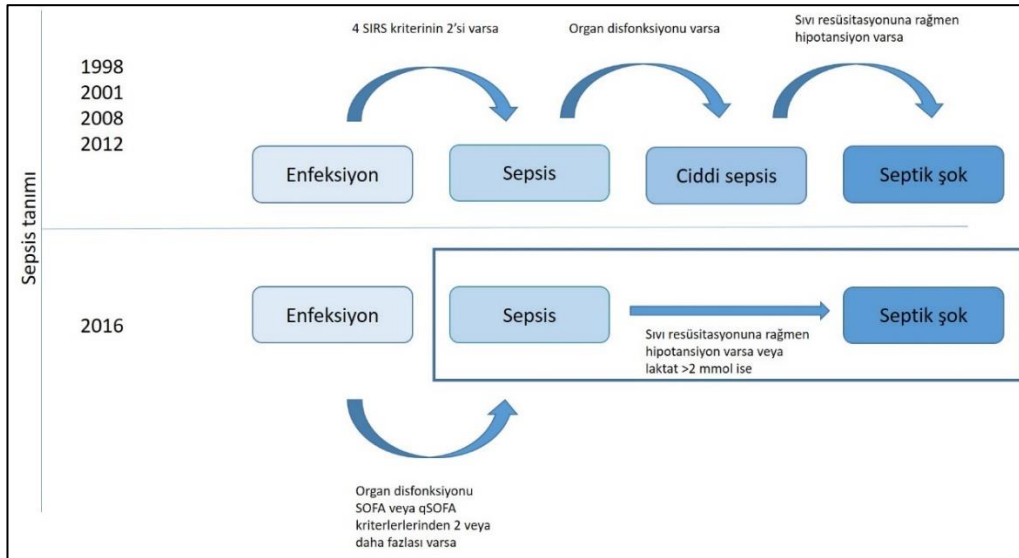
Erişkin hastalar için SIRS skorlaması	Çocuk hastalar için modifiye edilen SIRS skorlaması
Ateş veya hipotermi: Vücut ısısının $>38,5^{\circ}\text{C}$ ya da $<36,0^{\circ}\text{C}$ olması	Ateş veya hipotermi: Vücut ısısının $>38,5^{\circ}\text{C}$ ya da $<36,0^{\circ}\text{C}$ olması
Taşikardi: Kalp atım hızının >90 /dk olması	Taşikardi: Harici uyaranlar, ağırlı durumlar veya taşikardi yapabilecek kronik ilaç kullanımı olmaksızın ortalama kalp hızının yaşa göre normal sınırların 2 SD üzerinde olması veya başka şekilde açıklanamayan 0,5-4 saat boyunca devam eden dirençli taşikardi ya da 1 yaş altı çocuklarda harici vagal uyarı, beta bloker ilaç kullanımı, konjenital kalp hastalığı veya başka şekilde açıklanamayan kardiyak depresyon sonucu gelişen bradikardi
Takipne: Solunum hızı >20 /dk olması	Takipne: Ortalama solunum hızının yaşa göre normal değerlerin 2 SD üzerinde olması ya da nöromüsküler hastalık veya anestezi nedeniyle olmayan mekanik ventilatör ihtiyacı ya da $\text{pCO}_2 <32$ mmHg olması
Beyaz küre sayısı: $>12,0 \times 10^9/\text{L}$ veya $<4,0 \times 10^9/\text{L}$ veya olgunlaşmamış nötrofil oranının $\%10$ ’un üzerinde olması	Lökosit sayısı: Lökosit sayısının yaşa göre normal değerlerin üzerinde ya da altında olması veya olgunlaşmamış nötrofil oranının $\%10$ ’un üzerinde olması

Kaynak: Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*. 2015 Apr 23;372(17):1629–38. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. In: *Pediatric Critical Care Medicine*. 2005. (19,20)

Kriterlerden 2 veya daha fazlasının hastada olması sepsisi destekleyici bulgular olarak tanımlanır.

İlk tanımlama ile sepsis çoklu enfeksiyon etkenlerine (bakteri, mantar, virüsler, parazitler) sekonder gelişebileceği ve sepsis tanımı için septiseminin şart olmadığı anlaşılmıştır. Bunun yanında araştırma protokollerini standardize etmek ve ortak bir dil konuşabilmek için sepsisin çeşitli dereceleri tanımlanmıştır. Buna göre, “ciddi sepsis” organ yetmezliği, perfüzyon azlığı ve hipotansiyonun eşlik ettiği sepsis olarak tanımlanırken; “septik şok” hipotansiyona eşlik eden klinik başka bir durumun dışlanması durumunda yeterli sıvı resüsitasyonuna cevap alınamaması olarak tanımlanmıştır.

Yıllar içinde sepsis ile ilgili çalışmalar arttıkça ve yeni skorlama sistemleri devreye girdikçe tanımlaması değişkenlik göstermiş olup; 2016 yılında Avrupa Yoğun Bakım Derneği tarafından yapılan son uluslararası toplantıda sepsis “konağın enfeksiyon ajanına karşı bozulmuş inflamatuvar yanıtı sonucu hayatı tehdit eden organ yetmezliğinin varlığı” olarak tanımlanmıştır.



Kaynak: Verdonk F, Blet A, Mebazaa A. The new sepsis definition : limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis. 2017;30(2):200–4. (18)

Şekil 1:Sepsis tanımlamasının yıllar içindeki değişimi

Güncel olarak çocuk yaş grubunda değişiklik için kanıtların halen yetersiz olması nedeniyle SIRS kriterleri ile tanımlamaya devam edilmektedir. Sepsis şüpheli veya kanıtlı enfeksiyonun varlığında SIRS yanıtının görülmesi olarak tanımlanmaktadır. SIRS tanımlamasının spesifite ve sensitivitesi ile ilgili çocuk hasta grubunda yapılan bir çalışmada sadece bu kriter kullanıldığında sekiz hastadan birinin tanı alamadığı görülmüştür. Fakat gelecekteki rehberlerde durumun değişebileceği öngörülmektedir.

Ciddi sepsis tanımı sepsise eşlik eden organ hipoperfüzyonu ya yetmezliğini destekleyen laktat yüksekliği, oligüri, uzamış kapiller dolum zamanı, mental durumda bozulma, akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), dissemine intravasküler koagülopati (DİK), akut böbrek yetmezliği (ABY) gibi bulguların varlığında kullanılmaktadır.(21) Septik şok ise sıvı refrakter hipotansiyon ve hipoperfüzyon bulgularının varlığı ile karakterizedir. Çocuk hastalarda iki farklı şok tipi tanımlanmaktadır: Soğuk şok ve sıcak şok. Her iki şok tipinin klinik özellikleri Tablo 2’de özetlenmiştir.(22)

Tablo 2: Şok tipleri ve klinik özellikleri

Şokun tipi	Özellikleri			
	Kapiller geri dolum zamanı	Periferiz nabızlar	Cilt	Nabız basıncı
Soğuk şok	<3sn	Azalmış	Soğuk, alacalı görünümde	Dar
Sıcak şok	>3 sn	Sıçrayıcı	Sıcak, pembe görünümde	Geniş

Kaynak: Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. In: Pediatric Critical Care Medicine. 2005.(20)

2.1.3. Organ yetmezliğinin tanımlanması

Sepsis birçok sistemi etkileyen karmaşık bir sendromdur ve tanı koyulması ve tedavi izleminde organ yetmezliğinin tanımlanması önemlidir. Patogeneizde oran yetmezliğine sebep olan mekanizmalar ayrıntılı şekilde irdelenecektir. Erişkin

hastalarda organ yetmezliğinin değerlendirilmesi için SIRS kriterlerine alternatif olarak, yoğun bakım ünitelerinde izlenen hastalarda Sepsis İlişkili Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru (SOFA) ile yatak başındaki hastalar için ise hızlı Sepsis İlişkili Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru (qSOFA) kullanılması önerilmiştir.(23) Skorlama sistemleri Tablo 3 ve Tablo 4 'te özetlenmiştir.

Tablo 3: SOFA Skorlama Sistemi

	1*	2	3	4
Solunum PaO ₂ /FiO ₂ mmHg	≤400 MV var/yok	≤300 MV var/yok	≤200 ve MV var	≤100 ve MV var
Kardiyovasküler Hipotansiyon	OAB < 70 mmHg	Dopamin ≤5 ve dobutamin**	Dopamin >5 ya da adrenalin ≤0.1 ya da nöradrenalin ≤0.1***	Dopamin ≥15 ya da adrenalin >0.1 ya da nöradrenalin >0.1***
Karaciğer Bilirubin mg/dl	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12
Koagülasyon Trombosit 103/mm ³	≤150	≤100	≤50	≤20
Böbrek Kreatinin mg/dL ya da idrar debisi	1.2-1.9	2,0-3,4	3,5-4,9 Debi ≤500 mL/gün	>5 Debi ≤200 mL/gün
Nörolojik GKS	13-14	10-12	6-9	<6
*Bu sınırın ötesindeki değerler 0 puan alır. **En az 1 saat µg/kg/dakika dozunda verilmiş olmalı. MV: Mekanik Ventilasyon, OAB: Ortalama Arter Basıncı, GKS: Glasgow Koma Skoru.				

Kaynak: Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA.2016; 315 (8):801e810

Tablo 4: qSOFA Skorlaması

qSOFA skorlaması	
Hipotansiyon SAB <100 mmHg	1 puan
Bilinç bozukluğu GKS ≤13	1 puan
Takipne >22/dk	1 puan
≥2 puan alması hastada öncelikle sepsis düşündürmelidir.	

Kaynak: Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).JAMA.2016; 315 (8):801e810

Çocuk hasta popülasyonunda organ yetmezliği kriterleri olarak kullanılan kriterler Tablo 5’te özetlenmiştir.(24)

Tablo 5: Organ yetmezlik kriterleri

Sistem	Yetmezlik Kriterleri
Kardiyovasküler	Hipotansiyon* veya Kan basıncının normal aralıkta seyretmesi için vazoaktif ilaç gereksinimi olması veya Aşağıdaki bulgulardan ikisi: • Metabolik asidoz • Arter kanında lakat yüksekliği • Oligüri • Uzamış kapiller dolum zamanı •
Solunum	PaO2/FiO2 <300 ve ya PaCO2 >65 ve ya başlangıç değerinden 20 mmHg yükselmesi Oksijen saturasyon değerinin ≥%92 olabilmesi için %50’den fazla FiO2 gereksinimi ve ya Mekanik ventilasyon ihtiyacı olması

Nörolojik	Glasgow Koma Skoru ≤ 11 veya Bilinç durumunda akut değişiklik
Hematolojik	Trombosit sayısı $< 80.000 \mu/L$ veya 3 gün içerisinde ölçülen en yüksek trombosit değerinde %50'den fazla düşüş görülmesi Dissemine intravasküler koagülasyon
Renal	Serum kreatinin değerinin üst limitin ≥ 2 kat üstüne çıkması Bazal kreatinin değerinin 2 kat artmış olması
Hepatik	Total bilirubin $\geq 4 \text{ mg/dL}$ olması** ve ya Serum glutamik piruvik transaminaz değerinin üst limitin >2 katına yükselmesi
*Hipotansiyon: Yaşa göre <5 persantil olması ve ya sistolik kan basıncının yaşıya göre $<-2SD$ olması. **Yenidoğanlarda genelde normalin varyantı olarak görülür.	

Kaynak: Martin K, *pediatrica SW-M*, 2015 undefined. Initial resuscitation and management of pediatric septic shock.

2.1.4. Risk faktörleri ve Etiyoloji

Sepsis etyolojisinde çoklu enfeksiyöz organizmalar yer almaktadır. Bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler sepsise sebep olabilir. Zaman içerisinde sepsis kliniğine katkıda bulunan organizmaların da değiştiği görülmüştür. Gram negatif bakterilerle ilişkili sepsis önemini korusa da, ABD’de sepsis tanısı alan hastalardan sıklıkla Gram pozitif bakteriler izole edilmektedir.(25) Fungal sepsis insidansı son on yılda artış gösterse de, bakteriyel sepsis sıklığı halen fungal sepsisten daha fazladır. Halen sepsisli hastaların %50’sinden enfeksiyona sebep olan organizma izole edilememektedir (kültür negatif sepsis).(26)

Çocukluk çağında sepsis genellikle toplum kökenli olmaktadır (%57) ve en sık süt çocuklarında görülmektedir (ortalama 3 yaş (yaş aralığı 0,7-11). En sık enfeksiyon kaynağı olarak solunum sistemi saptanmıştır. Bu sistemin enfeksiyonları en yüksek mortalite oranlarına sahiptir. Özellikle aşılama sonrası çağ olarak değerlendirildiğinde;

patojenler arasında kan kültürlerinde en sık izole edilen patojen *Staphylococcus aureus* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olarak belirtilmiştir. (27–29)

Bunun dışında *Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria meningitides* prevalans sıklığı azalmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonlarında en sık *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Klebsiella pneumoniae* gibi Gram negatif bakteriler izole edilmektedir.(30) Parainfluenza, İnfluenza ve Adeno virüsler de sepsise neden olan virüslerin başında gelmektedir.(31)

Çocukluk çağıının özellikli dönemi olan yenidoğan döneminde ise erken başlangıçlı sepsis tanısı alan hastalarda en sık izole edilen organizmalar sırasıyla Grup B streptokok (GBS) ailesinden *Streptococcus agalactiae* ve Gram negatif basil olan *Escherichia coli*'dir. GBS izole edilen hastaların çoğunlukla term yenidoğanlar olduğu görülürken, *Escherichia coli* izole edilen hastaların çoğunluğunun preterm yenidoğanlar olduğu görülmüştür. (32)

Tüm yaş gruplarında risk faktörleri birbirine benzer olmakla birlikte; yaşlara göre risk grupları ve faktörler Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6: Yaşa göre risk faktörleri

Erişkin yaş grubu için	
Enfeksiyon riskinde artış yaratan durumlar	• Çevresel faktörler (hijyen, sağlık önemleri) • Konağın enfeksiyona yatkın olduğu özel durumlar örneğin: ○ Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, bronşiektazi- akciğer enfeksiyonları ○ Lenfödem, ülser, psöriyazis vb.- cilt enfeksiyonları ○ Kalıcı yabancı cisimler- üriner kateterler ve riner enfeksiyonlar, IV damar yolları ve cilt enfeksiyonları ○ Yakın dönemde geçirilmiş travma, cerrahi veya invaziv işlem
Bozulmuş immün yanıt	• Diyabetes mellitus • Konjenital immün yetmezlik sendromları • İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV)/Edinsel immün yetmezlik sendromu (AIDS)

	• Nötropeni • Splenektomi/Hiposplenizm • İyatrojenik (Kortikosteroidler, kemoterapi,biyolojik ajanlar) • Diğer kronik durumlar (örn. Malnütrisyon, maligniteler)
Mevcut organ yetmezliğinin olduğu durumlar	• Düşük fizyolojik rezerv nedeniyle artmış organ yetmezliği riski (örn. Kalp yetmezliği, kronik solunum yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği)
Özel yaş grupları	• Geriatrik hastalar (immün yaşlanma, eşlik eden morbiditeler)
Diğer genetik faktörler	• Etnik köken (bazı ırklarda insidans riski daha yüksek) • Cinsiyet (insidans erkeklerde daha fazla) • Özellikli immün defektler (örn. Kompleman yolağının terminalindeki defekt nedeniyle artmış menigokok sepsisi riski)
Enfeksiyon yönetimi	• Bakteriyel enfeksiyonlarda gecikmiş veya uygunsuz antibiyoterapi sepsis gelişme riskini artırır
Çocuk yaş grubu için	
• <1 ay • Ciddi yaralanmalar(örn. Büyük travmalar, yanıklar,penetre yaralar • Kronik hastalıklar • İmmüsupresyon • Büyük cerrahi kesiler • Kalıcı vasküler kateterler • Sık üriner sistem enfeksiyonları ile seyreden üriner sistem anomalileri	
Yenidoğanlar için	
İnfan risk faktörleri; • Prematürite veya düşük doğum ağırlığı • Prematürite nedeniyle uzun hastane yatışı, entübasyon gerekliliği, uzun süre intravenöz girişim gerekliliği ve diğer invaziv işlemlerin gereksinimi • Düşük 25-hidroksi D vitamini düzeyleri Maternal risk faktörleri; • Annenin enfeksiyon maruziyeti, bakteriyel kolonizasyonu • Obstetrik risk faktörleri (uzamış membran rüptür, koryoamniyonit, üriner sistem enfeksiyonları) Diğer risk faktörleri; • Doğum salonunda resüsitasyon ihtiyacı ve endotrakeal entübasyon uygulanması • Umbilikal kateter takılması	

2.1.5. Patofizyoloji

Sepsisin moleküler biyolojisi ve immünolojisini anlamada sol yıllarda kayda değer bir gelişme sağlanmıştır. Öncesinde özellikli patojene karşı konak savunmasının başlıca aşırı bağışıklık yanıtına bağlı hemodinamik değişiklikler olarak düşünülmekte olan sepsisle ilgili moleküler hücresel düzeyde yapılan hatırı sayılır sayıda çalışmayla birlikte düşündüğümüzden çok daha karmaşık olduğu anlaşılmıştır. Bu da konaklar arasında görülen yanıtın değişkenliğini anlamamıza biraz olsa da yardımcı olmaktadır.(23)

2.1.5.1. Doğal bağışıklık ve inflamatuvar araçlar

Patojenlere karşı konağın ilk yanıtı doğal immün sistem hücrelerin aktivasyonu aracılığıyla olmaktadır, bu hücreler başlıca makrofajlar, nötrofiller ve doğal katil hücreleridir.(33) Patojen-ilişkili moleküler örnekler (PAMPs) adı verilen bakteri endotoksinleri veya mantar beta-glukanları gibi organizmaya özellikli moleküller bu hücrelerde bu özellikli molekülleri tanıyan reseptörlere bağlanmaktadır. Doğal immün sistemi aktive eden diğer bir yol da hasarla ilgili moleküler örnekler (DAMPs) olarak adlandırılan adenosin trifosfat (ATP), yüksek hareketlilik grubu kutusu 1 (HMGB 1) ve mitokondiyal deoksiribonükleik asit(DNA) gibi konağın hücresel hasarını gösteren ölü veya hasarlı hücrelerden salınan moleküllerdir. Tüm bu moleküller makrofaj ve monositlerde örnek tanıyıcı reseptörler (PPRs) olarak adlandırılan; toll benzeri reseptörler (TLRs), C-tipi leptin reseptörleri, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptörler ve retinoik asitle indüklenebilir gen 1 (RIG-1) benzeri reseptörler gibi özellikli resptörlere bağlanarak, hücre içi sinyal iletim yollarını aktive etmektedirler. Böylelikle proinflamatuvar sitokinler olan TNF α , İnterlökin-1 (IL-1) ve İnterlökin-6 (IL-6) hücre içi üretimi ve salınımı sağlanmış olur. İlave olarak, NOD benzeri reseptör grubu gibi bazı örnek tanıma reseptörleri inflamazom adı verilen daha büyük protein yapılarıyla birleşerek İnterlökin 1 beta (IL-1 β), İnterlökin 18 (IL-18) ve

kaspazlar gibi programlı hücre ölümünde kritik öneme sahip sitokinlerin üretiminde rol alır. Proinflamatuvar sitokinler lökositlerin aktivasyonu ve çoğalmasında, kompleman sisteminin aktivasyonunda, endotelial tutunma moleküllerini ve kemokin salınımının düzenlenmesinde, doku faktörü ve karaciğer salınımlı akut faz reaktanlarının üretiminde önemli rol alırlar. Sepsiste yukarıda ayrıntılı olarak anlatılan bu abartılı bağışıklık yanıtı beraberinde konağın kendi doku hücrelerine hasar ve ölüme sebep olmaktadır.(34)

2.1.5.2. Homeostazın bozulması

Sepsiste inflamatuvar ve koagülasyon basamaklarının eş zamanlı aktivasyonuna bağlı olarak homeostaz ve inflamasyon arasında dinamik bir etkileşim olmaktadır. Bu etkileşimin etkisi hafif trombositopeniden fulminan DİK'e kadar değişken olabilmektedir. Sepsiste koagülasyon sisteminin işlevinin bozulmasının altında yatan etkenler multifaktöriyeldir. Sepsiste artmış koagülasyona yatkınlığın görülmesini hasarlanmış endotel hücrelerinden, monositlerden ve polimorfonükleer hücrelerden salınan doku faktörünün başlıca tetiklediği düşünülmektedir.(35) Bu düşüncüyü destekleyen in vitro endotoksemi ve bakteriyemi modellerinde doku faktörünün inhibe edilmesiyle inflamasyonun tetiklediği trombin oluşumunun tamamen engellenebildiği görülmüştür.(36) Doku faktörünün koagülasyon kaskadının sistemik aktivasyonunu trombin oluşumu, trombositlerin aktivasyonu sayesinde trombosit-fibrin pıhtıları oluşmasına yardımcı olarak sağladığı bilinmektedir. Oluşan mikrotrombüsler doku perfüzyonunu bozarak hipoksi ve organ yetmezliğine sebep olmaktadır.

Tüm bu prokoagülan etkilerin yanında, sepsiste koagülasyon kaskadının antikoagülasyon etkileriyle dengesini sağlayan protein C ve antitrombin seviyesinde azalma meydana gelmektedir. Protein C, trombin tarafından aktive edilen trombomodülin tarafından aktif protein C formuna dönüştürülmektedir. Protein C antikoagülan etkisini aktive protein S ile birlikte faktör 7a ve 8a'nın yıkılmasını sağlayarak gösterir. Ayrıca TNF α , IL-1 β ve IL-6'yı baskılayarak ve nötrofil ve monositlerin endotelyuma tutunmasını engelleyerek anti-inflamatuvar etkide bulunduğu bilinmektedir. Sepsis gibi şiddetli sistemik inflamasyon yanıtıyla giden

hastalıklarda kanda protein C ve protein S seviyelerinin azaldığı, trombomodülinin downregüle olduğu gösterilmiştir. Bu durum koagülasyon kaskadının düzeninin bozularak çalışmasına sebep olmaktadır.(37,38)

Koagülasyon homeostazının sepsiste bozulmasının sebeplerinden biri de fibrinolizin azalmasıdır.(39) TNF α ve IL-1 β düzeyleri kanda arttıkça, damar endotel hücrelerinden doku plazminojen aktivatörleri salınır. Bu sayede aktive olan plazminin etkisi plazminojen inhibitör tip 1 (PAI-1) miktarının artışı ile maskelenir. Sonuç olarak net etki mikrovasküler trombozun oluşumuna katkıda bulunacak şekilde azalmış fibrinoliz ve fibrinin temizlenmesindeki azalmadır.(40)

2.1.5.3. İmmunosupresyon

Sepsiste başlangıçta görülen proinflamatuvar durum yerini uzun süren bir immünosupresyona bırakır. Apoptozisin ve inflamatuvar sitokinlere azalmış yanıtın sonucu olarak yardımcı ve sitotoksik T hücre sayılarında azalma meydana gelir. Sepsis nedeniyle ölen yoğun bakım hastalarında ölüm sonrası yapılan çalışmalar CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde özellikle dalak gibi lenfoid organlar başta olmak üzere toplam olarak azalma saptanmıştır.(41) Ayrıca bazı çalışmalar endotoksine yanıt olarak üretilen kritik öneme sahip IL-6 ve TNF gibi sitokinlerin üretiminde azalma olduğunu da göstermişlerdir. Sepsisli hastalardan alınan nötrofillerin daha az kemokin reseptörleri taşıdığını ve IL-8'e karşı azalmış kemotaksis gösterdikleri saptanmıştır.(42)

Tüm bu bilgiler ışığında septik bir bireyin sekonder bakteriyel, viral veya mantar enfeksiyonlarına karşı yeterli immün yanıtı oluşturamayacağı açıktır. Gerçekten de birçok virüsün (sitomegalovirüs, Epstein-Barr virüsü, herpes simplex virüsü, insan herpes virüsü 6 dahil olmak üzere) sıklıkla hastalık döneminde tekrar aktive olduğu bilinmektedir, yapılan bir çalışmada sitomegalovirüs viremisinin mantar enfeksiyonu ve 90 günlük mortalite için belirleyici olduğu görülmüştür. (43) Benzer şekilde erken sepsis döneminde (4. Günde) ölçülen düşük lenfosit değerlerinin 28. Gün

ve 1. Yıl mortalitesi değerlendirmek için oldukça anlamlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle lenfopeni sepsiste immunosupresyonu değerlendirmek için bir biyobelirteç olarak kullanılması önerilmiştir.(44)

2.1.5.4. Hücre, organ ve doku düzeyinde görülen değişiklikler

Sepsise bağlı organ ve doku yetmezliği sebebinin altında yatan ana mekanizma hipoperfüzyona bağlı hücrelere oksijen sunumunun ve hücrelerin oksijen kullanımının azalmasıdır. Hipoperfüzyon tüm organ ve dokulara organ ve dokunun tipine bağlı yetmezlik bulgularının oluşmasına sebep olur.

Sepsiste görülen perfüzyon yetmezliğinin sebebi kardiyovasküler yetmezliktir.(45) Yapılan çalışmalarda septik kardiyomiyopatinin insidansı %18 ile %60 arasında değişmektedir. Septik kardiyomiyopatinin dolaşımdaki Tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) ve İnterlökin 1-beta (IL-1 β) başta olmak üzere tüm sitokinlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Sitokinler kardiyak miyositleri deprese eder ve mitokondriyal fonksiyonlarda değişkenliğe sebep olur. Septik kardiyomiyopati ani başlangıçlıdır ve geri dönüşlüdür, diğer bir önemli özelliği de sağ ventriküler dolum basınçları normal veya kardiyojenik şoktan farklı olarak düşüktür.(46) Yapılan birçok çalışmada sepsiste azalmış atım hacmi, artmış sistol ve diyastol sonu basınçlarla karakterize sistolik ve diyastolik yetmezlik olduğu gösterilmiştir.(47) Biventriküler yetmezliğin bir haftadan uzun sürebildiği görülmüştür.(48) Bu hastalarda laktat yüksekliğinin mortalite belirteci olduğu gösterilmiştir.(49) Bu duruma ek olarak yine inflamatuvar araçların tetiklediği arteriyel ve venöz genişlemeye bağlı sistemik venöz dönüşün azalmasıyla oluşan hipotansiyon ve distribütif şok görülmektedir.(47,50)

Mikrovasküler tüm yapılarda da (arterioller, venüller ve kapiller) genişleme görülür ve kapiller yatakta endotel hücrelerindeki kaderin ve sıkı bağlantıların işleyişindeki değişiklikler intravasküler sıvının hücreler arası boşluğa kaçışını artırır.(51) Tüm bu hemodinamik değişiklikler göllenmeyle birlikte tromboza yatkın bir mikrovasküler ortam yaratır ve doku ve organlarda perfüzyon yetmezliği sonucu olan anaerobik glikoliz hücreden laktik asit üretimini sağlar.(52,53) Buna ek olarak,

inflamatuvar cevaba yanıt olarak üretilen reaktif oksijen ürünleri (ROS) mitokondri fonksiyonlarının bozulmasına neden olur ve ATP düzeyi azalır. Bu mekanizma hücresel düzeyde hasarlanma meydana getirir.(54) Tüm bu doku ve organlarda hücresel düzeyde görülen değişiklikler sepsis morbidite ve mortalitesini arttıran katlanmış bir etki oluşturur.

Endotelyum vücutta neredeyse 1000 metrekaarelik alanı kaplayan ve vazomotor tonusun düzenlenmesi, dokuların hücre ve besin giriş çıkışının düzenlenmesi, koagülasyon sisteminin düzenlenmesi, inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sinyallerin dengesinde önemli roller üstlenen bir organ olarak düşünülmektedir.(55) Sepsis endotelyum fonksiyonlarında önemli değişikliklere sebep olarak artmış lökosit adezyonu, prokoagülan duruma kayış, vazodilatasyon, bariyer fonksiyonlarının kaybı ile hücre arası boşlukta, kavitelerde, deri altı dokuda ödeme sebep olmaktadır.(56)

Akciğerlerde alveol ile endotel arasındaki bariyerin hasarı ile birlikte proteinden zengin sıvı hücreler arası boşluk ve alveollere doğru yer değiştirir. Bazı vakalarda bu durum ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğu, hipoksi ve akciğer kompliyansının azalmasının eşlik ettiği ARDS'ye neden olur.(57) Böbreklerde renal perfüzyonun bozulması, akut tübüler nekroz ve mikrovasküler ve tübüler yapılar da oluşan diğer değişikliklerin de eşlik etmesiyle akut böbrek hasarı görülür.(58,59) Gastrointestinal yolda mukozal geçirgenliğin artması bakteriyel translokasyona ve lümendeki enzimlere bağlı olarak dokunun kendini sindirmesine sebep olur.(60,61) Karaciğerde klinikte kolestazla sonuçlanan bilirubinin klirensinde yavaşlamaya sebep olur.(55) Bilinç değişikliği sepsiste sık gözlenen klinik bulgulardan biridir ve merkezi sinir sisteminin yetmezliğinin başlıca göstergelerindendir. Tüm bahsedilen endotelyum fonksiyonlarındaki değişiklikler kan beyin bariyerinde toksinlerin, inflamatuvar hücrelerin ve sitokinlerin girişine sebebiyet vermektedir. Bunun sonucunda beyin ödemi, nörotransmitter iletiminde bozulma, oksidatif stresin sebep olduğu beyaz cevher hasarıyla birlikte hafif bilinç bulanıklığından deliryum ve komaya kadar değişebilen klinik bulgularla ortaya çıkan septik ensefalopati izlenmektedir.(62)

Sepsisin katabolik bir sürece sebep olduğu bilinmektedir. İnflamasyon, ağrı, hareketsizlik ve kortikosteroidlerin de katkısıyla hızlı bir şekilde ve önemli miktarda kas yıkımının aminoasit üretimi ve dolayısıyla immün hücreler için gerekli olan glukoneogeneizde kullanıldığı bilinmektedir.(63) Bunun yanında artmış insülin direnci ile birlikte hiperglisemi de sepsiste görülen metabolik değişiklerden biridir.(64)

2.1.5.5. *Kompanse edici mekanizmalar*

Kompanse edici anti-inflamatuar sitokin yolakları sepsiste ilk saatlerde bile aktifleşmektedir. Lökositler tarafından üretilen İnterlökin 10 (IL-10), IL-6 ve interferon gama üretimini baskılamaktadır, bunun yanında çözülebilir TNF reseptörü ve IL-1 reseptörü antagonistlerinin üretimine katkıda bulunarak aktif TNF α ve IL-1 sinyallerini etkisiz hale getirmektedir.(65) Hücre içi düzeyde ise otofaji patojenlerin, hasarlı organellerin ve proteinlerin veziküller içine taşınarak lizozomal sindirime yönlendirerek DAMP ve PAMP moleküllerini elimine etmekte ve inflamasyonun şiddetini azaltmaktadır.(66)

İnflamasyonun azalmasının pasif şekilde inflamatuvar yolakların etkinliğinin kaybolması ile gerçekleşmediği artık bilinmektedir. Bunun yerine çok sayıda aynı anda çalışan hücre yolakları ve yeni tanınan moleküler işaretler sayesinde olduğu düşünülmektedir. Patojen organizmalar konak tarafından elimine edildikten sonra dokudan hasarlı hücreler ve infiltre olan lökositler temizlenmelidir. Eğer sinyal ortamı uygunsa hücreler apoptoza gider ve çoğunlukla makrofajlar tarafından yutulur. Efferositoziz adı verilen bir süreç anti-inflamatuar sitokinler olan IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü beta üretilmesini tetikler.(67) Yakın dönemde keşfedilen biyoaktif lipit ailesi olan ve lipoksinler, rezolvinler, protektinler ve marezinler olarak adlandırılan bu moleküllerin ROS üretimini, endotelyal geçirgenliği, lökosit göçünü azalttığı ve makrofajların efferositozizini arttırdığı gösterilmiştir. Düzenleyici T hücreleri (Tregs) ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin de sitotoksik hücrelerin temizlenmesinde ve anti-inflamatuar sitokinlerin üretiminde önemli roller üstlendiği bilinmektedir.(68)

2.1.6. Klinik bulgular

Şüpheli veya kanıtlanmış sepsis tanısı alan hastalar kliniğe tipik olarak hipotansiyon, taşikardi, ateş ve lökositoz ile başvururlar. Hastalık şiddetlendikçe şok belirtileri (örn., soğuk cilt ve siyanoz) ve organ disfonksiyonu gelişebilir (örn. oligüri, akut böbrek hasarı, bilinç bulanıklığı). Akılda tutulması gereken en önemli durumlardan biri de başvuru belirtilerinin sepsise özgü olmayıp birçok durumda (örn. akut pankreatit, ani solunum yetmezliği sendromu(ARDS) vb.) görülebileceğidir. Bu nedenle hastalarda sepsisten şüphelenmek ve hasta henüz sepsis tanısı almadan hızlı müdahale etmek önem arz etmektedir. Sepsis tanısı çoğunlukla hızlı ve iyi bir anamnezi destekleyen; sepsise özgü olmayan tüm klinik bulguların, laboratuvar, görüntüleme ve mikrobiyolojik yöntemlerin bir arada değerlendirilmesi ile konur.(69)

2.1.7. Yönetim ve tedavi

Sepsiste erken şüphe ve erken müdahalenin mortalite üzerinde anlamlı fark arattığı daha önceki çalışmalarda vurgulanmıştır. Çalışmamızda tedavi planı olmadığından bu bölümde ayrıntılı olarak bahsedilmeyecektir. Fakat ilk 1 saatlik yaklaşımın önemini vurgulamak amacıyla Sepsis Sağ Kalım Kampanyasının algoritması Tablo 6’da sunulmuştur.

Tablo 6: Sepsis sağ kalım 1 saat algoritması

Sepsis Sağ kalım Kampanyası İlk 1 saat Paketi	
İlk 1 saatte yapılması gerekenler	Öneri Gücü ve Kanıt Düzeyi.
Laktat düzeyini ölç. İlk laktat >2mmol/L ise tekrar ölç.	Zayıf öneri, düşük kanıt kalitesi.
Antibiyotik vermeden önce kan kültürlerini al.	Bildirilen en iyi uygulama (BPS).
Geniş spektrumlu antibiyotik ver.	Güçlü öneri, orta kanıt kalitesi.
Hipotansiyon veya laktat düzeyi?4mmol/L için hızlıca 30ml/kg kristalloid başla.	Güçlü öneri, düşük kanıt kalitesi.

Hasta sıvı resüsitasyonu süresince veya resüsitasyon sonrasında hipotansif ise 65mmHg ortalama kan basıncı (MAP) değerine ulaşmak amacıyla vazopressör ver.	Güçlü öneri, orta kanıt kalitesi.
“0. Dakika” veya “başvuru zamanı acil serviste triyajın yapıldığı zaman veya başka bir yerden sevk ediliyorsa sepsis veya septik şokun tüm bileşenlerinin ortaya konduğu en erken an olarak tanımlanmıştır.	

Kaynak: 2018 Sepsis sağkalım kampanyasının sepsis tedavi demeti güncellemesi

2.1.8. Gelecekte öngörülen tedaviler

Sepsis için bir dizi potansiyel tedavi hayvan modellerinde umut verici görünmektedir, ancak henüz insanlarda yeterince incelenmemiştir. Bunlar arasında toll like reseptör antagonistleri ve nötralize edici antikörler, talaktoferrin, interferon gama, makrofaj migrasyon inhibisyon faktörü nötralize edici antikör ve bazı proenflamatuar genlerin bakteriyel süperantigen kaynaklı ekspresyonunu inhibe eden sentetik bir peptit bulunmaktadır.

Sepsis için bazı potansiyel tedaviler insanlarda çalışılmış ve çalışılmaya devam etmektedir, ancak çoğunda sonuçlar çelişkilidir ve etkilerini netleştirmek için ek araştırmalar gerektirmektedir. Bunlar arasında poliklonal intravenöz immün globulin (IVIG), interlökin-1 reseptör antagonistleri, adsorptif materyaller veya membranlar yoluyla hemoperfüzyon, plazma değişimi, tam kan değişimi, birleştirilmiş plazma filtrasyon adsorpsiyonu, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), hemofiltrasyon, antikoagülanlar nalokson, pentoksifilin ve statinler bulunur.

2.2. Hayvan sepsis modelleri

Sepsis modelleri uzun zamandır kemirgenler başta olmak üzere çeşitli hayvan gruplarında çalışılmaktadır. Sepsis modelleri kısıtlıdır; birçok açıdan insanda meydana gelen karmaşık sepsis patofizyolojisini yansıtmamaktadır. Yapılan çalışmalar sonrası etkisi hayvan deneylerinde gösterilen tedavi ajanlarının klinik denemelerde insanlarda etki göstermemesi bunu açıkça göstermektedir. Hala sepsis ile ilgili birçok veriye ihtiyaç duyulmaktadır. Her yöntem kendine has dezavantajlara ve avantajlara sahiptir.

Sepsis yöntemleri 1-) canlı bakterinin (genellikle E. Coli tercih edilmektedir) i.v veya i.p olarak enjekte edilmesi 2-) Bakterilerden elde edilen inflamasyonu tetikleyen ürünlerin (örn: Lipopolisakkarit (LPS) antijeni veya lipoteikoik asit) lokal veya sistemik enjekte edilmesi ile endotoksemi oluşturulması 3-) lokal enfeksiyon oluşturulan modeller: peritonit modelleri-çekum ligasyon ve ponksiyonu(CLP) ve çıkan kolona yerleştirilen stent aracılığıyla peritonit oluşturulması(CASP), pnömoni modelleri olarak sayılabilir.

Kemirgenlerde sepsis oluşturulması için çekum ligasyonu ve ponksiyonu (CLP) “altın standart” yöntem olarak kabul edilmektedir. Bunun sebebi ise polimikrobik ajanların sepsis oluşturması, insanlardaki divertikülit, apandisit kliniğiyle benzerlik göstermesi ve sitokinlerin daha çok gerçeği yansıtmaması nedeniyle sayılabilir. Fakat bu yöntem içinde bazı zorluklar barındırmaktadır. Özellikle bu yöntem hayvanların yaş ve cinsiyetine, uygulama yapan kişinin tekniğine göre (ponksiyon yapılan iğnenin boyutu, açılan delik sayısı, bağlanan çekum boyutu vs.) değişkenlik göstermektedir. Ayrıca farelerde türler arasında genetik değişikliklere bağlı farklı immun ve inflamatuvar yanıtlar alınması nedeniyle farklı sonuçlar alınmaktadır. Bizim çalışmamızda amacımız sepsis modeli sonrası hayvanlarda görülen az yeme içgüdüsünün otofajiye etkisinin izlenmesi olduğu için, cerrahinin yaratacağı stres ve bunun neden olacağı otofajinin aktivasyonu ve yönteme bağlı olarak sıçanlar arasında farklılık oluşması istenmediğinden; CLP yönteminden uzaklaşmıştır.

Canlı bakterilerin i.v veya i.p enjeksiyonu, canlı bakteri sayısının her sıçanda aynı sayıda olmasının zor olması ve yöntemin yaratacağı zorluklar nedeniyle tercih edilmemiştir. Pnömoni modeli izleminin yaratacağı koşullar nedeniyle tercih edilmemiştir.

E.coli LPS antijeni ile endotoksemi yöntemi; kemirgenlerde birçok çalışmada uygulanmış olup; otofaji aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Deneklerde eşit dozda inflamasyon yaratılması planlandığı için seçilmiştir. Fakat bu yöntemin de; erken sitokin salınımına neden olması ve patojen mikroorganizmasının sadece tek bir ürününün olması nedeniyle tam bir sepsis oluşturamaması gibi kısıtlılıkları mevcuttur.(8)

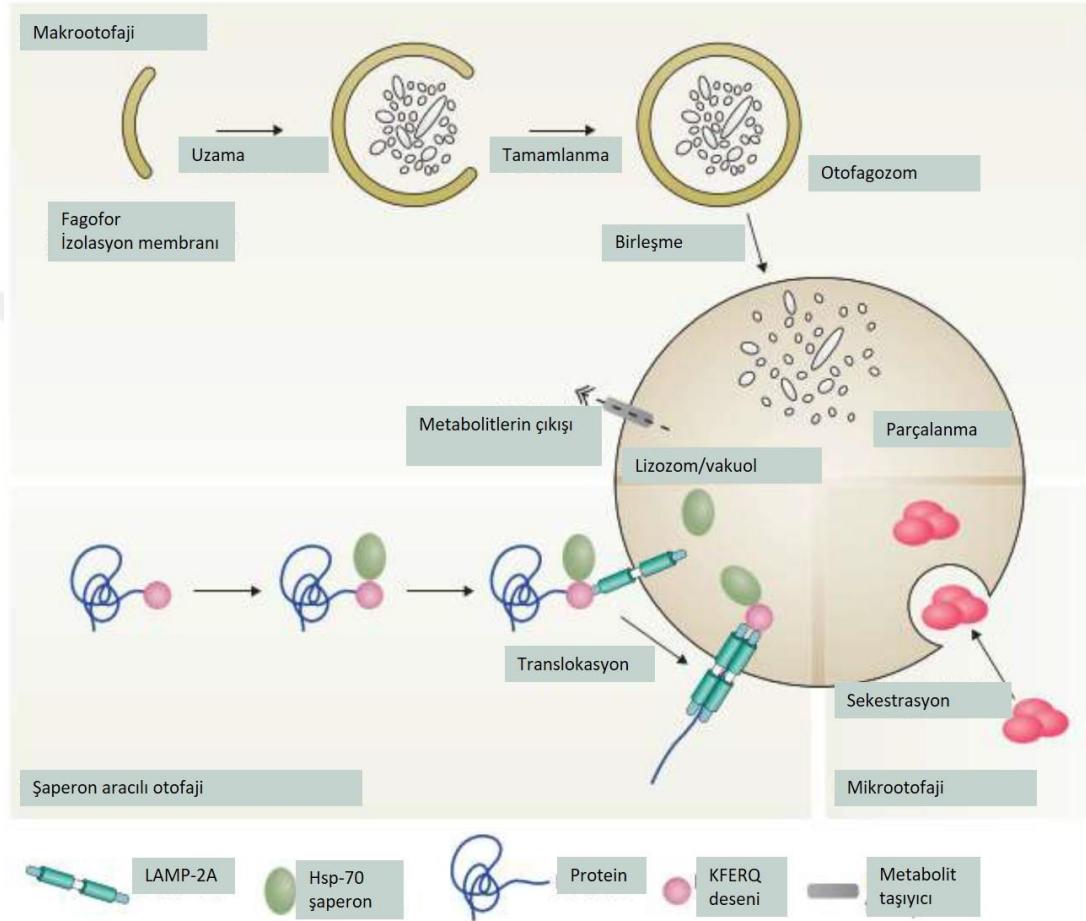
2.3.Otofaji

Hücre homeostazisi yapım (anabolik) ve yıkım (katabolik) süreçlerin karışık dengesi ile sürdürülmektedir. Hücre içi ana katabolik olaylar ubiquitin-proteazom sistemi (UPS) ve lizozomlar tarafından yürütülmektedir. Birbirinden çok farklı özelliklere sahip olsalar da, hücre içi protein yapım ve yıkım dengesi trafiğinin ana iki mekanizması olarak işlev görmektedirler. UPS genellikle hücre içinde kısa ömürlü proteinlerin yıkımında ana role sahipken; lizozomal yıkım “otofaji” adıyla bilinen yolakla uzun ömürlü ve birikmiş proteinlerin yıkılmasında etkin role sahiptir. 1960’larda ilk keşfedildiği zamandan beri elde edilen bilgiler sonucunda otofajinin düşünüldüğünden çok daha karmaşık ve özellikli bir hücre içi mekanizma olduğu anlaşılmıştır.(70)

Otofaji kelimesi Yunanca’daki *auto*-(kendi)ve *phagy*(yemek) kelimelerinin birleşiminden Christian de Duve tarafından türetilmiştir. İlk keşfedildiğinde uzun ömürlü proteinlerin ve organellerin yıkımından sorumlu toplu bir yıkım sistemi olduğu düşünülmekteydi.(4) Fakat bugün bakıldığında oldukça seçici ve özellikli bir sistem olduğu anlaşılmış ve en az şimdiye dek bilinen üç farklı yolağı tanımlanmıştır: Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA).(4,71)

Makrotofaji, otofaji yolaklarından en çok çalışma yapılan ve en bilinenidir: bu yolakta “otofagozom” adı verilen çift katlı membran yapısına sahip organellerin yardımıyla sitoplazma içerikleri lizozomlara taşınmaktadır. Otofagozom, otofaji ilişkili gen proteinleri (ATG) tarafından oluşturulmaktadır ve bu organel yardımıyla hücre içindeki taşınan maddelerin lizozomla birleşerek yıkımı sağlanmaktadır. Literatürün devamında “otofaji” terimi kullanıldığında makrotofajiden bahsedilecektir. Mikrotofaji ise azot ihtiyacı veya rapamisin tarafından indüklenen bir yolaktır, bu yolakta proteinler lizozomlar tarafından hücre kıvrımları oluşturarak direkt içeri alınmaktadır. Bu yolağın ana hedefi azot ihtiyacında dengeyi sağlamak ve organel boyutlarını düzenlemektir.(72,73) Son olarak, CMA otofajinin en özellikli tipidir; bu yolak lizozomal kökenli bir protein olan ısı şok protein 70 (Hsc70)’in lizozom ilişkili membran proteini tip 2(LAMP-2A)’ye bağlanarak sitozol içeriğini

lizozomlara taşınması yoluyla olmaktadır. Bu yolla lizozomlara taşınan proteinler özel bir pentapeptit deseni içermektedir. KFERQ adıyla anılan bu desen lizozomlara hedef proteinlerin taşınması için gereklidir. CMA, MYC / c-Myc proteininin proteozomal bozulmasını kontrol eder ve hücresel seviyelerini düzenler.(73–76)



Kaynak: Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. Nat Cell Biol 15, 713-720.(77)

Şekil 2:Otofaji tipleri: makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji

Otofajinin hücre bazal işlevlerini sürdürürken aktif olduğu görülmektedir, bunun yanında düşük ATP düzeyleri, besin ve büyüme faktörü eksikliği, hipoksik durumlar, Endoplazmik Retikulum (ER)'un strese olduğu durumlar, patojenin hücreye girişi ve antikanser ilaç tedavisi gibi hücre homeostazini etkileyen durumlarda tetiklenerek daha aktif olacak şekilde düzenlenmektedir.(71,77,78)

Doğası gereği otofaji hücrelerin stres altında enerji üretimini destekleyerek hayatta kalmasına yardımcı olur, dolayısıyla hücre içinde geri dönüştürücü ve koruyucu ve bu nedenle de çok önemli bir rolü üstlenmiştir. Dolayısıyla otofajinin katabolik süreçlerinin normalden fazla aktive olması eğer sıkı kontrol altına alınamazsa temel yapıtaşlarının da yıkımına yol açarak hücre için ölüm anlamına gelebilir.

Boya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada otofajinin kimyasal inhibitörler veya RNA girişimi tarafından inhibe edilmesinin apoptotik tipte hücre ölümüne yol açtığını göstermiştir. Farelerde sistemik otofaji eksikliğinin oluşturulduğu çalışma modellerinde fareler doğumdan sonraki bir gün içinde ölmekte ve oosit spesifik otofaji eksikliği erken embriyogenez sırasında ölümcül olmayla sonuçlanmakta olup, gelişim sırasında otofajinin temel rolünü ve memelilerde olduğu gibi düşük ökaryotlarda farklılaşmayı açıkça göstermektedir. Otofajinin, mayalarda etkin mayoz füzyon ilerlemesi ve uygun mayotik kromozom ayrımı için gerekli bir süreç olduğu gösterilmiştir. Otofajinin bu özelliği “otofajik hücre ölümü” adı verilen bir programlı hücre ölümü olarak hayatta kalmada önemli bir özellik haline gelmektedir.(79,80) Otofajik hücre ölümü olarak sınıflandırılması için hücrelerin, apoptoz yolağının kaspaz aktive olmadan ölmesi gerektiği ve ölen hücrelerde otofajik akıda bir artış olması gerektiği önerilmiştir.(81) Bunun yanında otofajinin ilaçlarla veya genetik olarak baskılanmasıyla birlikte hücrenin otofaji ilişkili ölümü önleyebileceği veya ölümden kurtarabileceği varsayılmaktadır. Beraberinde keşfedilen ölüm ilişkili protein kinazlar (DAPk) ve benzeri ilişkili bazı proteinlerin otofajik hücre ölümünü aktive ettiği gösterilmiştir.(82)

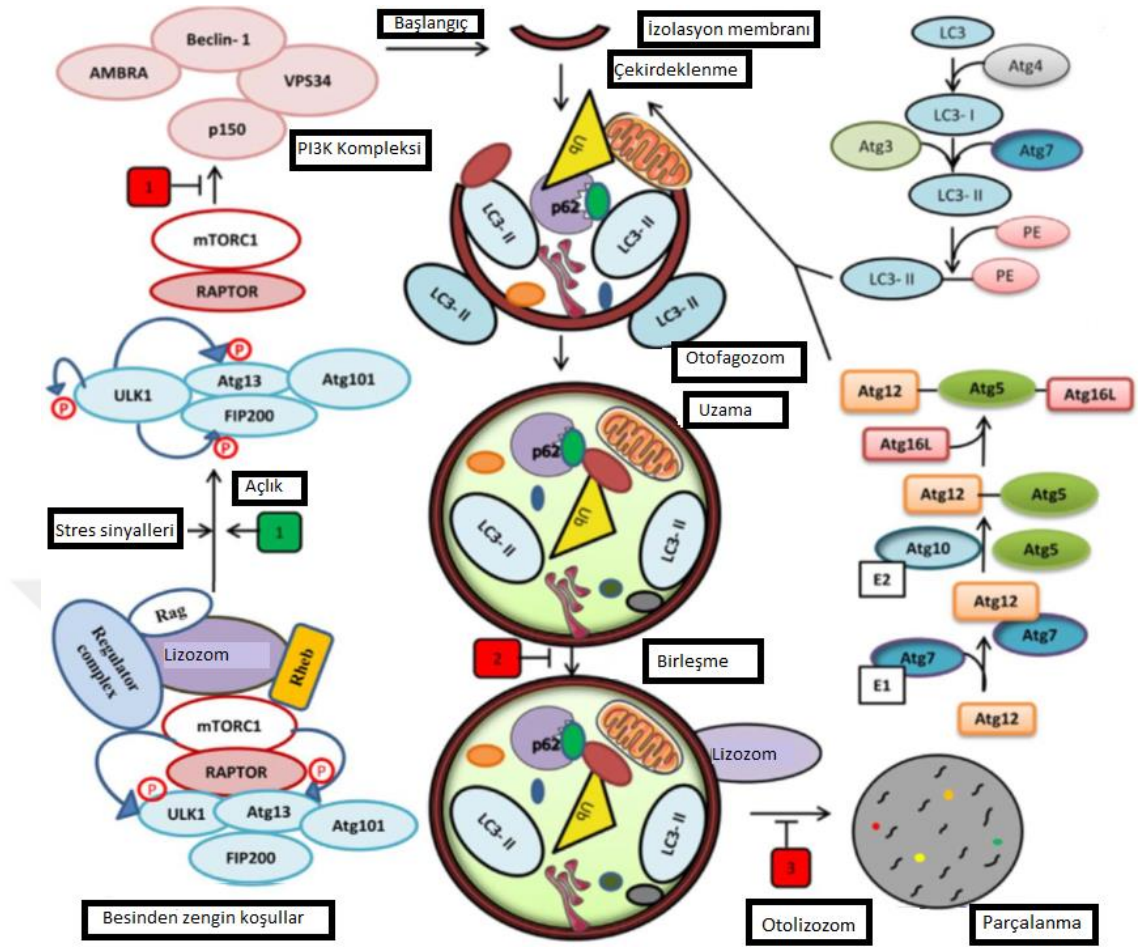
Otofaji, karaciğerde lipidlerin birikmesini ve böylece lipotoksisiteyi önler. Artan otofaji, sadece hücre içi mutasyona uğramış proteinlerin temizlenmesini kolaylaştırmakla kalmayarak, aynı zamanda nöronları apoptotik yolaklardan koruyabilir. Bu nedenle otofajinin hücre hasarı, hipoksik ve açlık koşulları gibi faktörlere karşı hayatta kalma yanlısı bir yol olarak hizmet ettiği görülmektedir. Otofaji ayrıca, otofajik veziküllerin hücre içi virüs parçacıklarını ve bakterileri yutmaya yardımcı olduğu ve bunları lizozomal yıkımı hedef alan yardımcı patojen

etkileşimlerinde yardımcı rol oynar. Son çalışmalardan elde edilen bilgiler, otofajinin kemik büyümesi, epidermal keratinizasyon ve saç büyümesi, T hücreleri ve doğal öldürücü T hücre gelişimi, kıkırdak gelişimi, osteoblast ve eritroid farklılaşması ve miyojenik farklılaşma ve genomik stabilite için çok önemli olduğunu göstermiştir. İstilacı patojenlerin elimine edilmesinin yanı sıra, Majör histokompatibilite kompleksi 2 (MHC II) tarafından antijen sunumu için otofaji de gereklidir. Ek olarak, nörodejeneratif hastalık, bulaşıcı hastalık ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda otofajiye katılan genlerdeki mutasyonları tanımlayan artan sayıda raporlar vardır. Otofaji ve hastalıklara katılımın oynadığı bu temel roller, çeşitli hastalıkların tedavisi için terapötik bir hedef olarak görülmesi için çok sayıda araştırma ilgisini kazanmıştır.(66)

2.3.1. Otofagozom Oluşumunun Çekirdek Moleküler Mekanizmaları

1990'lı yıllardan bu yana mayalarda 30'dan fazla ATG geninin tanımlanması ve bu maya genlerinin çoğunun memeli homologlarının tanımlanması ile birçok organizmada otofajinin korunduğunun anlaşılması otofaji yolağının fizyolojik ve patolojik koşullarda oluşum mekanizmasını anlamının yolunu açtı.(83,84)

“Çekirdek moleküler mekanizma” olarak adlandırılan ATG genleri, otofagozom oluşumundan sorumludur ve otofajinin indüksiyonu, vezikül çekirdeklenmesi, vezikülün büyümesi ve tamamlanması, geri alma, vezikülün lizozomla birleşmesi ve parçalanması adımlarında sırayla rol almaktadır.



Otofaji tetikleyiciler	Otofaji inhibitörleri
Stres sinyalleri	1. 3-metil adenin Wortmannin LY294002
- Düşük oksijen seviyeleri - Büyüme faktörü eksikliği - Amino asit eksikliği - Atp seviyelerinde azalma - Glukoz miktarında azalma	2. Baflomisin A1 Klorokin Hidroksiklorokin
1. Rapamisin Everolimus Temsirolimus	3. E-64d Pepstatin A Löpeptin

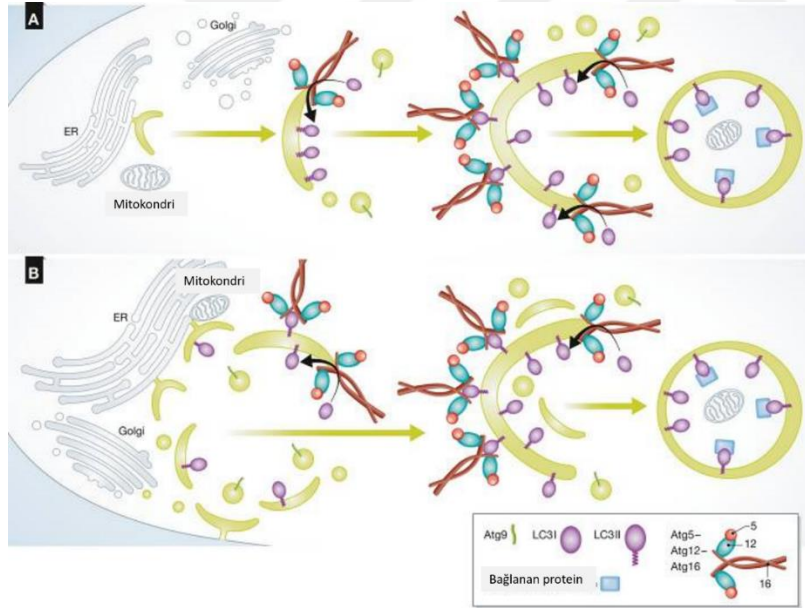
Kaynak: Ravanan, Palaniyandi, Ida Florance Srikumar, and Priti Talwar. "Autophagy: the spotlight for cellular stress responses." *Life sciences* 188 (2017): 53-67.(73)(85)

Şekil 3:Otofaji biyogenetiğinin moleküler mekanizması

2.3.1.1 Otofajinin tetiklenmesi ve otofagozom oluşumu

2.3.1.1.1. Membranın kaynağı

Otofajinin atıvasyonu memelilerde izolasyon membranının oluşumu ile başlamaktadır. (86) Membranın başlangıçta nasıl oluştuğu henüz bilinmemektedir, bununla birlikte devam eden çalışmalardan elde edilen kanıtlarda *de novo* oluşabileceği ya da halı hazırda hücre içindeki plazma membranı, ER, mitokondri membranı veya ER ile mitokondrinin temas noktaları(ERGIC) mevcut zar oluşumlarından köken alabileceği gösterilmiştir. ERGIC'ten üretilen COPII vezikülleri, lipidasyon işlemi için membran şablonu görevi görür. Sec 24, bir COP II oluşumu alt birimi, otofagosom oluşumunu düzenlemek için Atg9 ile etkileşime girer. (87–90)



Kaynak: Abada, Adi, and Zvulun Elazar. "Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis." *EMBO reports* 15.8 (2014): 839-852.

Şekil 4: A.Güncel otofagozom oluşumu şeması, B. Otofagozom oluşumu için önerilen yeni model

2.3.1.1.2. mTOR kompleksi

Otofagozomun oluşumunu başlatan önemli birkaç sinyal yolağı bulunmaktadır. Bunlardan en önemli düzenleyici sinyal yolaklarından biri hücresel büyüme, hücre siklusunun düzenlenmesi, protein sentezi ve otofajinin düzenlenmesi gibi önemli görevleri bulunan bir serin/treonin kinaz kompleksi olan memeli rapamisin hedef (mTOR) kompleksidir.(91) mTOR, fonksiyonel olarak 2 farklı kompleks oluşturur: mTORC1 ve mTORC2. Alt ünitelerinin farklılığı, mTORC1 ve mTORC2'yi yapısal olarak farklılaştırır. mTORC2, mLST8, RICTOR, mSIN 1 ve PROTOR gibi alt birimlerden oluşur. mTORC1 kompleksi ise ULK1, Atg13, Atg101, FIP200 ve RAPTOR gibi alt birimlerden oluşur ve besin sinyallerine daha duyarlıdır. Kaynak ekle

Çoğu durumda, otofaji, tüm stres sinyallerinin otofaji yolağına iletildiği mTORC1'e bağlı bir şekilde gerçekleşir. Hücrenin büyümesi için şartlar elverişli olduğunda mTOR kompleksi yeni proteinlerin sentez edilmesi için aktive olur. Fakat besin maddelerinin az olması nedeniyle hücrenin korunması gerektiği ve dolayısıyla otofajinin aktivasyonuna gerek olmayan durumlarda otofaji yolağı mTOR kompleksi tarafından Atg1/ULK1 kompleksinin düzenlenmesi aracılığıyla baskılanır. Mayalardan memelilere mTORC1 inhibisyonu yoluyla otofaji indüksiyonunun evrimsel olarak korunduğu bilinmektedir. (83,91)

2.3.1.1.3. mTORC1

Atg13 ve FIP200, C terminal bölgesinde ULK1 ile etkileşime girer. Atg101, Atg13'ün N terminalinden ULK1'e bağlanır.(92) Tüm bu alt birimler, otofajinin başlaması ve bu kompleksin bir bütün olarak işleyişi için çok önemlidir. Sadece ULK1 inhibisyonunun tek başına otofajiyi inhibe edebilmesi, ULK1'in ULK2'den farklı özellikteki rolünü çok net bir şekilde ortaya koymaktadır.(93) Benzer şekilde, Atg13'teki WF parmağı, DCFP1 / ZFYV1 ve WIPI1'in (PI3P bağlayıcı proteinler) izolasyon membranına alınması için oldukça önemlidir.(94)

2.3.1.1.4. Normal koşullar

Rag GTPase, mTORC1'i, mTORC1'in kinaz aktivitesi için gerekli olan v-ATPase içeren lizozoma bağlar.(95) Bir regülatör kompleksi, Rag GTPaz'ı lizozoma bağlar.(96) Lizozomda mTORC1, Rheb (mTORC1 aktivasyonu için temel bir faktör) tarafından aktive edilir. Aktif mTORC1, ULK1 kinaz kompleksini etkisiz hale getirmek için RAPTOR (düzenleyici molekül) ile ULK1 ve Atg13'ü fosforile eder.(97) RAPTOR, mTORC1'in ULK1 – mAtg13 – FIP200 ile etkileşimine aracılık etmek için ULK1'e bağlanır.(98) Bu nedenle normal şartlar altında aktif mTORC1, lizozomla ilişkili kalır ve hücrenin hayatta kalması ve çoğalmasına yol açan bir fosforilasyon yolağını aktive eder.(85)

2.3.1.1.4. Açlık koşulları

Ancak açlık koşulları altında mTORC1 inhibe edilir ve lizozom- mTORC1 ilişkisi bozulur. Açlık durumu, amino asitlerin, büyüme faktörünün, oksijenin ve ATP'nin yetersizliği veya kullanılamaması olabilir ve her biri, mTOR'u farklı yollarla inhibe edebilir. ULK1 kompleksi, inhibe edildiğinde mTORC1'den ayrılır. Bu ayrışma tek başına otofajiyi başlatmak için ULK1'i aktive edemez. AMPK tarafından ek bir yolakla aktivasyon gerektirir. Bu aktif kompleks daha sonra otofagozom oluşumunu başlatır. AMPK ayrıca, Rheb ve RAPTOR fosforilasyonu yoluyla da mTORC1'i inhibe ederek otofajiyi indükler. Aktif ULK1, Atg13 ve FIP200'ü fosforile ederek aktive eder. Bu ULK1 kompleks aktivasyonu, fagofor veya izolasyon zarı adı verilen çember şeklindeki bir yapının oluşumunu başlatır. ULK1'in otofajinin ilerlemesi için PI3K kompleksinin beclin-1 parçasını, Ser14 rezidüsünü fosforile ederek aktive ettiği anlaşılmıştır.(99)

2.3.1.2. Vezikülün çekirdeklenmesi

Çekirdeklenme adımı esas olarak VPS34 ve Beclin-1 kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Substratı PI olan memelilerde sınıf III fosfoinositol kinaz olarak bilinen tek enzim olan VPS34, fagoforun çekirdeklenmesi ve büyümesi için fosfatidil inozitol 3-fosfat (PI3P) adı verilen hayati bir bileşen oluşturur.(100) VPS34 PI3P'yi, P3'ü (Fosfatidil Inositol) D3 konumunda fosforile ederek oluşturur. Beclin-1'in otofajideki rolü endozom oluşumu ve hücre ölümü yollarında oldukça geniş olmakla birlikte otofagozom oluşumundaki rolü, VPS34 kompleksinin bir parçası olmasıyla gerçekleşir. AMBRA1, ULK1 ile fosforile edilir, daha sonra dynein motor kompleksinden ayrışır ve fagofor oluşumu basamağında Beclin-1'i bağlamak için endoplazmik retikulumla aktarılır. VPS34-Beclin-1 kompleksinin etkinliği, Barkor ve UVRAG gibi proteinler tarafından Beclin-1 bağımlı bir şekilde düzenlenir.(101)

Mayadaki VPS15 proteinini andıran p150 kompleksinin bir başka üyesi, tipik bir VPS34 regülatörüdür. PI3K ile etkileşimi ayrıca lipid kinaza spesifik aktiviteyi artırır. Benzer şekilde, p150'deki WD tekrarları da bir hücre içindeki çeşitli fonksiyonlar için gereklidir. Beclin-1 eksikliğinde B ve T hücre öncülerinde sayıca anlamlı miktarda azalma gözlemlenmiştir, bu durum Beclin-1'in immün hücrelerin gelişimi için önemini belirtmektedir. Beyinde, Beclin-1'in seviyesi yaş artışı ile azalır ve dolayısıyla VPS34-Beclin-1 kompleks miktarı da azalır. Bu, otofajinin fonksiyonlarında görülebilecek bozukluğun yaşlanma sürecine katkısının bir göstergesidir.(102)

2.3.1.3. Uzama

Tüm uzama mekanizması, 2 ubiquitin benzeri konjugasyon sistemi tarafından üstlenilir. Biri Atg5-Atg12 birleşim sistemi ve diğeri LC3-PE sistemidir. Atg5-Atg12 birleşim sistemi, Atg7 (E1 benzeri enzim), Atg10 (E2 benzeri enzim) ve Atg16L1 gibi diğer üyeleri içerir ve bu trimerik veya multimerik kompleks Atg5-Atg12-Atg16L1'in oluşumu ile sonuçlanır. Bu kompleks, fagoforun uygun şekilde kıvrılmasında katkıda bulunur ve LC3 lipidasyonu için de gereklidir. Bu kompleks aynı zamanda ikinci

ubiquitin benzeri birleşme sistemi LC3B-PE'yi destekler. (103) Atg16L pozitif olan otofagozom prekürsör membranlarının fosfatidik asit içeriği, HS1BP3 tarafından düzenlenir.(104) LC3-PE sistemi, Atg4B (sistein proteaz), Atg7 (E1 benzeri enzim), Atg3 (E2 benzeri enzim) içermektedir. Bu, LC3B-IPE bileşimiyle sonuçlanır. Bu birleşim, fagoforu uzatır ve sızdırmaz hale getirir, otofagozom adı verilen çift zar yapısı oluşturur. LC3B-II daha sonra otofagozomun iç ve dış yüzeyine Atg5-Atg12'ye bağlı bir şekilde alınır. LC3B-II, lizozomla füzyon gerçekleşene kadar otofagozomal membrana bağlı kalır. Bundan sonra, zarın dış yüzeyindeki LC3B-II ayrılır ve iç yüzeydeki zar ile ilişkili olanlar taşınan madde ile birlikte bozulur.(105) LC3 ve GABARAP'ın yokluğu, otofagozom oluşumu üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip değildir. Fakat büyüklüğü, oluşum etkinliği ve lizozomla füzyonunu etkilemektedir.(106)

2.3.1.4. Taşınan maddenin seçimi

Otofajinin ayırım gözetmeyen bir yıkım sistemi olmasının yanı sıra, substratın seçiciliği hakkında kanıtlar vardır. Otofagozomal membranın iç ve dış yüzeyinde bulunan LC3B-II, sekestre edilmiş proteinleri ayırmak için ubiquitin bağlayıcı bir alan içeren ubiquitin proteinleri ve LC3-etkileşimli bölgesini (LIR alanı) içeren P62 / SQSTM1 adaptör molekülü ile etkileşime girdiği düşünülmektedir.(101,107) P62'nin transkripsiyonel düzenlenmesi bir redoks algılama faktörü NRF2 tarafından kontrol edilir.(108) ALFY başka bir ubiquitin bağlayıcı protein, otofagozomda bulunan proteinleri sabitlemek için PI3P, p62 ve Atg5'e bağlanır.(109) 2 LIR domeni ve bir ubiquitin bağlama bölgesine sahip mayalardaki Atg19 proteininin ortoloğu olan NBR1, protein agregatlarını p62'den bağımsız olarak alır.(110)

2.3.1.5. Otofagolizozomun oluşumu

Otofagozom, erken ve geç endozomlarla birleşerek amfizomu ve ardından lizozomla kaynaşp otolizozomu oluşturduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, otolizozomların sadece otofagozom ve lizozomun birleşmesi ile oluşması da mümkündür.(111) Bir Rab7 efektör proteini olan PLEKHM1, otofagozom ve

lizozomun HOPS kompleksi ve LC3 / GABARAP proteini ile füzyonunu düzenler.(112) HOPS kompleksi, HOPS bileşenleri, VPS33A ve VPS16'nın STX17 ile birlikte çöktürülmesiyle saptanır, otofagozomal SNARE, syntaxin 17 (STX17) ile etkileşiminde etkin rol oynayarak birleşime aracılık eder. Sürece aynı zamanda vezikül taşınmasında hayati bir rol oynayan membran bağlantılı proteinler olan SNARES aracılık eder.(113) Mikrotübüllerin birleşme işlemini de kolaylaştırması muhtemeldir. MFN2, presenilin, TECPR1, miyosin VI ve Tom1 ve DRAM1 gibi faktörlerin de otofagozom ve lizozom birleşimini desteklediği düşünülmektedir.(114)

2.3.2. Otofajinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal yolları

Otofajinin aktivasyonunda hücre içi strese yol açan tüm etkenlerin kendine özgü bir sinyal yolağı bulunmaktadır. Çalışmamızda sepsis ve açlıkla indüklenen otofaji ön planda ayrı olarak irdeleneceğinden bu yollar ayrıntılı olarak tartışılmayacaktır.

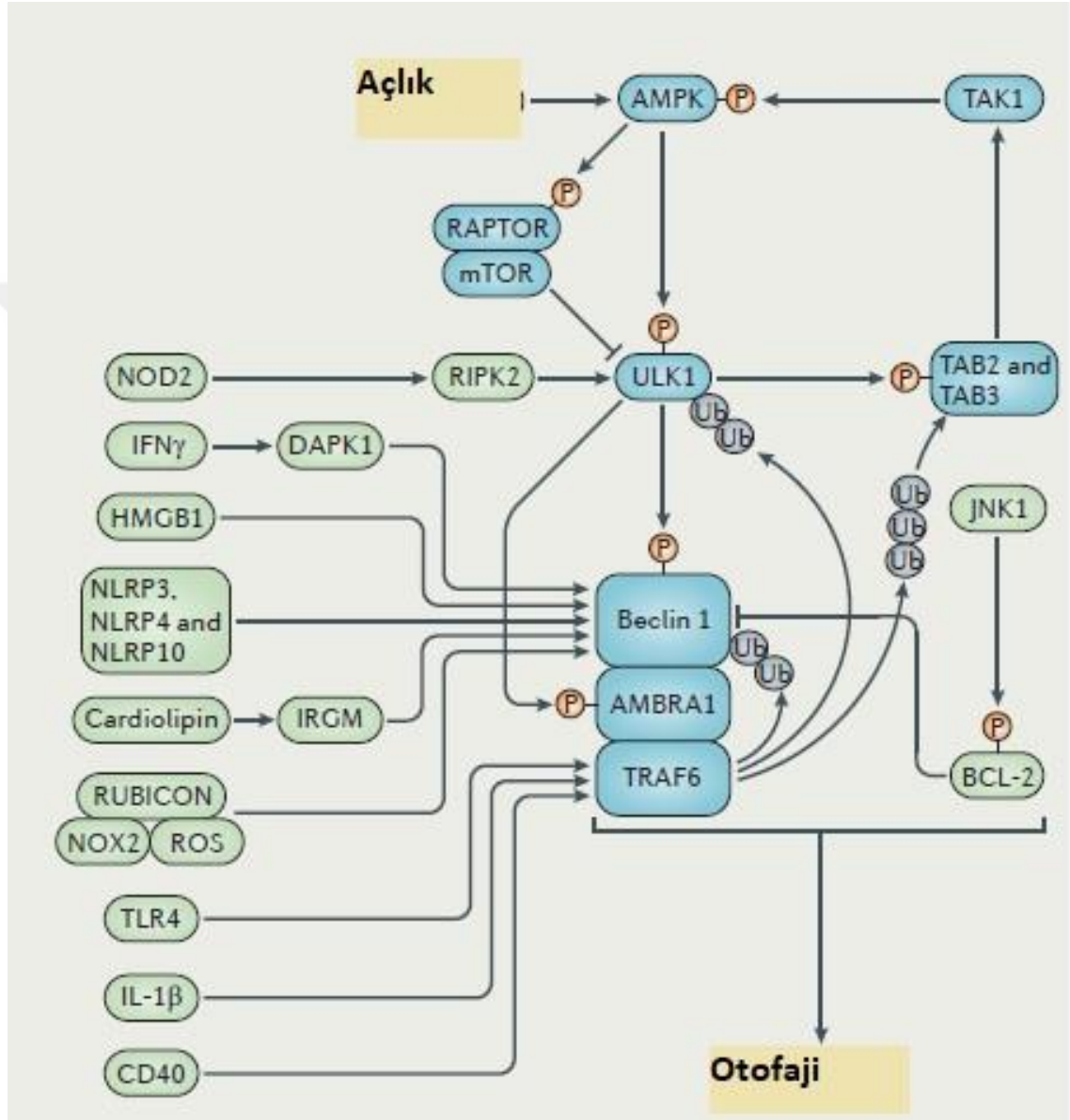
2.4. Otofaji sepsis ilişkisi

2.4.1.Sepsiste otofajinin aktivasyonu

Otofaji savunma mekanizması diğer bağışıklık sistemi patojen tanıma sistemleri ile iyi bir şekilde bütünleşmiştir. Patojen-ilişkili moleküler örnekler (PAMPs) ve hasarla ilişkili moleküler örneklerin (DAMPs) tanınmasından sorumlu örnek tanıma reseptörü (PRR) otofaji yolağını aktive etmektedir. Örneğin, TLR4'ün uyarılması, TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) tarafından E3 ligaz aracılığıyla beclin-1'in ubiquitin eklenerek ATG beclin 1'in aktivasyonuna yol açar. Ubikitin eklenen beclin-1, onun inhibitörü olan B hücreli lenfoma 2 (BCL - 2)'den ayrılarak aktive hale gelir.(115)

TRAF6 ayrıca ULK1'yi ubiquinite ederek aktive eder, böylelikle otofajinin tüm yollarında etkin role sahip olur. (116) TRAF6, ubiquinite ULK1 ve I kinB kinaz (IKK) TAK1 - bağlayıcı protein 2 (TAB2) ve TAB3 üzerinden kontrol sağlayarak

açlıkla aktive olan otofajide de rol oynar(66), bu ilişki aynı zamanda hipotezimizi destekleyen bir noktada doğal immunité ve açlığın benzer yollardan tetiklenerek etkileşim içerisinde olduklarını bize moleküler açıdan sunmaktadır.



Kaynak: Deretic V, Saitoh T, Immunology SA-NR, 2013 undefined. Autophagy in infection, inflammation and immunity. nature.com [Internet]. [cited 2019 Aug 16];(66)

Şekil 5:Sepsiste otofaji aktivasyonu yolları

DNA kompleksleri, ATP ve HMGB1 gibi DAMP molekülleri ayrıca otofajiyi aktive etmektedir. HMGB1 BCL-2'nin beclin-1'den ayrılmasını sağlayarak aktive

olmasına yardımcı olur, hücre dışında de hücre zar yüzeyindeki gelişmiş glikasyon son ürünleri için reseptör (RAGE) ile etkileşerek otofajiyi aktive eder.(117–119)

İnflamatuar sitokinler de otofajinin aktivasyonunda rol oynarlar. Gerçekten de, pro-inflamatuar sitokin IL-1 tarafından otofajinin uyarılması, enfekte makrofajlarda Mycobacterium tuberculosis'in kontrolü için çok önemlidir. IL-1 β , İnterlökin 1 resptörü (IL-1R) aracılığıyla TRAF6 ve beclin-1 aracılığıyla etkileşimini sağlar.(120)

T helper1 lenfositleri (TH1) kaynaklı interferon γ (IFN γ) gibi sitokinler de efektör hücrelerde otofajiyi indükler; örneğin, bu sitokinler, mikobakteri enfeksiyonuna karşı direnç göstermelerini sağlamak için makrofajlarda otofajiyi indükler. IFN γ , hem bağışıklık ile ilişkili GTPazların fonksiyonu yoluyla hem de Thr119'un BH3 alanındaki ölüm ilişkili protein kinaz 1 (DAPK1) aracılığıyla beclin 1'in fosforilasyonu yoluyla otofajiyi aktive edebilir. Bu, beclin 1'in inhibitör BCL- 2' den ayrılması ve aktivasyonu ile sonuçlanır.(121–123)

Fare makrofajlarından farklı olarak insan makrofajlarında IFN γ , antimikobakteriyel otofajik aktiviteleri indüklemek için 1,25 - dihidroksivitamin D3 (kalsitriol olarak da bilinir) ile etkileşmektedir.(124) Benzer şekilde, tümör nekroz faktörünün (TNF), Shigella spp. ve Listeria spp. gibi hücre içi bakterileri sınırlamak için otofajiyi uyardığı gösterilmiştir.(125)

Aksine, IL -4 ve IL - 13 gibi TH2 lenfositleri ile ilişkili sitokinler, otofajiyi inhibe eder. Otofajinin IL-4 ve IL-13 tarafından inhibe edilmesine yol açan sinyalleme yolları içeriğe bağlıdır: otofaji açlık ile indüklendiğinde AKT sinyallemesi yoluyla meydana gelir ve AKT bağımsızdır, fakat otofaji IFN γ tarafından indüklendiğinde sinyal transdüseri ve aktivatörü transkripsiyon 6(STAT6)'ya bağımlıdır. (126) IL - 10 ayrıca AKT sinyalleri yoluyla otofajiyi de inhibe edebilir. Ayrıca, IL-6 dahil çeşitli sinyalleri ileten STAT3, otofajiyi inhibe edebilir. Bu inhibe edici yol, transkripsiyonel sinyalleme içermez, bunun yerine sitoplazmik STAT3'ün protein kinaz R'ye (PKR; IFN ile indüklenmiş çift iplikli RNA-aktifleştirilmiş protein kinaz olarak da bilinir) bağlanmasını içerir. STAT3, SH2 alanı boyunca PKR ile etkileşime girer ve onu inhibe

eder. Bu, PKR'nin ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2a'nın (EIF2a; ayrıca EIF2S1 olarak da bilinir) hiperfosforilasyonu ve ardından hücrel ve viral protein sentezinin inhibisyonu yoluyla otofajiye kolaylaştırmasını önler.(127)(128)

Reaktif oksijen türleri (ROS), immün iletişimde önemli rol oynayan klasik antimikrobiyal efektörlerdir. ROS ve onları oluşturan oksidazlar otofajiye etkiler. NADPH oksidaz ve otofaji yolağı, beclin 1 ve PtdIns3 kinaz katalitik alt-birimi VPS34 ile etkileşime giren etki alanı 1 ile etkileşime giren ve sistein bakımından zengin protein içeren bir protein (RUBICON) olarak bilinen bir otofaji düzenleyici protein ile bağlanır. Fiziksel olarak otofaji inhibitör kompleksinden ayrılarak ve NADPH oksidaz aktive edici kompleks ile birleşerek, RUBICON bu iki mekanizmanın aktivasyonunun aynı anda gerçekleşip gerçekleşmediği bilinmese de, iki bakteri öldürücü mekanizmayı (yani, otofaji ve ROS üretimi) aktive eder. Nitrik oksit, Jun N - terminal kinaz 1'i (JNK1) ve IKKβ'yı doğrudan S nitrozilasyonu ile etkisiz hale getirerek otofajiye inhibe eder. Bu, JNK1'e bağlı BCL - 2 fosforilasyonunu ve beclin 1'den BCL-2 ayrışmasını önler ve IKKβ ile ilişkili AMPK'ya bağlı otofaji başlangıcını inhibe eder.(128–130)

Otofaji ve immün sinyal arasındaki bağlantılar şaşırtıcı derecede karmaşık görünmektedir. Evrimsel bir bakış açısına göre, bu bağlantılar otofajinin birden fazla immün düzenleyici sistemle iç içe oluşunu yansıtmaktadır.(66)

2.4.2.Sepsiste otofajinin kinetiği

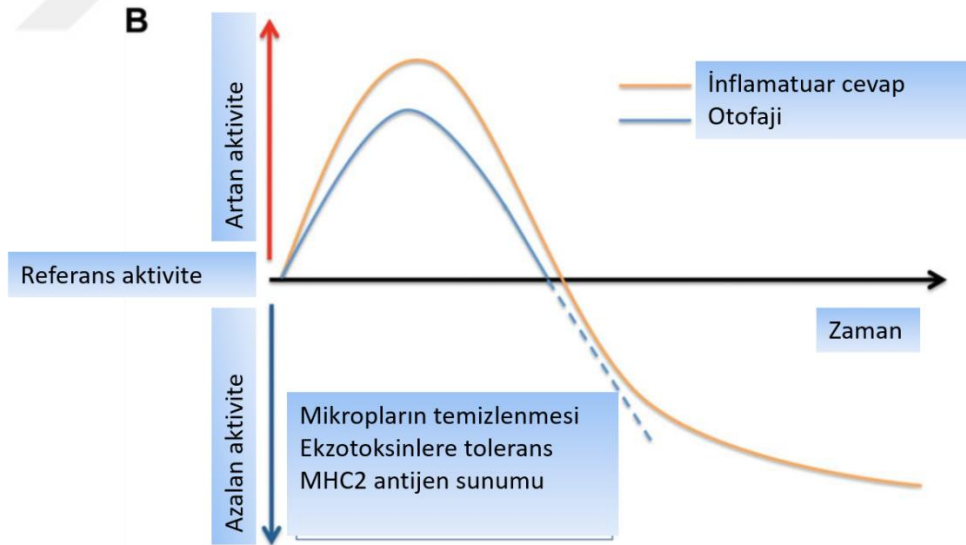
Sepsis, başlangıçta fazla miktarda pro-inflamatuar sitokinlerin üretildiği hiperdinamik faz ve bunu immünosupresyonun izlediği hipodinamik faz olarak adlandırılan iki faz özelliği göstermektedir. Biriken kanıtlar, sepsisin hiperdinamik fazı sırasında da benzer şekilde otofajik aktivitenin arttığını ve ardından aktivitesinde azalma olduğunu göstermektedir.(131–133)

C56BL / 6 farelerinin kullanıldığı çekal ligasyon ve ponksiyon (CLP) kaynaklı peritonit, sepsisin en yaygın kullanılan hayvan modelidir. CLP'den sonraki ilk 4 ila 6

saat boyunca, hepatositler ve kardiyomiyositlerde artan sayıda otofagozomun eşlik ettiği, oldukça yüksek bir LC3-II: LC3-I oranı (otofaji indüksiyonunun bir işareti) gösterilmiştir. Bununla birlikte, otolizozom sayıları 8 saatten itibaren azalmakta ve yerini SQSTM1 / p62 reseptör proteinlerinin birikimine bırakmaktadır.(134)

Farelere bir otofaji akış modülatörü olan karbamazepinin uygulanmasıyla dokularda LC3-II, RAB7 miktarlarında artış ve SQSTM1 reseptör proteinlerinin miktarında azalmaya sebep olduğu görülmüş, bu durumun hayatta kalma oranının arttırdığı izlenmiştir.

Kalp ve dalakta, sepsiste başlangıçta LC3-II: LC3-I oranının artmasıyla aynı otofajik kinetik paterni izlenir ve bunu takiben 24 saat sonra bir düşüş gözlenir. Bununla birlikte, immünosüpresyonla ilişkili olarak otofajik depresyonun ortaya çıkması aydınlatılması gereken konulardan biridir.(135)



Kaynak: HO, Jeffery, et al. Autophagy in sepsis: degradation into exhaustion?. Autophagy, 2016, 12.7: 1073-1082.(136)

Şekil 6: Otofajinin aktivasyonunun zaman içindeki değişimi

LC3 proteininin yeşil floresanla işaretlendiği transgenik farelerin yapılan çalışmasında LC3 puncta'nın sayısı, CLP sonrası karaciğerde, kalpte ve dalakta 6

saatte önemli ölçüde artarak zirve pikine ulaşmaktadır. LC3, CLP'den sonra 24. saate dek karaciğerde lizozom ilişkili membran proteini 1(LAMP1) ile birleşir ve bu durum otofajik işlemin, en azından otofagozom lizozom füzyon aşamasına kadar tamamlandığını gösterir. Yapılan çalışmalarda SQSTM1 ekspresyonunun 24 saate kadar 3 kat artışı gösterilmiştir.(135) Ancak kalpte otofagozomların birikimi izlenmektedir, otofagozom lizozom füzyonunda inhibe edici bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bu hipotezi destekleyen bir çalışmada, CLP sonrası indüklenen sepsis sonrası farelerden alınan sol ventrikülün elektron mikroskopi analizi çok sayıda otofagozom, sadece birkaç otolizozom görülmüştür. Ek olarak, kalp dokusunda LC3'ün LAMP1 ile birleşimi, septik farelerde 24 saatte% 60 oranında azalmıştır. Bu veriler sepsisin otofaji üzerine etkisinin dokuya bağlı olabileceğini düşündürmektedir.(137)

Sepsiste otofajik kinetik üzerine hayvan çalışmaları yapılmıştır. Fakat birçok çalışma ilk 24 saatte tamamlanmıştır; hiçbir çalışma 48 saat ve ötesine bakmamıştır. Geç evrede otofajinin baskılanması, sepsis hayvan modellerinde ölümcül bir etki gösterir ve bu durum sepsisin klinik sonucunun belirlenmesinde akut fazdan daha önemli olabileceğini gösterir.(135) Gecikmiş otofajik aktivitenin baskılanması lökositlerin apoptozisine katkıda bulunabilir ve bu nedenle mikrobiyal yanıtlara cevap vermemeye ve latent kalmış virüslerin aktivasyonuna yol açabilir.(138) Otofaji genlerini yok etmek, atg5-/- farelerde dolaşımdaki T ve B lenfosit sayısını önemli ölçüde azaltır ve CD4C ve CD8C T hücrelerini uyaranlara yanıt vermez hale getirir. Otofaji ve apoptoz da ortak moleküler düzenleyicileri paylaşır ve bu iki mekanizmanın antagonistik çalıştığı düşünülmektedir.(139) Bu hipotezi destekleyen bir çalışmada, interferon düzenleyici faktör 1 (IRF1) ile otofajinin inhibe edilmesinin, dalak makrofajlarında apoptozisi aktive ettiği gösterilmiştir.(140)

Fizyolojik olarak, otofajinin aktivasyonu, biriken otofagozomların hücrelerden atılmasına yol açarak proinflamatuvar bir tepkiye yol açabilir. Ek olarak, işlevi bozulan mitokondri, otofaji kaskadındaki bozulma ile doğru şekilde elimine edilemediği görülmüştür. (141)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen hayatlarının dört-sekiz haftalarında (adölesan dönem) ve ortalama ağırlıkları 90-130 gr olan Wistar albino cinsi 58 adet erkek sıçan kullanıldı.

Tüm sıçanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 20–22 °C oda sıcaklığında ve %40-60 nisbi nem makroçevre koşullarında ve standart sıçan kafeslerinde barındırıldı. Dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pelet yem ile “ad libitum ” beslendi. Çalışma boyunca her gün aynı saatte, vücut ağırlık değişimlerinin belirlenmesi amacıyla, ağırlıkları tartıldı ve not edildi.

Deney süresince, hayvan hakları ile ilgili olarak “National Institute of Health (NIH)/ABD” tarafından belirlenen kriterler esas alındı. Herhangi bir nedenle deneye devam edemeyecek ya da deneyler bitmeden yaşamı sonlanacak olan denekler, deney ve istatistik kapsamından çıkarıldı.

3.2. Lipopolisakkarit ile endotoksemi modelinin oluşturulması

Deney protokolüne uygun olarak 0. saatte 3 mg/kg/doz LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 055: B5, Sigma, Cat #: L2880) intraperitoneal verilmesi ve placebo olarak %0,9 NaCl solüsyonu kullanılması tasarlandı.

Sıçanlarda hipoteze yönelik “orta hastalık aktivitesi” oluşturulması planlandı; septik şoktan kaçıldı ve mortalite oranlarının %40'ı geçmemesi hedeflendi. Bu nedenle referans kaynak olarak *Schlag G, Redl H. Pathophysiology of Shock, Sepsis, and*

Organ Failure s:1019-1030 kullanıldı ve mortalite oranını değerlendirmek için ön çalışma yapılarak doz etkinliği kontrol edildi.(142)

Sıçanlarda hastalık aktivitesini değerlendirmek için günlük tartı kaybı yüzdesi, yem ve su tüketimindeki azalma, ateş izlemi, stres bulgularının değerlendirildiği davranış skorlamaları kullanıldı. Her grup sıçanın on tanesi 48 saat sonra sakrifiye edilerek intrakardiyak kan ve gastrokinemius kas dokusunda otofaji belirteçleri immunblot ve protein elektroforezi yöntemleri ile çalışıldı.(143)

3.3. Beslenme izlemi ve kalori alımının değerlendirilmesi

Ön çalışmada sıçanlar “ad libitum” beslendi ve “normokalori referans değeri” 3 günlük izlem sonucu oluşturuldu. Deney sonucunda ortalama yem tüketimi:18.8 gr (15-20 gr) ortalama su tüketimi:32 ml (30-40 ml) Ortalama kalori tüketimi:54 kcal (50-60 kcal/gün) olarak bulundu. Hayvanların dışkı tüketimi hastalık döneminde de devam edeceğinden değerlendirmeye alınmadı. Sıçanlara ayrılık stresi yaşatmamak için standart sıçan kafeslerinde barındırılacak hayvanların tükettiği yem miktarının günlük ölçülerek her sıçan için ortalamasının alınması ve normokalori değerine göre tamamlanması hedeflendi.

3.4. Deney hayvanları grupları

Grup I(n=9): İntraperitoneal salin solüsyonu uygulanarak “ad libitum” beslenmeye bırakılan ve 48. Saatte sakrifiye edilen kontrol grubu

Grup II (n=14): İntraperitoneal LPS uygulanması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen grup

Grup III(n=14): İntraperitoneal LPS uygulanması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen ve günlük yem alımları takip edilerek ek beslenme takviyesi alan grup

3.5. Ön çalışmada sağlıklı dönem/endotoksemi dönemi beslenme miktarı ve LPS dozunun etkinliğinin belirlenmesi

Ön çalışma tasarlanarak sıçanların sağlıklı dönemde ve endotoksemi modeli sonrası tükettiği yem miktarının belirlenmesi amaçlandı. Bunun için ön çalışma için talep edilen hayatlarının dört-sekiz haftalarında (adölesan dönem) ve ortalama ağırlıkları 90-130 gr olan Wistar albino cinsi 3 adet erkek sıçan 17 gün boyunca standart sıçan kafeslerinde barındırıldı. Çalışmanın birinci, dördüncü ve yedinci günlerinde 24 saat metabolizma kafesinde “ad libitum” beslenme ile takip edilerek yem, su tüketimi ve idrar çıkışı belirlendi. Bu değer “normokalori referans değeri” olarak kabul edildi. Ön çalışmanın 7. Gününde üç adet sıçana 3 mg/kg/doz LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 055: B5, Sigma, Cat #: L2880) intraperitoneal yoldan uygulanmış ve uygulamanın 0-24. Saatlerinde ve 144-168. Saatlerinde metabolizma kafes izlemi “ad libitum” beslenme ile takip edilerek yem, su tüketimi ve idrar çıkışı belirlenmiştir. Bu günler dışında öncesinde belirtildiği gibi sıçanlar standart sıçan kafeslerinde barındırılmış, günlük kilo ölçümü yapılmıştır.

Endotoksemi modeli oluşturulmasından sonraki 24. Saat içinde bir sıçan eksitus olmuş, dolayısıyla verileri çalışmaya dahil edilmemiştir. Diğer iki sıçan günlük kilo, davranış değişiklikleri skorlaması ve rektal ateş ölçümleri ile izlenmiştir.

Ön çalışma sonrası veriler değerlendirildiğinde mortalitenin istenen oranda (%33) olduğu görülerek çalışmada doz değişikliği yapılmaması kararlaştırılmıştır. Fakat yem tüketiminde özellikle LPS sonrası varyasyonların çok olduğu görülmüş; bunun uygulamanın etkinliğine göre değişebileceği ve metabolizma kafesinin stresinin sonuçları etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle sıçanlara ayrılık stresi yaşatmamak için standart sıçan kafeslerinde barındırılacak hayvanların tükettiği yem miktarının günlük ölçülerek her sıçan için ortalamasının alınması ve normokalori değerine göre tamamlanması planlandı. Böylelikle akut indüksiyon sonrası günler arası farklar da daha iyi değerlendirildi.

3.8. Örneklem büyüklüğünün hesaplanması

Örneklem büyüklüğü hesaplanırken birincil amaç olarak gastrokinemius kasında otofaji aktivitesinin değerlendirilmesi planlanarak referans literatürdeki çalışmada standart deviyasyon kontrol grubunda $0,7 \pm 2$, açlık sonrası $1,9 \pm 0,5$ bulundu.(143) Açlığın otofaji ile ilgili etki büyüklüğünü hesaplamak için bu değerler referans alındığında 2 bağımsız grup için etki büyüklüğü 3,1 olarak saptandı.

Çalışmada iştah azalması ve bu durumda otofajinin etkisi 3 grupta değerlendirilmesi planlandı. F testi ile değerlendirilmesi için etki büyüklüğünün minimum 0.8 olacağı öngörüsü ile %80 güç ve %95 güven aralığında hesaplandı ve her bir grubun en az 6 sıçan kalacak şekilde tasarlanması planlandı. (mortalite %30-40 olması nedeniyle her grupta 7 sıçan olması uygundur)

Sekonder amaç olan mortalite oranlarının izlemi için ikinci güç analizi yapılmadı. Araştırma sonucunda mortalite ve survival amacıyla gözlenen veriler sonrası güç analizi yapılması planlandı. Bu nedenle örneklem büyüklüğü aynı sayıda sıçanla planlandı.

3.9. Deney protokolü ve deney hayvanlarının izlemi

Sıçanlar gruplara randomize olarak dağıtılmış ve deney protokolü hazırlanmıştır. Deney protokolü ayrıntılı olarak Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7:Deney Protokolü

KONTROL GRUBU(n:7)	LPS+SF GRUBU(n:14)		LPS+MAMA DESTEĞİ GRUBU(n:14)	
N:7 sıçan	N:7 sıçan	N:7 sıçan	N:7 sıçan	N: 7 sıçan
0. Saat: %0.9 NaCl ile i.p. enjeksiyon	0. Saat: 3 mg/kg LPS ile i.p. enjeksiyon	0. Saat: 3 mg/kg LPS ile i.p. enjeksiyon	0. Saat: 3 mg/kg LPS ile i.p. enjeksiyon	0. Saat: 3 mg/kg LPS ile i.p. enjeksiyon
30. dk, 2. Saat, 4. Saat, 8. Saat, 12. Saat, 24. Saat ve 48. Saat davranış skorlaması	30. dk, 2. Saat, 4. Saat, 8. Saat, 12. Saat, 24. Saat ve 48. Saat davranış skorlaması	30. dk, 2. Saat, 4. Saat, 8. Saat, 12. Saat, 24. Saat ve 48. Saat davranış skorlaması, ardından günlük davranış skorlaması	30. dk, 2. Saat, 4. Saat, 8. Saat, 12. Saat, 24. Saat ve 48. Saat davranış skorlaması	30. dk, 2. Saat, 4. Saat, 8. Saat, 12. Saat, 24. Saat ve 48. Saat davranış skorlaması, ardından günlük davranış skorlaması
0-2-4-6-12-24-48. saat ateş ölçümü	0-2-4-6-12-24-48. saat ateş ölçümü	0-2-4-6-12-24-48. saat ateş ölçümü, ardından günlük ölçüm	0-2-4-6-12-24-48. saat ateş ölçümü	0-2-4-6-12-24-48. saat ateş ölçümü, ardından günlük ölçüm
0-6-12-24-48. saat tartı ölçümü	0-6-12-24-48. saat tartı ölçümü	0-6-12-24-48. saat tartı ölçümü, ardından günlük ölçüm	0-6-12-24-48. saat tartı ölçümü	0-6-12-24-48. saat tartı ölçümü, ardından günlük ölçüm
Günlük yem ve su tüketimlerinin değerlendirilmesi	Günlük yem ve su tüketimlerinin değerlendirilmesi	Günlük yem ve su tüketimlerinin değerlendirilmesi	Günlük yem ve su tüketimlerinin değerlendirilmesi	Günlük yem ve su tüketimlerinin değerlendirilmesi
Beslenme fizyolojik	Beslenme fizyolojik+orogastrik sonda ile salin solüsyonu verilmesi	Beslenme fizyolojik+orogastrik sonda ile salin solüsyonu verilmesi	Beslenme fizyolojik+orogastrik sonda ile ek sıvı mama desteği	Beslenme fizyolojik+orogastrik sonda ile ek sıvı mama desteği
48. saatte sakrifikasyon+gastrokinemius kası ve kan örneği alınması	48. saatte sakrifikasyon+gastrokinemius kası ve kan örneği alınması	14 günlük mortalite izlemi ve sakrifikasyon	48. saatte sakrifikasyon+gastrokinemius kası ve kan örneği alınması	14 günlük mortalite izlemi ve sakrifikasyon
Örneklerin sıvı azot içinde ve kuru buz üzerinde İBG ye ulaştırılması	Örneklerin sıvı azot içinde ve kuru buz üzerinde İBG ye ulaştırılması		Örneklerin sıvı azot içinde ve kuru buz üzerinde İBG ye ulaştırılması	

3.9.1.Sıçanların orogastrik sonda ile beslenmesi

Sıçanların kalori desteğini sağlamak amacıyla sıvı mama desteği verilmesi planlandı. Özel olarak üretilen sıvı mamanın formülasyonu Rodent Liquid Diet, AIN-76 referans alınarak total kalorisi 1000 kcal/lı içeriği protein %24, karbonhidrat %62, yağ %5, Selüloz %5 ve Ham kül %4 olacak şekilde hazırlandı.

Kontrol grubundaki sıçanların beslenmesine ek müdahalede bulunulmadı, LPS uygulanan iki grup arasında hidrasyon farkını azaltmak ve nazogastrik uygulamanın yarattığı stresi eşitlemek için beslenme desteği verilmeyen sıçanlara 4-6 öğün orogastrik sonda uygulanarak enjektör yardımıyla aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Beslenme desteği verilmesi planlanan sıçanların genel durumuna göre günde 4-6 öğünde aynı işlemde 0,5 ml-1 ml arası sıvı mama verilerek en nütisyon ve kalori desteği sağlandı.

Resim 1: Sıçanların orogastrik yoluyla mama ile beslenmesi



Sıçan ve farelerin günlük diyetlerinin %50 sini çekal dışkı oluşturur. Bu sayede K ve B grubu vitaminlere ihtiyaç duymazlar. Sıçan yavrularının hepsi aynı koşullarda

bakılacağı için ve besin alımının azlığında yine diyetlerinde dışkı yemeye devam edecekleri için; gruplar arasında spesifik vitamin ve mineral eksikliği ve enerji eksikliği yaratmayacağı öngörülerek sonuçları etkilemeyeceği hesaba katıldı.

3.9.2 Deney Hayvanlarında Yüzde (%) Vücut Ağırlık Oranının Tespiti

Tüm gruplardaki sıçanların % vücut ağırlığı değişimlerinin tespit edilmesi amacıyla deney süresince her gün aynı saatte sıçanların vücut ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Sıçanların günlük vücut ağırlıkları ile deney başlamadan önceki ağırlıkları oranlanarak, % vücut ağırlığı değişimleri günlük olarak hesaplandı ve kayıt edildi.

3.9.3 Deney hayvanlarında günlük yem ve su tüketiminin ölçülmesi

Sıçanların nokturnal aktif canlılar olması nedeniyle yem ve su tüketimlerini objektif değerlendirmek amacıyla her gün aynı saatte yem ve su tüketimleri ölçüldü.

3.9.4. Sıçanlarının vücut ısılarının ölçülmesi

Sıçanların vücut ısıları ölçümleri iki farklı ölçüm tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Hayvan refahını arttırmak için yapılabilen her ölçüm infrared ile yapılmış, infrared termometrenin ölçüm yapamadığı durumlarda dijital termometre ile ölçüm yapılmıştır. Bazı durumlarda ise her ikisiyle de ölçüm gerçekleştirilmiştir. Deneye başlamadan önce aynı sıçanların vücut ısıları yakın aralıklarla hem infrared hem de rektal termometre ile ölçülerek lineer regresyon analizi yapılmış, infrared termometre ile ölçülen değerler bu formül kullanılarak düzeltilmiştir.

Düzeltilmiş rektal vücut ısıları değeri: $17,5526 + 0,5474 * \text{Infrared vücut ısıları değeri}$

Resim 2: Sıçanların rektal ve infrared termometre yardımı ile vücut ısılarının ölçülmesi



3.9.5 Sıçanların sepsis bulgularının skorum sistemi ile değerlendirilmesi

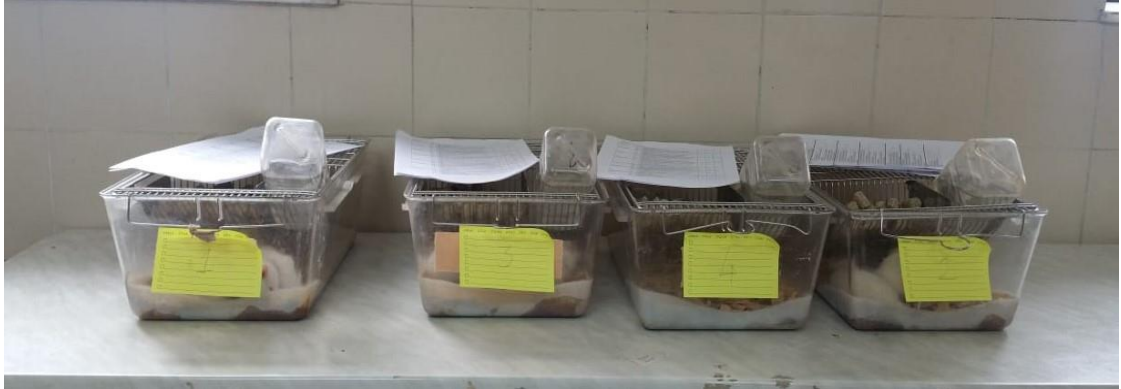
Tüm sıçanların sakrifikasyon zamanına kadar izleminde iyilik hallerini kantitatif olarak da değerlendirebilmek amacıyla iki farklı sepsis davranış skoruması kullanıldı. Her iki skorum referans makalelerden alınarak çevrilmiş ve Tablo 8 ve 9’da ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Sepsis bulgularını tanımlamak için kolay ve pratik bir yöntem olması nedeniyle 1. Skor seçildi; LPS uygulandıktan sonra orogastrikle serum fizyolojik ya da mama desteği verilen gruplar arası farkları değerlendirebilmek için de daha ayrıntılı olan 2. Skorlama da dahil edildi.

Literatürde 1. Skorlama için önerilen izlem aralıkları 2. Saat, 4. Saat, 12. Saat ve 48. Saat iken; 2. Skorlama sistemi için 12 saate dek 2 saatte bir, 12. Saat sonrası için saat başıdır. Deney hayvanları laboratuvarı kısıtlılıkları ve iş yükü de göz önünde bulundurularak her iki sepsis skoru aynı saatlerde değerlendirildi ve sepsis bulgularının gözlemsel olarak pik yaptığı ve ölümlerin de gerçekleştiği dönem olan 6-8 saat içinse 8. Saat skorlaması protokole eklendi.(144,145)

Grupların sepsis skorlaması yapılırken kafesler numaralandırılarak randomize edildi, randomize eden gözlemci ve kör 2 gözlemci tarafından aynı anda değerlendirilerek ortak puanda karar kılındı. Böylelikle skorlamada görecelilik azaltıldı.

Resim 3: Grup kafeslerinin randomize edilmesi



Tablo 8:Sepsis Skorlaması 1

	Zaman*	Puan**
Piloereksiyon		
Pitozis		
Letarji		
Toplanma Hareketi		
Toplam Puan		
*: Skorlama 30. Dk, 2. Saat, 4. Saat, 12. Saat, 24. Saat ve 48. Saat olarak önerilmiştir. 8. Saat protokole eklenmiştir.		
**: Bulgunun olması 1 puan, bulgunun gözlenmemesi de 0puan olarak değerlendirilmektedir.		

Kaynak: Kolmogorova D, Murray E, Ismail N. Monitoring Pathogen-Induced Sickness in Mice and Rats. Curr Protoc Mouse Biol. 2017; (144)

Tablo 9:Sepsis skorlaması 2

Parametreler	Skorlama	
Görünüm	0	Kürk yumuşak
	1	Kılların bir tutamı piloerekte
	2	Sırtın çoğu piloerekte
	3	Piloereksiyon var veya yok, sıçan kabarık görünümlü
	4	Piloereksiyon var veya yok, sıçan zayıflamış görünüyor
Bilinç düzeyi	0	Aktif
	1	Aktif, fakat dik durmaktan kaçınıyor
	2	Sıçanın aktiviteleri fark edilebilir şekilde yavaşlamış, hala gezinmekte
	3	Aktivite etkilenmiş, sıçan sadece provake edildiğinde hareket ediyor, hareketlerinde tremor gözleniyor
	4	Aktivite belirgin şekilde etkilenmiş, sıçan provake edildiğinde sabit kalıyor, tremor gözlenebilir
Aktivite	0	Normal miktarda aktivite gözleniyor. Sıçan yemek yiyor, su içiyor, tırmanıyor, koşuyor, kavga ediyor vb.
	1	Hafif azalmış aktivite, sıçan kafes zemininde geziniyor
	2	Aktivite baskılanmış, sıçan aralıklı araştırma hareketleri dışında hareketsiz
	3	Aktivite yok, sıçan sabit duruyor
	4	Aktivite yok, sıçanda özellikle arka bacaklarda tremor gözleniyor

Uyarıya yanıt	0	Sıçan sesli uyarıya veya dokunmaya hemen karşılık veriyor
	1	Sesli uyarıya yavaş tepki veriyor veya vermiyor, dokunmaya hızlı tepki veriyor(kaçmaya çalışıyor)
	2	Sesli uyarıya tepki yok, dokunmaya orta derecede tepki veriyor (birkaç adım atıyor)
	3	Sesli uyarıya yanıt yok, dokunmaya hafif tepki veriyor (hareketlenme yok)
	4	Sesli uyarıya tepki yok. Dokunmaya çok az tepki var ya da yok. İtince kendini düzeltemez
Gözler	0	Açık
	1	Gözler tam açık değil, olasılıkla sekresyon birikmiş
	2	Gözlerin en az yarısı kapalı, olasılıkla sekresyon birikmiş
	3	Gözlerin yarıdan fazlası kapalı, olasılıkla sekresyon birikmiş
	4	Gözler kapalı ve/veya bol sekresyonlu
Solunum hızı	0	Normal hızlı sıçan solunumu
	1	Hafif yavaşlamış solunum (solunum hızı gözle sayılamaz)
	2	Orta düzeyde azalmış solunum (gözle sayılabilen solunumun üst aralığında)
	3	Ciddi düzeyde azalmış solunum (solunum hızı kolaylıkla sayılabilir, soluklar arası 0.5 sn)
	4	Çok ciddi düzeyde azalmış solunum (soluklar arası 1 saniyeden fazla)
Solunumun kalitesi	0	Normal
	1	Kısa süreli zorlu soluklar
	2	Solunum zorlu, gasping yok
	3	Solunum zorlu, aralıklı gasping mevcut
	4	Gasping
Toplam		

Kaynak:Shrum B, Anantha R V, Xu SX, Donnelly M, Haeryfar SMM, McCormick JK. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. 2014;1–11. (145)

3.9.6. Sıçanların izlemi ve doz değişimi ile protokolün yeniden oluşturulması

İzlemde 3mg/kg/doz LPS uygulanan sıçanlarda mortalite oranının ve sepsis bulgularının beklenenden fazla olması nedeniyle 8. Saatte deney sonlandırılarak mortalite izlemi için 14 gün izlemi planlanan sıçanlar dahil olmak üzere 19 sıçan kurban edilmektedir kas ve kan dokuları alındı.

Doz redüksiyonuna gidilerek 1,5 mg/kg/doz LPS kullanılması planlanarak deney protokolü yeniden oluşturuldu. Önceki grupta 8. Saatte sepsis bulgularının pik yaptığı gözlenerek davranış skorlamasına 8. Saat eklendi. İntraperitoneal enjeksiyonlar sonrası sıçanlar aynı izlem protokolü kullanılarak 48 saat izlendi, ex olanlar çalışmadan çıkarıldı.

Otofaji aktivasyonunun en iyi gözlendiği 48. saatte sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilerek, intrakardiyak kan örneği ve kas dokusu temin edildi. Çalışmada yüksek ve orta dozun birbiriyle kıyaslanması da planlanarak doku örneği alınan tüm sıçanlar çalışmaya dahil edildi.

Mortalite izlemi yapılan grubun 48. Saat sonra beslenme ve serum fizyolojik desteği kesilerek 12 gün boyunca günlük kilo alımları, yem ve su tüketimleri, rektal ve infrared ateş ölçümleri ve davranış skorlamaları yapıldı. 14. günün sonunda sıçanlar sakrifiye edildi.

Sakrifikasyon sonrası otofaji belirteçlerinin dokuda ve kanda çalışılması için kan ve doku örneği sıvı azotta hızla dondurularak İBG Sinir Bilimleri Laboratuvarına transport edildi.

Çalışma sonrası deney grupları toplam 9 grup olacak şekilde aşağıdaki gibi düzenlendi:

Ön çalışma grubu (n=3): Yem ve su tüketimleri izlenen, sonrasında 3 mg/kg/doz LPS intraperitoneal uygulandıktan sonra 10 gün izlenen ön çalışma grubu

Grup I(n=9): İntraperitoneal salin solüsyonu uygulanarak “ad libitum” beslenmeye bırakılan ve 48. Saatte sakrifiye edilen kontrol grubu

Grup II (n=7): İntraperitoneal 3 mg/kg/doz LPS uygulaması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen, orogastrik sonda ile salin verilen, 48.saate sakrifiye edilmeis plananan fakat 8. Saatte sakrifiye edilen endotoksin grubu

Grup III(n=7): İntraperitoneal 3 mg/kg/doz LPS uygulaması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen, orogastrik sonda ile salin verilen ve mortalite izlemi planlanan fakat 8. Saatte sakrifiye edilen endotoksin grubu

Grup IV(n=7): İntraperitoneal 3mg/kg/doz LPS uygulaması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen, orogastrik sonda ile ek sıvı mama takviyesi alan, 48.saate sakrifiye edilmesi planlanan fakat 8. Saatte sakrifiye edilen endotoksin grubu

Grup V(n=7): İntraperitoneal 3 mg/kg/doz LPS uygulaması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen, orogastrik sonda ile ek sıvı mama takviyesi alan ve mortalite izlemi planlanan, fakat 8. Saatte sakrifiye edilen endotoksin grubu

Grup VI (n=7): İntraperitoneal 1,5 mg/kg/doz LPS uygulaması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen, orogastrik sonda ile salin verilen, 48.saate sakrifiye edilen endotoksin grubu

Grup VII(n=7): İntraperitoneal 1,5 mg/kg/doz LPS uygulaması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen, orogastrik sonda ile ek sıvı mama takviyesi alan, 48.saate sakrifiye edilen endotoksin grubu

Grup VIII(n=4): İntraperitoneal 1,5 mg/kg/doz LPS uygulaması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen, orogastrik sonda ile ek sıvı mama takviyesi alan ve mortalite izlemi yapılan endotoksemi grubu

Grup IX(n=3): İntraperitoneal 1,5 mg/kg/doz LPS uygulaması ile sepsis tablosu oluşturulan ve “ad libitum” beslenen, orogastrik sonda ile salin verilen ve mortalite izlemi yapılan endotoksemi grubu

İstatistiksel olarak verilerin tanımlanmasını ve değerlendirilmesini kolaylaştırmak adına 48. Saate dek aynı protokolün uygulandığı gruplar bir arada değerlendirildi.

3.10. Otofaji aktivitesinin değerlendirilmesi

Kan ve kas dokusunda immunblot ve protein elektroforezi yöntemleri ile otofaji ile ilişkili belirteçlerin tayini Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü'nde yapıldı.

3.10.1. Kan Örneklerinin Taşınması, Ayırma ve Saklama İşlemleri

Sıçanlardan kardiyak puncture ile alınan 5 ml kan örneği CPT tüplerde oda sıcaklığında 2 saat bekletildi ve örnekler, 30 dakika oda sıcaklığında 1800xg'de santrifüj edilip plazmaları ve mononükleer hücreleri ayrıldı. Ayrılan mononükleer hücrelere RIPA tamponu ile lizise uğratılarak mikro santrifüj tüplerine bölündü ve -80 °C'de çalışılacakları güne kadar saklandı.

3.10.2. Kas dokusu ve homojenizasyonu

Hayvanlardan elde edilen kas dokusu 1 ml RIPA tamponu içerisinde homojenizatör ile parçalandı ve homojenat 12.000xg hızda 10 dk santrifüj edilerek hücre lizatı elde edildi.

3.10.3. İmmünoblot yöntemiyle kaspaz-1, NLRP3 ve IL-1 β protein tayini

Her iki dokunun protein konsantrasyonu BCA protein analiz yöntemi ile belirlendi. Protein örnekleri % 10 sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) jel ile ayrımlandı. Daha sonra poliviniliden diflorür (PVDF) membranına transfer edildi ve transfer sonrası bloklama tamponunda enkübe edildi. Bu işlemten sonra örnekler gece boyunca 4°C'de beclin-1, LC3-I/LC3-II kaspaz-1, IL-1 β , NLRP3 ve aktin antikoruyla enkübe edildi. Kaspaz-1 enzimi ve IL-1 β sitokini için hem pro- formlarının hem de olgun formlarının tayin edilebileceği antikorlar kullanıldı. Yıkama aşamalarından sonra örnekler horse radish peroksidaz (HRP) ile işaretli sekonder antikor ile enkübe edildi ve yıkama aşamalarından sonra membran bir film kasedine aktarıldı. Görüntüleme için kemiluminesans yöntemine dayanan

ECL kiti kullanıldı ve görüntü jel dokümantasyon sistemi kullanılarak elde edildi. Band yoğunlukları dansitometrik olarak değerlendirildi.(146)

3.11. Araştırmada kullanılan istatistiksel yöntemler

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri “SPSS 24 for Windows” bilgisayar istatistik programı ile yapıldı.

Araştırmada her 3 grupta elde edilen veriler, kategorikse, sayı ve yüzde ile, ölçümle elde edilen veri için parametrik koşullar sağlanıyorsa ANOVA F test ve posthoc Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası farka karar verildi. Parametrik koşulların sağlanması kontrolünde Shapiro wilk test ile normal dağılıma uygunluk test edildi. Nonparametrik dağılım varsa, Kruskal Wallis test ve posthoc Dunn test uygulandı. Ayrıca sekonder amaç için yalnızca mortalite oranları değil, survival süreleri de Log rank test ile karşılaştırıldı. Tüm analitik değerlendirmelerde $p<0.05$ istatistik anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi.

3.12. Etik Kurul Onayı

Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneyisel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 03.04.2018 tarih ve 19 sayılı etik kurul onayı alındı.

4. BULGULAR

Çalışmada tüm gruplarda kullanılmak üzere teslim alınan sıçanların çalışma öncesi özellikleri Tablo 10'da görülmektedir. Kontrol grubu ve gruplar arası vücut ağırlığı, yüzey sıcaklığı ve düzeltilmiş yüzey sıcaklığı ölçümleri değerlendirildi ve anlamlı istatistiksel fark saptanmadı. Ortalama yem tüketimleri miktarı kontrol grubu ve gruplar arası karşılaştırıldı ve anlamlı istatistiksel fark saptanmadı.

Tablo 10: Sıçanların 0. saat verilerinin tanımlayıcı özellikleri

0. saat	Sıçan sayısı	Ortalama CI±%95	Standart sapma	Minimum	Maksimum
Vücut ağırlığı/gr	58	121,78 118,44-125,12	12,6	98,5	152,5
Yüzey sıcaklığı/°C	58	34,79 34,7-34,89	0,37	34,4	36
Düzeltilmiş yüzey sıcaklığı/°C	58	36,6 36,36-36,69	0,2	36,3	37,2
Ortalama yem tüketimi/gr	58	19,39 17,8-25,3	1,8	17	24,7
Ortalama su tüketimi/ml	58	30,6 28,59-32,72	7,8	18	46,6

4.1. Sıçanlarda Vücut Ağırlığı ve Yüzde (%) Değişimine Ait Bulgular

Sıçanlara deney protokolüne uygun olarak 0. Saatte intraperitoneal Serum Fizyolojik veya Lipopolisakkarit uygulanması sonrası 6. , 12. , 24. ve 48. Saatlerde ölçülen vücut ağırlıkları ve hesaplanan vücut tartı yüzde değişimleri bulguları tartışılacaktır.

Bu çalışmada elde edilen bağımlı değişkenlerin (y) çeşitli parametrelerden etkilendiği görülmüştür. Buna göre vücut ağırlığı ölçümlerini ele alırsak; ölçümler

sıçanın başlangıç kilosundan (β_0) , ölçülen zamandan (β_1 -Within efect), gruplama değişkeninden (β_2 -between effect) ve gruplama değişkeninin zamanla birlikte bileşik olarak oluşturduğu etkileşim etkisinden (β_3 -interaction effect) etkilenmektedir. Bu çalışmada da yapılan tekrarlayıcı varyans analizinde etkileşim etkisinin anlamlı düzeyde olması($p=0.001$) ve rezidüel değerlerin homojen dağılmaması nedeniyle veriler non-parametrik olarak kabul edilmiştir. Gruplar Friedman's 2 pair testi ile kendi içinde değerlendirilmiş ve düzeltilmiş p değeri kullanılarak tip 1 hata oranı azaltılmıştır. Anlamlı olan değerler sonrasında Kruskal Wallis testi ile gruplar arası değerlendirilmiştir.

Sıçanların vücut ağırlığı ölçümleri ve vücut ağırlığı değişim yüzdesi tüm grupların kendi içinde 0. Ve 6. Saat ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0.001$) Bu durumda tüm sıçanlar uygulama sonrası anlamlı derecede kilo kaybı yaşamıştır. Gruplar arası değerlendirmede ise vücut ağırlıkları ve tartı değişim yüzdeleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır. ($p=0,075$ ve $p=0,054$) Bu da intraperitoneal işlem uygulamasının doz ve içerik bağımsız şekilde başlı başına stres faktörü olduğunu göstermektedir.

0. , 6. , 12. , 24. Ve 48. Saat ölçümlerinin analizi kontrol grubu(Grup 1), 1,5 mg/kg LPS uygulandıktan sonra serum fizyolojik verilen gruplar (Grup 6+9) ve 1,5 mg/kg LPS uygulandıktan sonra mama ile beslenen gruplar(Grup 7+8) arasında yapılmıştır. Buna göre her grup kendi içinde değerlendirildiğinde sonuçlar Tablo 11'deki gibidir

Tablo 11: Sıçanların vücut ağırlığı ölçümlerinin Friedman's 2 pair analiz sonuçları

Kontrol grubu(Grup1)	0-12 saat ($p<0,05$) 12-24 saat($p<0,05$) 12-48 saat($p<0,001$) 6-48. saat ($p<0,05$) Diğer kombinasyonlarda $p>0,05$
1,5 mg/kg LPS+SF (Grup 6+9)	0-12 saat ($p<0,001$) 0-24 sa($p<0,001$)

	24-8 sa (p=0,01) Diğer kombinasyonlarda p>0,05
1,5 mg/kg LPS+mama(Grup 7+8)	0-12 sa(p<0,05) 0-24.sa(p=0,01) 24-48 sa(p<0,05) Diğer kombinasyonlarda p>0,05

Gruplar her saat için birbiriyle Kruskal Wallis testi ile kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (p>0,05) Her bir grubun ortalama, standart deviyasyon, minimum ve maksimum değerleri Tablo 12’de sunulmuştur.

Tablo 12: Gruplara göre Sıçanların Vücut Ağırlığı Değişimi

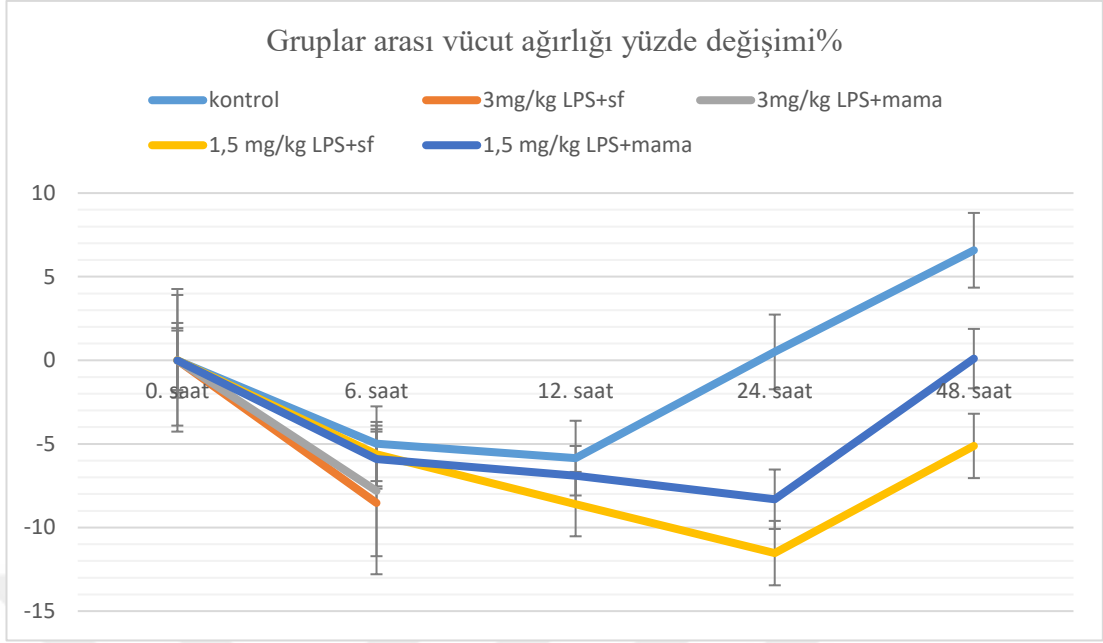
VÜCUT AĞIRLIĞI ÖLÇÜMLERİ (gr)					
Gruplar	0. saat	6.saat	12. saat	24. saat	48.saat
Kontrol	118,5±17,2 ^a 100-143 ^b	112,3±14,9 94-135	111,4±15,5 92,5-136	119±16, 7 101-142	125,8±15,2 108-149
3 mg/kg LPS+SF	121,8±12,2 107,5-152,5	114,6±11,5 100-140			
3 mg/kg LPS+mama	120,4±15 98,5-149	112,6±13,4 99,5-139			
1,5 mg/kg LPS+SF	123,9±10,1 107-137	116,7±7,4 104-124	114,2±8 100-122	110,8±1 2,8 87-133	118,9±12,9 91,5-134
1,5 mg/kg LPS+mama	124,1±8,7 108-138,5	116,9±10 97-131	114,4±8,7 97-127	112,7±8, 2 103-125	122,6±10 112,5-139
^a : Ortalama±standart sapma					
^b : En küçük-en büyük					

Sıçanların vücut ağırlığı yüzde değişimi aynı gruplar arasında Friedman's 2 pair analizi ile değerlendirildiğinde her grup için anlamlı değerler Tablo 13'teki gibidir.

Tablo 13: Sıçanların vücut ağırlığı yüzde değişimi Friedman's 2 pair analiz sonuçları

Kontrol grubu(Grup1)	0-12 saat (p<0,05) 12-24 saat(p<0,05) 12-48 saat(p<0,001) 6-48. saat (p=0,001) Diğer kombinasyonlarda p>0,05
1,5 mg/kg LPS+SF (Grup 6+9)	0-12 saat (p<0,05) 0-24 sa(p<0,001) 24-8 sa (p=0,01) Diğer kombinasyonlarda p>0,05
1,5 mg/kg LPS+mama(Grup 7+8)	0-12 sa(p<0,05) 0-24.sa(p=0,01) 24-48 sa(p<0,05) Diğer kombinasyonlarda p>0,05

Gruplar kendi aralarında Kruskal Wallis testi ile değerlendirildiğinde kontrol ile LPS uygulanan gruplar arasında 6. , 24. Ve 48. Saat vücut ağırlığı yüzde değişimi arasında anlamlı istatistiksel fark izlenmiştir. (p<0,05) Kontrol grubu ile 1,5 mg/kg LPS uygulanan gruplar arasında 12. Saatte anlamlı fark saptanmamıştır. (p=0,7 ve p=0,115) 1,5 mg/kg LPS +SF grubu ile 1,5 mg/kg LPS+mama grubu arasında ise 24. Saatte arasında anlamlı fark saptanmış(p=0,047) diğer ölçümler arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Vücut ağırlığı yüzde değişim grafiği Şekil 7'de görülmektedir.



Şekil 7: Gruplara göre Sıçanların Vücut Ağırlığı Değişimi

Bu sonuçlar ve grafik eş zamanlı değerlendirildiğinde kontrol grubunun 12. Saatte kilo kaybının pik yaparak durduğunu, 24. Saatte ise deney başlangıcındaki kilosunu yakalayarak kilo alımına devam ettiği görülmektedir. LPS uygulanan gruplarda ise kilo kaybı 24. Saate dek devam etmiştir ve serum fizyolojik desteği verilen grupta tartı kaybının daha dramatik olduğu görülmüştür. 24. Saatten itibaren tartı kaybının pik yaparak durduğu ve tartı alımının başladığı gözlenmektedir. Mama desteği alan grup 48. Saatte deney başlangıcındaki kilosunu yakalamayı başarsa da serum fizyolojik alan grupta 0. Saate göre tartı kaybı devam etmektedir. Kontrol grubuna göre LPS uygulanan gruplarda kilo kaybında anlamlı değişiklik olması endotoksin modelinin başarıya ulaştığını bize düşündürmektedir. Gruplara göre vücut ağırlığı yüzde değişimine ait veriler Tablo 14’te sunulmuştur.

Tablo 14: Gruplara göre Sıçanların Vücut Ağırlığı Yüzde Değişimi

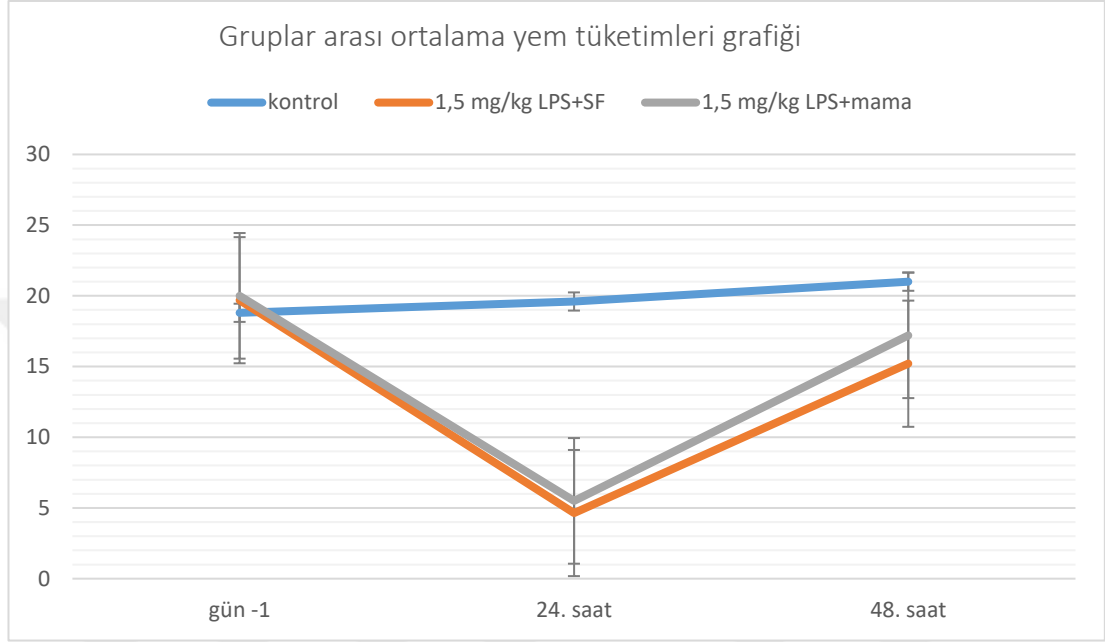
Gruplar	VÜCUT AĞIRLIĞI YÜZDE DEĞİŞİMİ(%)			
	6.saat	12. saat	24. saat	48.saat
Kontrol	-4,99±2,38 ^a	-5,85±2,47	0,5±1,86	6,5±3,4
	-7,84/-1,92 ^b	-9,31/-2,40	-2,24/3,27	0-11,2
3 mg/kg LPS+SF	-8,53±1,93			
	-11,94/-5			
3 mg/kg LPS+mama	-7,81±2,89			
	-14,39/-5,13			
1,5 mg/kg LPS+SF	-5,61±4,22	-8,65±,79	-11,53±5,8	-5,12±5
	-10,22/4,89	-14,60/-5,79	18,69/1,92	-14,49/2,68
1,5 mg/kg LPS+mama	-5,90±2,28	-6,97 ±1,58	-8,31±3	-0,23±5,5
	-10,19/-2,96	-10,19/-5,24	-12,81/-4,63	-6,97/6,72
^a : Ortalama±standart sapma				
^b : En küçük-en büyük				

4.2. Sıçanların Gruplar Arası Ortalama Yem Ve Su Tüketimine Ait Bulgular

Sıçanlara deney protokolüne uygun olarak -1. Gün, 24. ve 48. Saatlerde kafeslerin yem ve su ölçümleri yapılarak kafesteki sıçan sayısına bölünerek ortalama yem ve su tüketimleri hesaplanmıştır. Ölçüm bulguları Tablo 15 ve 16’da sunulmuştur.

Grupların Friedman’s 2 pair analizi ile kendi içinde değerlendirilmesinde kontrol grubunun -1. Gün-48. Saat ve 24.-48. Saatler arasında yem tüketiminde anlamlı olarak artış saptanmıştır.(p<0,05) -1. Gün ve 24. Saatler arasında istatistiksel

anlamlılık yoktur. 1,5 mg/kg LPS+SF ve 1,5 mg/kg LPS+mama gruplarında ise -1. Gün-24. Saatler arasında yem tüketiminde belirgin azalma görüldü .($p<0,001$) Aynı grupların -1. Gün-48. Saat ve 24.-48. Saatler arasında yem tüketiminde fark saptanmamıştır.($p>0.05$)



Şekil 8: Sıçanların gruplar arası ortalama yem tüketimi

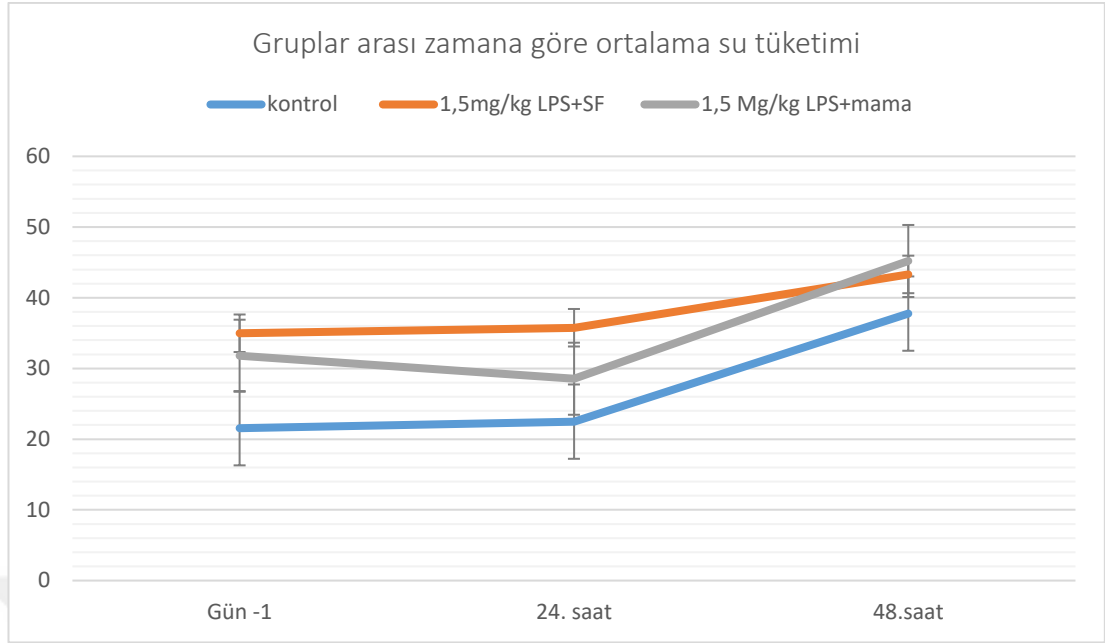
Gruplar Kruskal Wallis testi ile birbirleri ile değerlendirildiğinde -1. Günde kontrol grubu ile 1,5 mg/kg LPS+mama grubunun yem tüketimleri arasında farklılık saptanırken($p<0,05$) ,kontrol grubu ile 1,5 mg/kg LPS+SF grubu arasında ve LPS uygulanan gruplar arasında fark saptanmamıştır.($p>0,05$) 24. Saat ve 48. Saatte ise LPS uygulanan grupların yem tüketiminin kontrol grubuna göre belirgin derecede azalmış olduğu görüldü.($p<0,001$) LPS uygulanan gruplar arasında ise fark saptanmadı.($p=0,136$) Kontrol gruplarına göre LPS uygulanan sıçanlarda ortalama yem tüketimlerinin azalması da endotoksinin etkisini bize göstermektedir. Şekil 8’de ortalama yem tüketimleri görülmektedir.

Tablo 15: Gruplara göre Sıçanların Ortalama Yem Tüketimleri

Gruplar	ORTALAMA YEM TÜKETİMLERİ(gr/gün)		
	-1. gün	24.saat	48.saat
Kontrol	18,8±0,83 ^a	19,63±2	21,06±1,77
	18,3-20,3 ^b	17,7-22,5	19,2-22,6
3 mg/kg LPS+SF	20±3,15		
	17-24,7		
3 mg/kg LPS+mama	18,3±0,57		
	17,3-18,7		
1,5 mg/kg LPS+SF	19,69±0,72	4,64±3,49	15,2±1,99
	19-20,6	1,6-9,6	13-17,6
1,5 mg/kg LPS+mama	20±1,26	5,5±0,52	17,21±0,41
	19,2-22	5,1-6,2	16,5-17,5
^a : Ortalama±standart sapma			
^b : En küçük-en büyük			

Grupların ortalama su tüketimleri Friedman's 2 pair analizi ile karşılaştırıldığında kontrol grubunda günler arasında su tüketiminde farklılık olmadığı görüldü.(p=0,097) LPS uygulanan gruplarda ise -1. Gün-24. Saatler arasında fark olmadığı(p>0,05), -1. Gün-48. Saat ve 24. Saat-48.saatler karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olduğu görüldü.(p<0,05)

Gruplar birbirleriyle Kruskal Wallis testi ile kıyaslandığında ise kontrol grubu ile LPS uygulanan gruplar arasında -1. Gün ve 24. Saat su tüketimi açısından fark olduğu izlenmiştir.(p<0,001 ve p<0,05) 48. Saatte anlamlı bir fark yoktur.(p>0,05) LPS uygulanan gruplar arasında ise 24 saatte fark saptanmıştır,(p<0,05) mama detseği alan grubun su tüketiminde hafif bir azalma olmasına karşın, serum fizyolojik desteği alan grubun su tüketiminde artış olmuştur. Şekil 9'da sıçanların ortalama su tüketimleri grafiği görülmektedir.



Şekil 9: Sıçanların gruplar arası ortalama su tüketimi

Tablo 16: Gruplara göre Sıçanların Ortalama Su Tüketimleri

Gruplar	ORTALAMA SU TÜKETİMİ (mL/gün)		
	-1. gün	24. saat	48. saat
Kontrol	21,55 ± 4,87 ^a 18-30 ^b	22,48 ± 17 13,7-52,5	37,76 ± 9,37 28,3-52,5
3 mg/kg LPS+SF	34,64 ± 2,74 30-37,5		
3 mg/kg LPS+mama	28,54 ± 7,39 18,7-36,6		
1,5 mg/kg LPS+SF	34,98 ± 8,52 25-46,6	35,76 ± 3,18 33,3-40	43,3 ± 10,38 33,3-56,6
1,5 mg/kg LPS+mama	31,8 ± 7,93 23,3-43,3	28,55 ± 4,85 25-35	45,22 ± 7,68 37,5-55

^a: Ortalama ± standart sapma
^b: En küçük-en büyük

4.3. Gruplar arası Sepsis Skorlamalarının Değerlendirilmesi

Sıçanların deney protokolüne randomize gruplandırılması sonrası 0. Saatte intraperitoneal serum fizyolojik ya da LPS uygulanması sonrası değerlendirilen 1. sepsis skorlamasının toplam değerlerinin gruplara göre özellikleri Tablo 17’de sunulmuştur.

8. Saatte kurbanıye edilen 3 mg/kg doz LPS uygulanan grubu kapsaması açısından skorlamalar Friedman’s 2 pair analizi ile hem 8. Saate göre, hem de 48. Saate göre iki kez değerlendirilmiştir.

8. saate dek yapılan ve tüm grupları kapsayan analize göre, gruplar kendi içinde Friedman’s 2 pair analizi ile kıyaslandığında kontrol grubunda 0. Saat ile karşılaştırılan tüm saatler anlamlı olarak yüksek bulunmuştur($p<0.05$), fakat saatler kendi içinde karşılaştırıldığında fark bulunamamıştır. 3 mg/kg LPS+ SF, 3 mg/kg LPS+ mama ve 1,5 mg/kg LPS+ SF grubunda 0. Saate göre tüm saatlerde anlamlı yükselme görülmüştür($p<0,05$), bunun yanında 30. Dk ile 4. Saat skorları arasındaki yükselme anlamlıdır.($p<0,05$) 1,5 mg/kg LPS+ mama grubunda aynı şekilde 0. Saate göre tüm saatlerde anlamlı farklılık görülmüştür($p<0,05$), fakat diğer ölçümler arasında anlamlı farklılık yoktur.

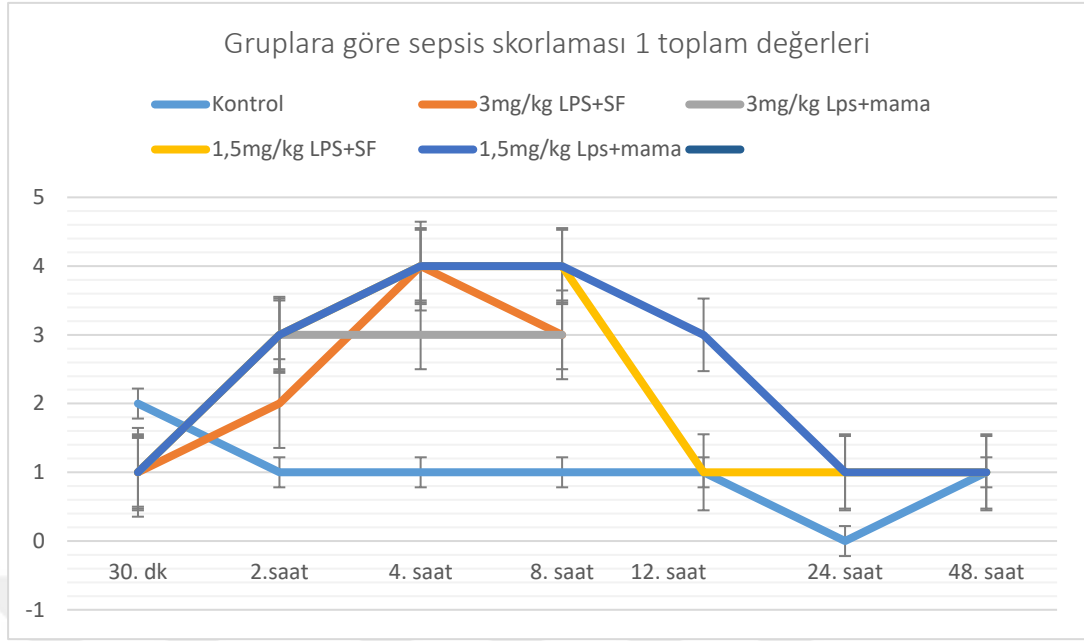
8. saate dek değerlendirilen ölçümler, tüm gruplar arası Kruskal Wallis testi ile kıyaslandığında ise; kontrol grubu ile LPS uygulanan gruplar arasında her saatte ölçülen sepsis skorlamalarında anlamlı yükselme saptanmıştır.($p<0,001$) LPS alan gruplar kıyaslandığında ise 3 mg/kg LPS+SF ile 3 mg/kg LPS+mama grubu ve 1,5 mg/kg LPS+SF ile 1,5 mg/kg LPS+mama grubu arasında sepsis skorlamalarında anlamlı bir farklılık yoktur.($p>0,05$) Mama ve serum fizyolojik desteği alan grupların doz açısından kıyaslamalarında da anlamlı farklılık yoktur.($p>0,05$)

Gruplar kendi içinde Friedman’s 2 pair analizi ile tüm ölçümler açısından değerlendirildiğinde ise, kontrol grubunda 0. Saat-30. Dk, 0.-8. Saat, 0-12. Saat, 30. Dk-48. Saat, 8. Saat-48. Saat, 12. Saat-48. Saat ve 30. Dk ile 24. Saat arasında anlamlı

farklılık saptanmıştır.($p<0,05$) Diğer ölçümler arasında anlamlı değişiklik saptanmamıştır.($p>0,05$)

LPS uygulanan gruplardan 1,5 mg/kg LPS+SF grubunda 0. Saat ile 2. , 4. ,8. Ve 12. Saatler arasında fark saptanırken($p<0,001$); 0. Ve 30. Dk, 24. Ve 48. Saatler arasında fark saptanmamıştır.($p>0,05$) Bunun dışında ölçümler arasında 30. Dk-4. Saat, 4. Saat-48. Saat ve 12. Saat- 48. Saat değerleri arasında anlamlı fark saptanmıştır.($p<0,05$) 1,5 mg/kg LPS+mama grubunda 0. Saat ile 2. , 4. ,8. Ve 12. Saatler arasında fark saptanırken($p<0,001$); 0. Ve 30. Dk, 24. Ve 48. Saatler arasında fark saptanmamıştır. ($p>0,05$) Bunun dışında ölçümler arasında 4. Saat-24. Saat, 4. Saat- 48. Saat ve 12. Saat- 24. Saat değerleri arasında anlamlı fark saptanmıştır.($p<0,05$)

Tüm ölçümler gruplar arası Kruskal Wallis testi ile kıyaslandığında ise kontrol grubu ile 1,5 mg/kg LPS uygulanan her iki grup arasında sepsis skorlamalarında belirgin yükselme mevcuttur.($p<0,001$) 1,5 mg/kg LPS+SF ile 1,5 mg/kg LPS+mama grupları kıyaslandığında 24. Saat sepsis skorlarında 1,5 mg/kg LPS+SF grubunun skorlarının fark yaratacak şekilde yüksek olduğu görüldü($p=0,004$), diğer saatler arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.($p>0,05$) 1. Sepsis skorlamasının toplam değerlerinin gruplara göre değerleri Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10: Sıçanların gruplara göre sepsis skorlaması 1 toplam değerleri

Tablo 17: Gruplara göre sıçanların sepsis skoru 1 toplam değerleri

SEPSİS SKORLAMASI 1							
Gruplar	30. dk	2. saat	4. saat	8. saat	12. saat	24. saat	48. saat
Kontrol	2±1 ^a	1±0	1±0	1±0	1±1	0	1±1
	1-2 ^b	1-1	1-2	1-2	0-2	0-1	1-2
3 mg/kg LPS+SF	1±0	2±3	4±1	3±0			
	1-1	1-4	3-4	3-4			
3 mg/kg LPS+mama	1±0	3±2	3±1	3±1			
	1-1	0-4	3-4	3-4			
1,5 mg/kg LPS+SF	1±1	3±0	4±1	4±1	1±1	1±1	1±1
	1-3	3-4	3-4	3-4	0-2	1-2	1-2
1,5 mg/kg LPS+mama	1±2	3±0	4±1	4±1	3±1	1±1	1±1
	1-3	2-4	3-4	3-4	3-4	1-2	1-2

^a: Medyan+ çeyrekler arası aralık
^b: En küçük- En büyük

Sıçanların deney protokolüne randomize gruplandırılması sonrası 0. Saatte intraperitoneal serum fizyolojik ya da LPS uygulanması sonrası değerlendirilen 2. sepsis skorlamasının toplam değerlerinin gruplara göre özellikleri Tablo 17'de sunulmuştur. 8. Saatte sakrifiye edilen 3 mg/kg doz LPS uygulanan grubu kapsamı açısından skorlamalar Friedman's 2 pair analizi ile hem 8. Saate göre, hem de 48. Saate göre iki kez değerlendirilmiştir.

8. saate dek yapılan Friedman's 2 pair analizi ile 2. Sepsis skorlaması toplam puanları tüm gruplar içinde kıyaslandığında kontrol grubunda 0. Saat ile karşılaştırılan tüm saatler anlamlı olarak yüksek bulunmuştur, ($p < 0.05$) fakat saatler kendi içinde karşılaştırıldığında fark bulunamamıştır. ($p > 0.05$) 3 mg/kg LPS+ SF grubunda da aynı şekilde 0. Saat ile karşılaştırılan tüm saatler anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$), fakat saatler kendi içinde karşılaştırıldığında fark bulunamamıştır. ($p > 0.05$) 3 mg/kg LPS+ mama grubunda 0. Saat ile 2. Saat arasında anlamlı fark yoktur. ($p = 0.064$) fakat 0. Saat ile 4. Saat ve 8. Saat arasında anlamlı fark mevcuttur. ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$) Diğer ölçümlerde anlamlı fark yoktur. ($p > 0.05$)

1,5 mg/kg LPS+ SF grubunda 0. Saat ile 2. Saat arasında anlamlı fark yoktur, ($p = 0.317$) fakat 0. Saat ile 4. Saat ve 8. Saat arasında anlamlı fark mevcuttur. ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$) Diğer ölçümlerde anlamlı fark yoktur. ($p > 0.05$) 1,5 mg/kg LPS+ mama grubunda da aynı şekilde 0. Saat ile 2. Saat arasında anlamlı fark yoktur, ($p = 0.317$) fakat 0. Saat ile 4. Saat ve 8. Saat arasında anlamlı fark mevcuttur. ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$) Buna ek olarak 2. Saat ile 8. Saat ölçümleri arasında da anlamlı fark saptanmıştır, ($p < 0.05$) diğer ölçümlerde anlamlı fark yoktur. ($p > 0.05$)

8. saate dek değerlendirilen ölçümler, tüm gruplar arası Kruskal Wallis ile kıyaslandığında ise; kontrol grubu ile LPS uygulanan gruplar arasında her saatte ölçülen 2. sepsis skorlaması toplamında anlamlı yükselme saptanmıştır. ($p < 0.001$) LPS alan gruplar kıyaslandığında ise 3 mg/kg LPS+SF ile 3 mg/kg LPS+mama grubu arasında 8. Saat sepsis skoru toplamı arasında anlamlı fark olduğu ve sıvı mama desteği alan grupta sepsis bulgularının daha şiddetli olduğu görülmektedir. ($p = 0.042$)

Diğer ölçüm zamanlarında sepsis skorlarının toplamı açısından iki grup arasında fark görülmemiştir.($p>0,05$)

LPS uygulanan diğer iki grup olan 1,5 mg/kg LPS+SF ile 1,5 mg/kg LPS+mama grupları birbiriyle kıyaslandığında ise 4. Saat ve 8. Saat sepsis skorlamaları toplamında anlamlı bir farklılık saptanmıştır.($p=0,022$ ve $p=0,032$) Serum fizyolojik desteği alan grubun sıvı mama desteği alan gruba göre sepsis bulguları daha şiddetlidir ve bu Şekil 11'deki grafikte de açıkça görülmektedir. 2. Saat sepsis skorları arasında anlamlı farklılık yoktur.($p>0,05$)

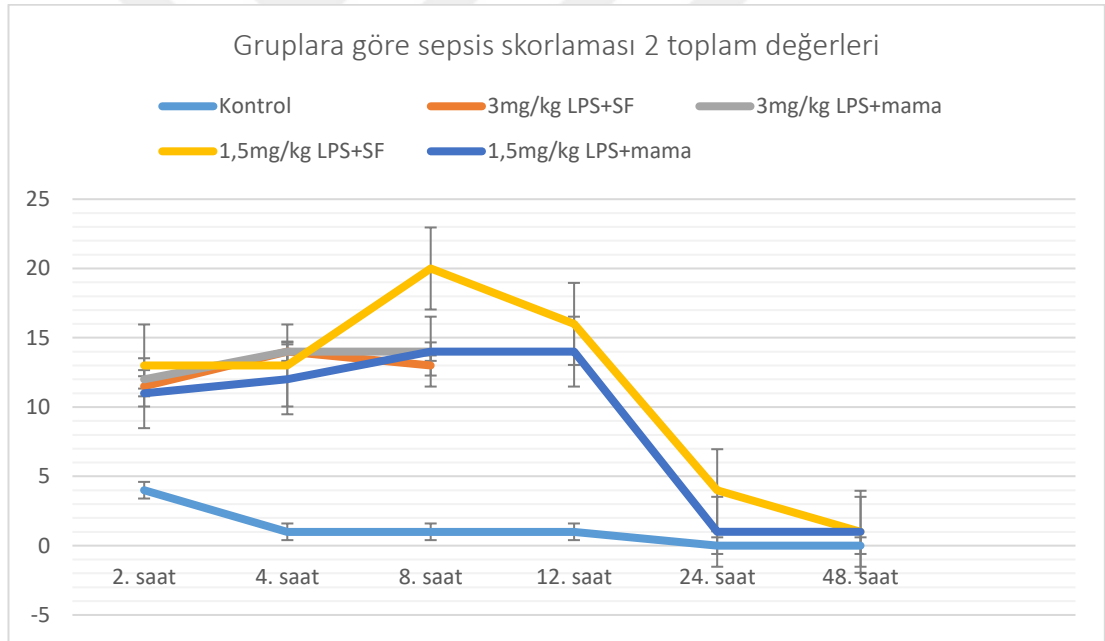
Mama ve serum fizyolojik desteği alan grupların doz açısından kıyaslamalarında ise 3 mg/kg LPS+SF grubu ile 1,5 mg/kg LPS+SF grubu arasında 8. Saatte sepsis skorlamaları arasında anlamlı fark saptanmıştır.($p=0,004$), aynı şekilde 3 mg/kg LPS+mama grubu ile 1,5 mg/kg LPS+mama grubu arasında 4. Saat ve 8. Saatte sepsis skorlamaları arasında anlamlı fark saptanmıştır.($p=0,024$ ve $p=0,004$) 2. Saat ölçümlerinde anlamlı farklılık yoktur.($p>0,05$)

48. saate dek tüm ölçümlerin değerlendirildiği Friedman's 2 pair analizi ile gruplar kendi aralarında kıyaslandığında ise kontrol grubunda 0. Saat ile 2. Saat, 8. Saat ve 12. Saat arasında anlamlı fark saptanmıştır,($p<0,001$ ve $p<0,05$) bunun yanında 2. Saat ile 24. Ve 48. Saat arasında,($p<0,001$) 12. Saat ile 24. Saat ve 48. Saat arasında,($p<0,001$) 8. Saat ile 48. Saat arasında($p<0,05$) ve 12. Saat ile 24. Saat arasında($p<0,05$) anlamlı fark saptanmıştır.

1,5 mg/kg LPS+SF grubu kendi içinde kıyaslandığında 0. Saat ile 4. Saat arasında($p<0,05$) ve 0. Saat ile 8. Saat ve 12. Saat arasında ($p<0,001$) anlamlı fark bulunmuştur. Bunun dışında 24. Saat ile 8. Saat ve 12. Saat arasında($p<0,05$) ve 48. Saat ile 8. Saat ve 12. Saat arasında ($p=0,001$ ve $p=0,004$) anlamlı fark mevcuttur. Diğer ölçümler arasında anlamlı fark yoktur.($p>0,05$) 1,5 mg/kg LPS+mama grubu kendi içinde kıyaslandığında 0. Saat ile 2. Saat ve 4. Saat arasında($p<0,05$) ve 0. Saat ile 8. Saat ve 12. Saat arasında($p<0,001$) anlamlı fark bulunmuştur. Bunun dışında 24. Saat ile 8. Saat ve 12. Saat arasında($p<0,05$) ve 48. Saat ile 8. Saat ve 12. Saat arasında

($p=0,017$ ve $p=0,001$) anlamlı fark mevcuttur. Diğer ölçümler arasında anlamlı fark yoktur.($p>0,05$)

Gruplar arası Kruskal Wallis testi ile kıyaslandığında ise; kontrol grubu ile LPS uygulanan gruplar arasında her saatte ölçülen 2. sepsis skorlaması toplamında anlamlı yükselme saptanmıştır.($p<0,001$) LPS alan gruplar kıyaslandığında ise 1,5 mg/kg LPS+SF ile 1.5 mg/kg LPS+mama grubu arasında 4. , 8. ve 24. Saat sepsis skoru toplamı arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür.($p=0,022$, 0,032 ve 0,001) Serum fizyolojik desteği alan grubun sıvı mama desteği alan gruba göre sepsis bulguları daha şiddetlidir ve bu fark 48. Saate dek izlenmiştir. 2. ve 48. Saat sepsis skorları arasında anlamlı farklılık yoktur.($p>0,05$)



Şekil 11:Sıçanların gruplara göre sepsis skorlaması 2 toplam değerleri

Tablo 18:Gruplara göre sıçanların sepsis skoru 2 toplam değerleri

SEPSİS SKORLAMASI 2						
Gruplar	2.saat	4. saat	8. saat	12. saat	24. saat	48. saat
Kontrol	4±2 ^a	1±0	1±1	1±1	0±0	0
	1-4 ^b	1-2	1-2	1-3	0-1	
3 mg/kg LPS+SF	11,5±9	14±9	13±2			
	9-20	10-21	10-16			
3 mg/kg LPS+mama	12±3	14±2	14±3			
	8-20	11-22	11-19			
1,5 mg/kg LPS+SF	13±3	13±2	20±6	16±3	4±3	1±1
	4-14	13-16	12-26	13-24	2-6	1-2
1,5 mg/kg LPS+mama	11±4	12±3	14±4	14±5	1±1	1±1
	8-13	8-22	10-20	13-18	1-3	1-2
^a : Medyan+ çeyrekler arası aralık						
^b : En küçük- En büyük						

4.4. Gruplar arası Vücut Sıcaklığı Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Vücut ısısı ölçümleri gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi iki farklı yöntemle yapılmıştır. Bunun dışında 3 mg/kg/doz LPS uygulanan sıçanların erken saatlerde ex olması ve 8. Saatte çalışmanın sonlandırılması nedeniyle istatistiksel olarak eksik verilerin olması sorunu gündeme gelmiştir. Deney sırasında gözlemsel olarak hipotermiye giren bu sıçanların vücut ısıları ölçümlerinde anlamlı verilerin olabileceği ve analizden çıkarılmasının bias oluşturacağı öngörülmüştür. Bu nedenle eksik verilerin Little MCAR's analizi yapılmış ve rastlantısal dağılıp dağılmadığı test edilmiştir. Eksik verilerin rastlantısal dağılmaması nedeniyle lineer regresyon analizi yapılarak eksik verilerin yerlerine veriler atanmıştır. Böylelikle tüm sıçanlar analiz edilebilmiştir. Sıçanların gruplara göre vücut ısısı özellikleri Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 19:Sıçanların gruplara göre vücut ısısı özellikleri

Gruplar	VÜCUT SICAKLIĞI(°C)						
	0.saat	2. saat	4. saat	6.saat	12.saat	24.saat	48.saat
Kontrol	36,6± 0,26 ^a	36,5± 0,39	36,3± 0,46	36,5± 0,22	36,8± 1,18	36,2± 0,7	36,7± 0,36
	36,4- 37,2 ^b	35,8- 37,1	35,4- 36,8	36,2- 36,8	35,7- 39,2	34,7- 36,9	36,3- 37,4
3 mg/kg LPS+SF	36,5± 0,13	34,1± 2	36,1± 1,64	36± 1,34	36± 1,69	35,2± 1	35± 1,43
	36,3- 36,7	31,9- 36,8	32,6- 38,6	34,3- 37,9	33- 38,8	33,3- 37,3	32,5- 37,3
3 mg/kg LPS+mama	36,5± 0,17	34,3± 1,67	35,5± 0,94	35,1± 1,46	35,6± 1,20	34,9± 0,64	34,4± 1,16
	36,3- 36,8	31,9- 37,5	33,9- 36,8	33,3- 39,1	35,1- 38,8	33,6- 35,7	33- 37
1,5 mg/kg LPS+SF	36,6± 0,17	34,2± 1,68	35,2± 1,63	35,4± 1,15	36,5± 1,2	35,6± 0,61	34,7± 1,08
	36,4- 36,9	31,9- 36,8	32,5- 37,7	3,8- 36,9	35,1- 38,8	34,6- 36,5	32,9- 36,3
1,5mg/kgLPS+mama	36,6± 0,25	34,8± 1,44	35,4± 1,79	35,7± 0,89	36± 0,49	35,2± 0,81	34,9± 0,56
	36,3- 37,2	32,1- 37,2	33,2- 38,6	33,9- 37	35,7- 36,4	33,3- 36,2	33,7- 35,7

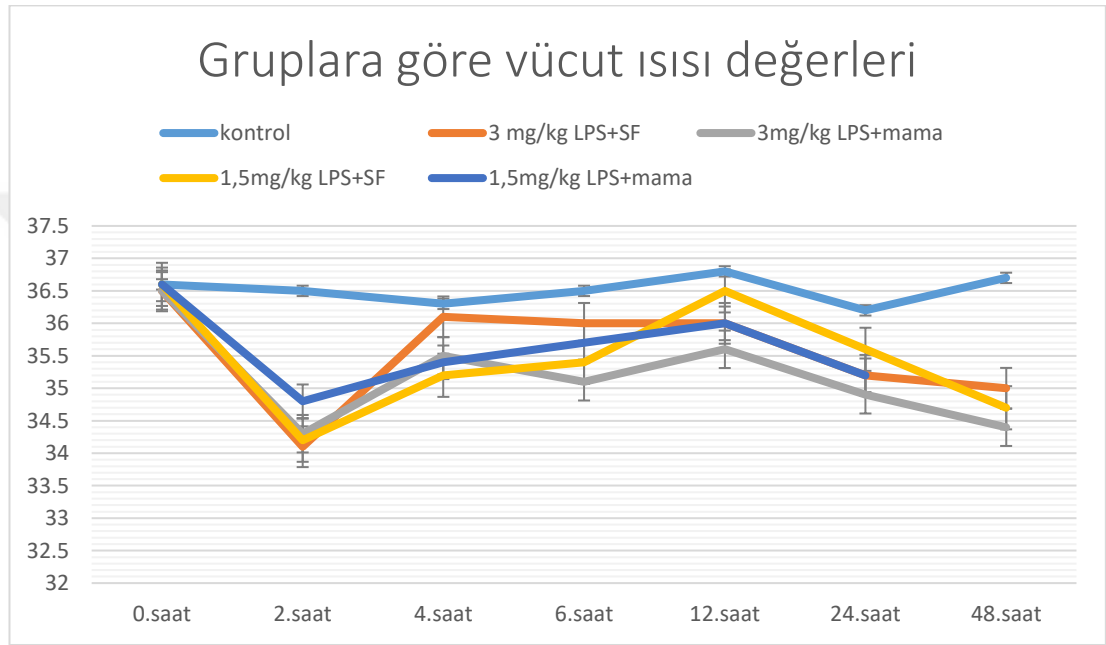
^a: Ortalama±standart

sapma

^b: En küçük-en büyük

Gruplar arası yapılan Friedman's 2 pair testi sonuçlarına göre kontrol grubunda 0. Saat ile 4. Ve 24. Saat arasında fark saptanmış,(p<0,05) diğer ölçümler arasında fark izlenmemiştir. 3 mg/kg LPS+SF grubunda tüm ölçümler arasında fark saptanmamıştır.(p>0,05) 3 mg/kg LPS+mama grubunda 0. Saat ile 2. Saat ve 48. arasında(p=0,001) ve 0. Saat ile 24. Saat arasında(p<0,05) fark saptanmıştır. 1,5 mg/kg LPS+SF alan grubun analiz sonuçlarına göre 0. Saat ile 4. Ve 48. Saat arasında(p<0,001) ve 0. Saat ile 4. Ve 24. Saat arasında(p<0,05) fark saptanmıştır.

Bunun dışında 2. Saat ile 12. Saat, 2. Saat ile 6. Saat, 12. Saat ile 48. Saat 6. Saat ile 48. Saat arasında fark saptanmıştır.($p<0,05$) 1,5 mg/kg LPS+mama alan grubun analiz sonuçlarına göre 0. Saat ile 24. Ve 48. Saat arasında($p<0,001$) ve 0. Saat ile 2. Saat arasında($p<0,05$) fark saptanmıştır. Bunun dışında 4. Saat ile 48. Saat, 6. Saat ile 48. Saat arasında fark saptanmıştır.($p<0,05$) Şekil 12’de sıçanların gruplara göre vücut ısıları değişimleri görülmektedir.

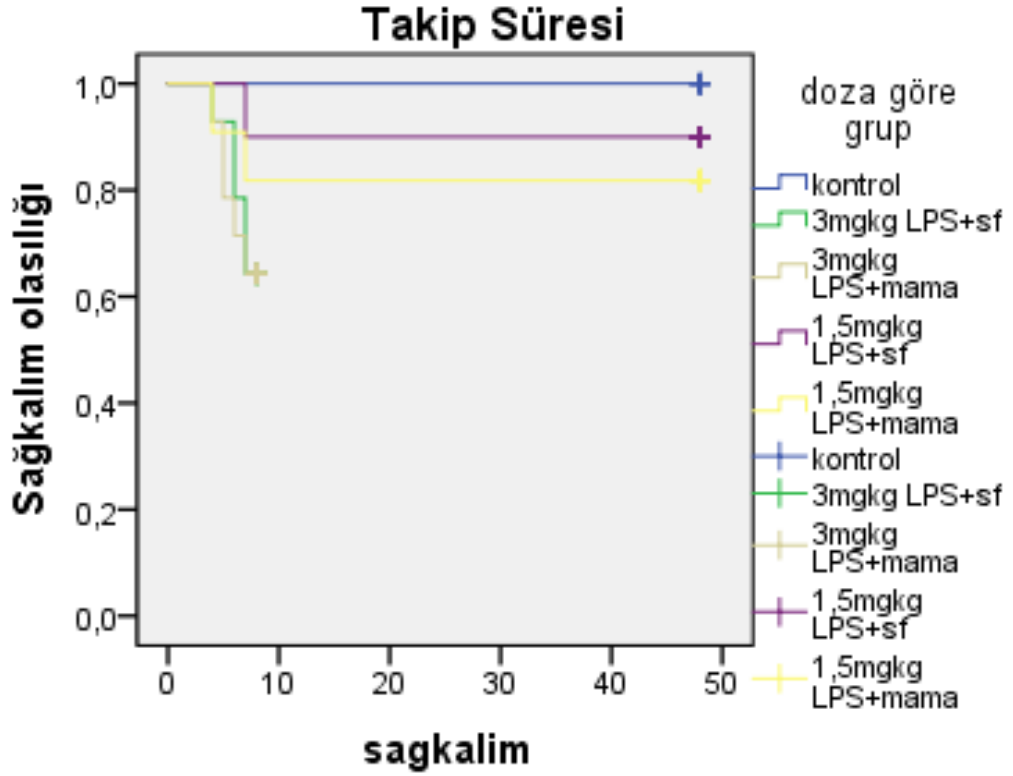


Şekil 12: Gruplara göre sıçanların vücut ısılarının değişim grafiği

Gruplar aralarında Kruskal Wallis testi ile kıyaslandığında ise; LPS uygulanan gruplar arasında vücut sıcaklığı ölçümleri arasında fark saptanmamıştır. Kontrol grubu ve LPS uygulanan gruplar arasındaki değerlendirmede kontrol grubu ile tüm gruplar arasında 2. Saatte, kontrol grubu ile 3 mg/kg LPS+SF grubu, 1,5 mg/kg LPS+SF ve 1,5 mg/kg LPS+mama grupları arasında 6. Saatte, tüm gruplar arasında 24. Saatte, tüm gruplar arasında 48. Saatte fark saptanmıştır.($p<0,05$)

4.5. Gruplar arası sağ kalım oranına ait bulgular

Grupların sağ kalım yüzdeleri Kaplan Meier testi kullanarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.($p>0,05$) Gruplara göre sıçanların sağ kalım oranları Şekil 13'te izlenmektedir.



Şekil 13:Gruplara göre sıçanların sağ kalım grafiği

5. TARTIŞMA

Sepsis uzun zamandır hem görülme sıklığı, hem ağır mortalite ve morbidite sebebi olması, hem de sağlık maliyetine ağır yükler getirmesi nedeniyle tüm bilim dünyasının dikkatini çeken bir sendromdur. Bilimsel gelişmeler yaşandıkça sepsisin patofizyolojisini anlamaya yönelik adımların atılması mümkün hale gelmiş, bu adımlar atıldıkça ne kadar karmaşık olduğu daha iyi anlaşılmıştır. İnsanlar üzerinde çalışma alanı kısıtlı olan bu sendromu daha iyi anlamak, patofizyolojisini tanımlamak ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi amacıyla deney hayvanlarında çeşitli sepsis modelleri oluşturulmuş ve oluşturulan tüm modellerde ne gibi kısıtlılıkların olduğu zaman geçtikçe ve çalışmalar arttıkça daha iyi anlaşılmıştır. Moleküler ve epigenetik çalışmaların artması ve yaygınlaşması ile sepsisin hücre içi yolaklarda ne gibi değişikliklere neden olduğu ve geri dönüşümsüz organ hasarının nerede başladığını ve bu kaskadın nasıl tüm vücuda dağıldığını keşfetmeye bir adım daha yaklaşmıştır. Sepsis için bu çağda artık “neyi bilmediğimizi biliyoruz” diyebilmek mümkün hale gelmiştir.

Yine yakın zamanda bilim dünyası için heyecan verici bir gelişme olan hücre içi hayati fonksiyonlara sahip bir yolak olan otofajinin tanımlanması ile bu yolağın etkilerini araştıran artan hızda çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Otofajinin edinilen bilgilerle birlikte hücre içindeki homeostazisi dengelemek için hayati bir mekanizma olduğu anlaşılmıştır. Daha öncesinde deney hayvanlarında sepsis modelleri oluşturularak yapılan birçok çalışmada sepsisin otofajik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir. Otofajinin kompleks bir mekanizma olması ve yapılan çalışmalar bu aktivasyonun sepsisin hücre içindeki ve dolaylı olarak nihai sonucu olan organ hasarı ile ilişkisinin duruma göre koruyucu, bazen hasarı kolaylaştırıcı ve hata belki de ikili bir etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Sepsis nasıl konağın patojene karşı olan hiperinflamatuvar yanıtı olarak tanımlanmaya başladıysa; patofizyolojisine yönelik yapılan çalışmalarda da mikro/makrovasküler hasarın sonucu olarak görülen organ yetmezliğine gidişte otofajinin disregülasyonu suçlanmaya başlanmıştır.

Sepsiste mikroorganizmanın kendisinin ya da toksinlerinin vücutta oluşturduğu inflamatuvar yanıt, hücre mikroçevresine hipoksik ve dolayısıyla oksijen radikallerinin arttığı, enerji açığının olduğu stres ortamı olarak yansımaktadır. Hücrenin bu çevreden geri dönüşümsüz hasarla ayrılabilmesinin mümkün olmadığı durumlarda hücrenin nekroz veya apoptozla ölümü gerçekleşmektedir. Dokularda yaygın hücre hasarının olduğu bu durumda radikallerin zararlarından hücreleri koruma ve stres ortamında hasarı minimize etmede otofajinin rolünün olup olmadığı araştırılmıştır. Önceden yapılan çalışmalarda Becn1 -/- (ballelik Becn1 kaybı) erken embriyonik ölüm ile ilişkili; LC3B-/- veya Becn1+/- olması regülasyonu bozulmuş otofajik aktivasyona sebep olduğu görülen bu iki geni susturulmuş LC3B-/- veya Becn1+/- fareler ve Wild type(WT) farelerin yağ dokularından mezenkimal kök hücreler toplanmış ve çeşitli oksidatif stres yaratan durumlara maruz bırakılmış ve otofajinin aktivasyonunun mitokondriyal hasar ve ROS oluşumunu yakından izleyen bir süreç olduğunu, aktivasyonunun hücrenin hayatta kalma şansını arttırdığı ve son olarak da hasar öncesi otofajinin aktivasyonunun, oksidatif stres altında hücreyi kurtaran bir mekanizma olduğu kanıtlanmış.(147)

Sepsiste sistemik inflamatuvar yanıtın şiddetine otofajinin etkisi ne yönde olabileceğine dair yapılan çalışmalar da mevcuttur. Yapılan bir çalışmada yine otofajide önemi bilinen atg7 geninin susturulduğu fareler ile Wild type farelere intraperitoneal Pseudomonas aeruginosa enjekte edilerek enfeksiyon oluşturulduktan sonra bronkoalveolar sıvı ve akciğer dokuları incelenmiş ve Atg7 geni susturulan farelerde ciddi akciğer hasarı ve artmış inflamatuvar yanıt izlenmiştir. Dokudaki bakteri sayısı incelendiğinde de anlamlı olarak farklılık görülmüştür. Bunun yanında Atg7-/- farelerde mortalitenin anlamlı olarak arttığı izlenmiştir. Benzer çalışmaların da gösterdiği gibi otofaji mekanizmaları sepsis içi hayati rol oynuyor olabilir.

Hastalık döneminde iştah azalması zaman zaman hepimizin yaşadığı ve insandan böceklerle dek genetik yapımızda korunan bir konak savunmasıdır. Bunun güçlü ve önemli bir savunma mekanizması olduğu bilinmektedir, fakat henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Akut hastalık döneminde hastalık ile beslenme arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma mevcuttur. Bu konuda yapılan randomize

kontrollü çalışmaların bazıları erken dönemde beslenmenin faydalı olduğunu öne sürerken, diğerleri de erken dönemde fayda izlenmediğini ve ek olarak komplikasyon riskini attırdığını belirtmişlerdir. Son olarak hastalığın kritik döneminde hipokalorik makrobesin alımına izin verip mikrobiyotikler destekleyerek hastanın stabilizasyonu ile düşük volümlerde enteral beslenmenin başlanması önerilmiştir.(148)

Otofajinin aktivasyonunda açlığın en etkin uyaranlardan biri olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda açlığın vücutta birçok dokuda otofajiyi aktive ettiği görülmüştür.(143) Çalışmamızda hipotezimiz bu bilgilerden yola çıkarak oluşturulmuştur. Otofajinin hücre içi aktivasyonu, hücre mikroçevresini sepsisin olumsuz etkilerine karşı koruyucu bir etki gösteriyorsa açlığın bu etkiyi güçlendirmesi mümkün müdür ve tam tersi beslenme otofajinin aktivasyonunu engelleyerek hastalığa karşı koruyucu etkisini sınırlandırıyor olabilir mi?

Çalışmamızda E.Coli O55:B5 serotipi lipopolisakkariti intraperitoneal enjekte edilerek sıçanlarda endotoksemi oluşturulmuştur. Endotoksemi bulgularının izlendiği aktif dönemde bir grup sıçanın ad libitum izlenerek hipokalorik döneme müdahale edilmemesi, diğer grup sıçana ise sıvı mama desteği ile normokalorik döneme yaklaşılmaları hedeflenmiştir.

Çalışmada sıçanların kalitatif ve kantitatif hastalık belirtilerinin değerlendirilebilmesi için vücut ağırlıkları, yem ve su tüketimleri, vücut sıcaklığı ölçümleri ve sepsis skorlama sistemleri kullanılmıştır. Bulgularda tartışıldığı üzere tartı kaybının intraperitoneal enjeksiyon sonrası kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm gruplarda olduğu görüldü. Bu da işlemin sıçanlarda stres yaratıcı etkisini yansıtmaktadır. Fakat kontrol grubunun yem tüketimi işleminden etkilenmedi. LPS uygulanan sıçanlarda ise belirgin tartı kaybı ve yem tüketiminde azalma görülmüştür. LPS uygulanan sıçanlar arasında dikkat çeken özelliklerden biri de, beslenme desteği alan ve almayan grupların yem tüketim miktarları arasında fark olmamasıdır. Sıçanlar nokturnal dönemde aktif ve beslenen hayvanlardır, ek beslenmelerin gündüz saatlerinde yapılması nedeniyle değişiklik görülmemiş olabileceği düşünülmüştür.

Hayvanlarda sepsis bulgularını tanımlamak vital bulguların kaydedilmesinin zorluğu ve laboratuvar tetkiklerinin oldukça kısıtlı olduğu deney laboratuvarı ortamında oldukça zordur. Genel olarak gözlemsel değerlendirmelerin önemi ağırlık kazanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan ve sepsisin değerlendirilebildiğine dair güvenilir kanıtlar sunan iki sepsis skorlaması çalışmada kullanılmıştır. Sepsis skorlamaları ayrı olarak değerlendirildiğinde; 1. sepsis skorlaması ile kontrol grubu ile LPS uygulanan gruplardaki sıçanların sepsis belirtileri ayırt edilerek tanımlanabildi. Skorun şiddetindeki azalma ile sepsis bulgularının gerilemede olduğu değerlendirilebildi. LPS uygulanan gruplar arası beslenme desteğinin yanıtını değerlendirmek için yeterli olmadığı öngörülerek 2. Sepsis skorlaması da sepsis bulgularının belirgin şekilde gözlenmeye başlandığı 2. Saatte protokole dahil edildi.

2. sepsis skorlaması ile kontrol grubu ile LPS uygulanan gruplardaki sıçanların sepsis belirtileri 1. Sepsis skorlamasına benzer şekilde ayırt edildi ve tanımlandı. Skorun şiddetindeki azalma ile sepsis bulgularının gerilemede olduğu değerlendirilebildi. LPS uygulanan gruplar arası beslenme desteğinin yanıtını değerlendirmek için de 2. Sepsis skorlaması yeterli oldu; bu gruplar arasındaki sepsis bulgularının şiddetini kantitatif olarak ayırt edebilmemizi sağladı.

Her iki skorlama ile birlikte sıçanlar değerlendirildiğinde 24. ve 48. Saatte sağ kalan sıçanların çoğunun hafif stres bulguları dışında iyileşme gösterdiği gözlemlendi. Sepsis bulgularının en şiddetli 4 ile 12. Saatler arası izlendiğini, fakat 2. Saatten itibaren kolayca ayırt edilebildiği görüldü. Skorlama puanlarındaki düşme ile yem tüketiminin artışı ve kilo alımının başlaması arasında doğru orantı olduğu görüldü. Dolayısıyla her iki skorlama da kullanışlı olmakla birlikte 2. Sepsis skorlamasının iş yükünü arttırdığı belirtilmelidir.

Vücut sıcaklığı ölçümü kısıtlılıklar nedeniyle dijital rektal termometre ile yapılması planlanmıştı. Rektal ölçüm dijital termometre ile her sıçan için yaklaşık 2 dk sürmektedir ve bu dönemde sıçanların strese girmemesi için azami dikkat gösterilmesine rağmen tam olarak engel olunamamaktadır. Bir yandan da ilk ölçülen

sıçan ile son ölçülen sıçan arasında zamansal fark yaratmaktadır. Hayvanların refahını arttırabilmek, iş gücünü azaltmak ve zamansal kaymanın önüne geçebilmek için alternatif yöntemler aranmış ve tam olarak karşılamadığı bilinse de getireceği kazanımlar göz önünde bulunularak yapılabilen her durumda infrared termomere ile anogenital bölgeden ölçüm yapılmıştır. Infrared termometre modeli daha önce yapılan bir çalışmadan referans alınmış ve çalışma öncesi ölçümler yaparak regresyon analizi yapılarak rektal termometre ölçümleri yerine geçebilecek değerler bulunmuştur.

Yapılan sepsis skorlaması ve vücut sıcaklığı ölçümleri ile ilgili bir çalışmada hipoterminin mortalite açısından önemli bir prediktör olduğu ve sıcaklık yanıtının insanlarla paralel olduğu gözlenmiştir. (149) Çalışmamızda ölçülen vücut sıcaklığı değerlerinin çalışmayla paralel olarak 2. Saatte belirgin düştüğünü gözledik. Mortalite ile ilişkisini değerlendirmek için daha ayrıntılı ve daha karmaşık istatistiksel analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda gruplar arası otofaji aktivasyon farkının değerlendirilmesi planlanan kas ve kan dokularının çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi(İBG) tarafından halen yürütülmektedir.

Çalışmamızda LPS uygulaması sonrası endotoksemi oluşturulan sıçanlar her yönden sepsis bulguları ve davranış özellikleri açısından değerlendirilmiştir. İzlem süresinde her sıçanın kliniğine ilişkin bilgiler toplanmıştır. Beslenme desteği verilen ve verilmeyen gruplar arasındaki fark yaratan ve yaratmayan değişkenler tanımlanabilmiştir. Deney hayvanlarında örneklem sayısının az olması ve bu nedenle yaşanan kısıtlılıklar giderilmeye çalışılmıştır. Bu bilgiler moleküler çalışmalar ile desteklendiğinde zengin bir bilgi kaynağı oluşturacaktır. Çalışmanın kısıtlılıklar tartışma içerisinde her bölümde belirtilmiştir.

6. SONUÇLAR

1-) LPS uygulanan sıçanlarda endotoksinin kilo kaybı, hipotermi ve yem, su tüketiminde azalma etkilerinin kontrol grubuna göre anlamlı farklı olduğu gözlenmiştir.

2-) Kontrol ve LPS uygulanan sıçan gruplar iki farklı sepsis skorlaması ile değerlendirilmiş olup, LPS uygulanan gruplarda her iki skorlama puanlarının kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu görülmüştür.

3-) 1. Sepsis skorlamasında LPS uygulanan gruplar arasında 8. Saate dek fark saptanmazken; 24. Saatte 1,5 mg/kg/doz LPS uygulanan sıçan grupları arasında mama desteği alan sıçanların sepsis skorlamasının almayanlara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı.

4-) 2. Sepsis skorlaması değerlendirildiğinde ise 3 mg/kg/doz LPS uygulanan sıçan grupları arasında ise mama desteği alan grupta sepsis skorunun anlamlı olarak daha şiddetli olduğu gözlemlendi. 1,5 mg/kg/doz LPS uygulanan sıçan grupların mama desteği alan grubun 48. Saate dek tüm sepsis skorlamaları mama desteği almayan gruba göre anlamlı olarak daha düşük saptandı. Moleküler sonuçlar ile desteklenmesi beklenmektedir.

5-) Kontrol ve LPS uygulanan gruplar arasında vücut sıcaklığı ölçümleri arasında anlamlı fark izlenmekle birlikte LPS uygulanan sıçan grupları arasında fark saptanmamıştır.

6-) Gruplar arasında sağ kalım açısından fark saptanmamıştır.

7-) Moleküler sonuçlarla var olan klinik bulgular daha anlamlı olarak değerlendirilecektir.

KAYNAKÇA

1. Nemzek JA, Hugunin KMS, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal well-being. Vol. 58, Comparative Medicine. 2008. p. 120–8.
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. Vol. 348, New England Journal of Medicine. 2003. p. 138–50.
3. Jing K, Lim K. Why is autophagy important in human diseases? Exp Mol Med. 2012;44(2):69–72.
4. Mizushima N, Cell MK-, 2011 undefined. Autophagy: renovation of cells and tissues. Elsevier [cited 2019 Aug 14],
5. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases [Internet]. Vol. 11, Nature Reviews Drug Discovery. 2012,
6. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J Cell Sci. 2003 May 1;116(9):1679–88.
7. Arwyn-Jones J, (Oxford) AB-S, 2019 U. Sepsis. 2019;1–8.
8. Nemzek JA, Hugunin KMS, Opp MR. Modeling Sepsis in the Laboratory : Merging Sound Science with Animal Well-Being. 2008;58(2):120–8.
9. Alcamo AM, Aneja RK, Pang D, Bashir DA, Carcillo JA, Nguyen TC. Role of Damage-Associated Molecular Patterns and Uncontrolled In fl ammation in Pediatric Sepsis-Induced Multiple Organ Dysfunction Syndrome. 2019;
10. Farenden S, Gamble D, Welch J. Impact of implementation of the National Early Warning Score on patients and staff. Br J Hosp Med (Lond). 2017 Mar 2;78(3):132–6.
11. Szakmany T, Lundin RM, Sharif B, Ellis G, Morgan P, Kopczynska M, et al. Sepsis prevalence and outcome on the general wards and emergency departments in Wales: Results of a multi-centre, observational, point prevalence study. PLoS One. 2016;
12. Tsaganos T, Reinhart K, Scherag A, Schlattmann P, Adhikari NKJ, Angus DC,

- et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2015.
13. Kempker J, medicine GM-C in chest, 2016 undefined. The changing epidemiology and definitions of sepsis. chestmed.theclinics.com. [cited 2019 Aug 9],
 14. Stoller J, Halpin L, Weis M, Aplin B, ... WQ-J of critical, 2016 undefined. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. Elsevier
 15. Huang C, Daniels R, ... AL-... J for Q in, 2019 undefined. Life after sepsis: an international survey of survivors to understand the post-sepsis syndrome.
 16. Botero J, significant MP-S ongoing and, 2012 undefined. The history of sepsis from ancient Egypt to the XIX century,
 17. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. In: Chest. 1992.
 18. Verdonk F, Blet A, Mebazaa A. The new sepsis definition : limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis. 2017;30(2):200–4.
 19. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. N Engl J Med. 2015 Apr 23;372(17):1629–38.
 20. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. In: Pediatric Critical Care Medicine. 2005.
 21. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. Intensive Care Med. 2013;
 22. Kawasaki T. Update on pediatric sepsis: A review. Journal of Intensive Care. 2017.
 23. Singer M, Deutschman C, Jama CS-, 2016 undefined. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3),
 24. Martin K, pediatrica SW-M, 2015 undefined. Initial resuscitation and management of pediatric septic shock,

25. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;
26. Gupta S, Sakhuja A, Kumar G, McGrath E, Chest RN-, 2016 undefined. Culture-negative severe sepsis: nationwide trends and outcomes. Elsevier,
27. M.E. H, W.T. L-Z, D.C. A, R.S. W. Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis. *Pediatr Crit Care Med*. 2013;14(7):686–93,
28. Weiss SL, Fitzgerald JC, Pappachan J, Wheeler D, Jaramillo-Bustamante JC, Salloo A, et al. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: the sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;
29. Schlapbach L, Straney L, ... JA-TLI, 2015 undefined. Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002–13: a multicentre retrospective. Elsevier,
30. Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis,
31. Chang T, Wu E, Lu C, Huang S, ... TY-J of microbiology, 2018 undefined. Pathogens and outcomes in pediatric septic shock patients supported by extracorporeal membrane oxygenation. Elsevier,
32. Walker O, Kenny CB, Goel N. Neonatal sepsis. *Paediatr Child Heal (United Kingdom)*. 2019;29(6):263–8.
33. Vincent J-L, Takala J. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. 1996;
34. Takeuchi O, Cell SA-, 2010 undefined. Pattern recognition receptors and inflammation. Elsevier,
35. Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*. 2007;
36. Van Der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. 2008;8.
37. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. Vol. 131, *British Journal of Haematology*. 2005. p. 417–30,
38. ECKLE I, SEITZ R, EGBRING R, ... KG-... chemistry H, 1991 undefined. Protein C degradation in vitro by neutrophil elastase. [2/bchm3.1991.372.2.1007/bchm3.1991.372.2.1007.xml](https://pubs.bchm3.1991.372.2.1007/bchm3.1991.372.2.1007.xml)
39. Taylor J, Chang A, Ruf W, ... JM-C, 1991 undefined. Lethal E. coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. europepmc.org,

40. Biemond B, Levi M, Cate H Ten, Science TVDP-C, 1995 undefined. Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor I release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect of interventions in the cytokine and. clinsci.org,
41. Buchman G, Karl IE, Osborne F, Freeman BD, Cobb JP, Robert T, et al. Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. J Immunol Ref [Internet]. 2019;166:6952–63,
42. Heagy W, Hansen C, Nieman K, Cohen M, Richardson C, Rodriguez JL, et al. Impaired ex vivo lipopolysaccharide-stimulated whole blood tumour necrosis factor production may identify patients in the intensive care unit with ‘sepsis’ and multiple system organ failure . Br J Surg. 2000 Jul;87(7):948–948.
43. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, et al. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. PLoS One. 2014 Jun 11;9(6).
44. Heagy W, Nieman K, Hansen C, Cohen M, Danielson D, West MA. Lower Levels of Whole Blood LPS-Stimulated Cytokine Release Are Associated with Poorer Clinical Outcomes in Surgical ICU Patients. Surg Infect (Larchmt). 2003 Jul 16;4(2):171–80.
45. Jones A, Clinics MP-CCN, 2011 undefined. Sepsis-induced tissue hypoperfusion. ccnursing.theclinics.com
46. Vieillard-Baron A. Septic cardiomyopathy. Vol. 1, Annals of Intensive Care. 2011. p. 1–7.
47. Poelaert J, Declerck C, Vogelaers D, Colardyn F, Visser CA. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. Intensive Care Med. 1997;23(5):553–60.
48. Parker MM, Shelhamer JH, Stephen L, Bacharach M V, Green C, Natanson TM, et al. Profound but Reversible Myocardial Depression in Patients with Septic Shock [Internet]. Vol. 100, Annals of Internal Medicine. 1984.
49. Shapiro N, Howell M, Talmor D, ... LN-A of emergency, 2005 undefined. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. Elsevier,
50. Jardin F, Fourme T, Page B, Loubiè Y, Vieillard-Baron A, Beauchet A, et al.

- Persistent Preload Defect in Severe Sepsis Despite Fluid Loading* A Longitudinal Echocardiographic Study in Patients With Septic Shock,
51. Koh IHJ, Menchaca-Diaz JL, Koh TH, Souza RL, Shu CM, Rogerio VE, et al. Microcirculatory evaluation in sepsis: A difficult task. Vol. 34, Shock. 2010. p. 27–33.
 52. Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. Vol. 18, Critical Care. BioMed Central Ltd.; 2014.
 53. Jung C, Lauten A, Ferrari M. Microcirculation in cardiogenic shock: From scientific bystander to therapy target. Vol. 14, Critical Care. 2010.
 54. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Lancet JL-T, 2002 undefined. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. Elsevier,
 55. Wolinsky H. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. Vol. 47, Circulation Research. 1980. p. 301–11.
 56. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. 2003;
 57. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. Vol. 122, Journal of Clinical Investigation. 2012. p. 2731–40.
 58. Alobaidi R, Basu RK, Goldstein SL, Bagshaw SM. Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. Vol. 35, Seminars in Nephrology. W.B. Saunders; 2015. p. 2–11.
 59. Ishikawa K, May CN, Gobe G, Langenberg C, Bellomo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: A different view of tubular injury. Contrib Nephrol. 2010;165:18–27.
 60. Doig CJ, Sutherland LR, Sandham JD, Fick GH, Verhoef M, Meddings JB. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. Am J Respir Crit Care Med. 1998;158(2):444–51.
 61. Schmid-Schönbein GW, Chang M. The autodigestion hypothesis for shock and multi-organ failure. In: Annals of Biomedical Engineering. Kluwer Academic Publishers; 2014. p. 405–14.

62. Ziaja M. Septic encephalopathy topical collection on infection. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(10).
63. Puthuchery ZA, Rawal J, McPhail M, Connolly B, Ratnayake G, Chan P, et al. Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2013;310(15):1591–600.
64. Hartl W, Nutrition KJ-, 2014 undefined. Metabolic self-destruction in critically ill patients: origins, mechanisms and therapeutic principles. Elsevier
65. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Review Article Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets-An Updated View. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013;2013:16.
66. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology.* 2013. p. 722–37.
67. Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. Pathways mediating resolution of inflammation: When enough is too much. Vol. 231, *Journal of Pathology.* 2013. p. 8–20.
68. Levy BD, Serhan CN. Resolution of Acute Inflammation in the Lung. *Annu Rev Physiol.* 2013 Dec 7;76(1):467–92.
69. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In: *Critical Care Medicine.* 2003. p. 1250–6.
70. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010 Oct;90(4):1383–435.
71. biology AC-T in cell, 2004 undefined. Autophagy: in sickness and in health. Elsevier,
72. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, et al. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev Cell.* 2011;
73. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: Lesser-known self-eating. Vol. 69, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2012. p. 1125–36.
74. Bandhyopadhyay U, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: Lessons from α -synuclein. *Exp Gerontol.* 2007;
75. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Selectivity pays off. *Trends in*

- Endocrinology and Metabolism. 2010.
76. Gomes LR, Menck CFM, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy prevents cellular transformation by regulating MYC proteasomal degradation. *Autophagy*. 2017 May 4;13(5):928–40.
 77. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. Vol. 15, *Nature Cell Biology*. 2013. p. 713–20.
 78. Klionsky DJ. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade Structural Characterization of the Atg1 Kinase Complex View project Muscle Regeneration View project. *Artic Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;
 79. Death C. *Autophagy and Cell Death*. 2007;78(06):217–45.
 80. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism.
 81. Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? Vol. 7, *Autophagy*. Taylor and Francis Inc.; 2011. p. 457–65.
 82. Shani G, Marash L, Gozuacik D, Bialik S, Teitelbaum L, Shohat G, et al. Death-Associated Protein Kinase Phosphorylates ZIP Kinase, Forming a Unique Kinase Hierarchy To Activate Its Cell Death Functions. *Mol Cell Biol*. 2004;24(19):8611–26,
 83. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011 Mar 3;27(1):107–32.
 84. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome Formation in Mammalian Cells. Vol. 27, *CELL STRUCTURE AND FUNCTION*. 2002.
 85. Ravanan P, Srikumar I, sciences PT-L, 2017 undefined. Autophagy: the spotlight for cellular stress responses. Elsevier,
 86. Mizushima N. *Autophagy: process and function*. 2007,
 87. Tooze SA. The origin of the autophagosomal membrane Function of the VATPase accesory sibunit Ac45 and acidificatiion in the secretory pathway View project LRRK2 role in macroautophagy View project. *Artic Nat Cell Biol*. 2010,

88. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013 Mar 21;495(7441):389–93.
89. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, ... CP-N cell, 2010 undefined. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *nature.com*
90. Wang J, Davis S, Zhu M, Miller EA, Ferro-Novick S. Autophagosome formation: Where the secretory and autophagy pathways meet. Vol. 13, *Autophagy*. Taylor and Francis Inc.; 2017. p. 973–4.
91. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. MTOR regulation of autophagy. Vol. 584, *FEBS Letters*. Elsevier; 2010. p. 1287–95.
92. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura SI, Natsume T, Hara T, Mizushima N. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*. 2009 Oct 1 [cited 2020 Jun 26];5(7):973–9,
93. Chan EYW, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Aug 31 [cited 2020 Jun 26];282(35):25464–74,
94. Qi S, Kim DJ, Stjepanovic G, Hurley JH. Structure of the human Atg13-Atg101 HORMA heterodimer: An interaction hub within the ULK1 complex. *Structure*. 2015 Oct 6;23(10):1848–57.
95. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. *Science* (80-). 2011 Nov 4,
96. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. 2010 Apr 16;141(2):290–303,
97. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous Sclerosis Complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*. 2003 Aug 5;13(15):1259–68.
98. Hung CM, Garcia-Haro L, Sparks CA, Guertin DA. mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2012 Dec 1;

4(12):a008771.

99. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol Cell*. 2008 Apr 25;30(2):214–26.
100. Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol*. 2010 Oct 4;191(1):155–68,
101. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms [Internet]. Vol. 221, *Journal of Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2010,
102. Morris DH, Yip CK, Shi Y, Chait BT, Wang QJ. Beclin 1-Vps34 complex architecture: Understanding the nuts and bolts of therapeutic targets. Vol. 10, *Frontiers in Biology*. Higher Education Press; 2015. p. 398–426,
103. Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, Otomo T. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2013 Jan 2 [cited 2020 Jun 26];20(1):59–66,
104. Holland P, Knævelsrud H, Sørensen K, Mathai BJ, Lystad AH, Pankiv S, et al. HS1BP3 negatively regulates autophagy by modulation of phosphatidic acid levels. *Nat Commun*. 2016 Dec 22;7(1):1–13,
105. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008;445:77–88.
106. Padman BS, Nguyen TN, Lazarou M. Autophagosome formation and cargo sequestration in the absence of LC3/GABARAPs. *Autophagy*. 2017 Apr 3;13(4):772–4.
107. Zhang J. Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists- Mechanisms and experimental approaches [Internet]. Vol. 4, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2015. p. 242–59.
108. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005 Nov 21
109. Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem*. 2012;3(1):1,
110. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun JA, et al. A Role for

- NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol Cell*. 2009 Feb 27;33(4):505–16,
111. Ganley IG. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem*. 2013;55(1):65–78,
 112. McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, et al. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell*. 2015 Jan 8;57(1):39–54,
 113. Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T, et al. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell* . 2014 Apr 15;25(8):1327–37.
 114. Zhao T, Huang X, Han L, Wang X, Cheng H, Zhao Y, et al. Central role of mitofusin 2 in autophagosome-lysosome fusion in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2012 Jul 6;287(28):23615–25,
 115. Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced Autophagy. *Sci Signal*. 2010 May 25;3(123),
 116. Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordini M, et al. MTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol*. 2013 Apr 24;15(4):406–16,
 117. Chaturvedi A, Dorward D, Pierce SK. The B Cell Receptor Governs the Subcellular Location of Toll-like Receptor 9 Leading to Hyperresponses to DNA-Containing Antigens. *Immunity*. 2008 Jun 13 ;28(6):799–809,
 118. Biswas D, Qureshi OS, Lee WY, Croudace JE, Mura M, Lammas DA. ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunol*. 2008 Jul 15;9,
 119. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol*. 2010 Sep 6;190(5):881–92.
 120. Pilli M, Arko-Mensah J, Ponpuak M, Roberts E, Master S, Mandell MA, et al. TBK-1 Promotes Autophagy-Mediated Antimicrobial Defense by Controlling Autophagosome Maturation. *Immunity*. 2012 Aug 24 ;37(2):223–34,
 121. Espert L, Beaumelle B, Vergne I. Autophagy in *Mycobacterium tuberculosis*

- and HIV infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5(JUN).
122. Singh SB, Ornatowski W, Vergne I, Naylor J, Delgado M, Roberts E, et al. Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat Cell Biol.* 2010 Dec;12(12):1154–65,
 123. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, et al. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* 2009;10(3):285–92,
 124. Fabri M, Stenger S, Shin DM, Yuk JM, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN- γ -mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med.* 2011 Oct 12;3(104),
 125. Mostowy S, Sancho-Shimizu V, Hamon MA, Simeone R, Brosch R, Johansen T, et al. p62 and NDP52 proteins target intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. *J Biol Chem.* 2011 Jul 29 ;286(30):26987–95,
 126. Harris J, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M, et al. T Helper 2 Cytokines Inhibit Autophagic Control of Intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Immunity.* 2007 Sep 21;27(3):505–17,
 127. Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H, et al. Cytoplasmic STAT3 Represses Autophagy by Inhibiting PKR Activity. *Mol Cell.* 2012 Dec 14;48(5):667–80,
 128. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007 Apr 4;26(7):1749–60,
 129. Yang CS, Lee JS, Rodgers M, Min CK, Lee JY, Kim HJ, et al. Autophagy protein rubicon mediates phagocytic NADPH oxidase activation in response to microbial infection or TLR stimulation. *Cell Host Microbe.* 2012 Mar;11(3):264–76,
 130. Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, Imarisio S, Fleming A, Williams A, et al. Complex Inhibitory Effects of Nitric Oxide on Autophagy. *Mol Cell.* 2011 Jul 8;43(1):19–32,
 131. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: Tilting toward immunosuppression. Vol. 15, *Nature Medicine.* Nature

- Publishing Group; 2009. p. 496–7,
132. Zi Z, Song Z, Zhang S, Ye Y, Li C, Xu M, et al. Rubicon deficiency enhances cardiac autophagy and protects mice from lipopolysaccharide-induced lethality and reduction in stroke volume. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;65(3):252–61.
 133. Chien W-S, Chen Y-H, Chiang P-C, Hsiao H-W, Chuang S-M, Lue S-I, et al. Suppression of Autophagy in Rat Liver at Late Stage of Polymicrobial Sepsis. *Shock*. 2011 May;35(5):506–11,
 134. Lin CW, Lo S, Perng DS, Wu DBC, Lee PH, Chang YF, et al. Complete activation of autophagic process attenuates liver injury and improves survival in septic mice. *Shock*. 2014 Mar;41(3):241–9,
 135. Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, et al. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care*. 2013 Jul 24;17(4):R160,
 136. Ho J, Yu J, Wong SH, Zhang L, Liu X, Wong WT, et al. Autophagy in sepsis: Degradation into exhaustion? *Autophagy*. 2016 Jul 2 ;12(7):1073–82,
 137. Hsieh CH, Pai PY, Hsueh HW, Yuan SS, Hsieh YC. Complete induction of autophagy is essential for cardioprotection in sepsis. *Ann Surg*. 2011 Jun;253(6):1190–200,
 138. Fang S, Su J, Liang B, Li X, Li Y, Jiang J, et al. Suppression of autophagy by mycophenolic acid contributes to inhibition of HCV replication in human hepatoma cells. *Sci Rep*. 2017 Mar 9;7,
 139. Hsieh YC, Athar M, Chaudry IH. When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis . Vol. 15, *Trends in Molecular Medicine*. Trends Mol Med; 2009. p. 129–38,
 140. Zhang L, Cardinal JS, Bahar R, Evankovich J, Huang H, Nace G, et al. Interferon regulatory factor-1 regulates the autophagic response in LPS-stimulated macrophages through nitric oxide. *Mol Med*. 2012 Feb;18(2):2018
 141. Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy During Cardiac Stress: Joys and Frustrations of Autophagy. *Annu Rev Physiol*. 2010 Mar 17;72(1):45–59,
 142. Schlag G, Redl H. Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure - Google Books.
 143. Mizushima N. In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient

- Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Mol Biol Cell*. 2003;
144. Kolmogorova D, Murray E, Ismail N. Monitoring Pathogen-Induced Sickness in Mice and Rats. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2017;
 145. Shrum B, Anantha R V, Xu SX, Donnelly M, Haeryfar SMM, McCormick JK. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. 2014;1–11.
 146. Li W, Hua L, Qu P, Yan W, ... CM-A of medical, 2016 undefined. NLRP3 inflammasome: a novel link between lipoproteins and atherosclerosis. ncbi.nlm.nih.gov,
 147. Ghanta S, Tsoyi K, Liu X, Nakahira K, Ith B, Coronata AA, et al. Mesenchymal stromal cells deficient in autophagy proteins are susceptible to oxidative injury and mitochondrial dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017 Mar 1; 56(3):300–9,
 148. Casaer MP, Van den Berghe G. Nutrition in the Acute Phase of Critical Illness. *N Engl J Med*. 2014 Mar 27;370(13):1227–36,
 149. Mai SHC, Sharma N, Kwong AC, Dwivedi DJ, Khan M, Grin PM, et al. Body temperature and mouse scoring systems as surrogate markers of death in cecal ligation and puncture sepsis. *Intensive Care Med Exp*. 2018;6(1).

EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

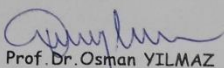
35340 Inciraltı İzmir-232 4122234

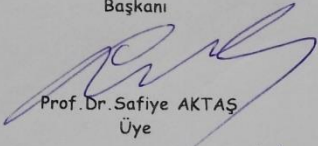
Gündem No/Toplantı No/Yıl : 03/05/2018
Toplantı Tarihi : 06 Mart 2018

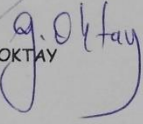
DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı'na

19/2018 Protokol No'lu; Anabilim Dalınız Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Hasan ÖZKAN'ın yürütücüsü olduğu "Sepsis modeli oluşturulan farelerde ortaya çıkan iştah azalması, otofajiyi aktive eden fizyolojik bir olay mıdır?" isimli, Gizem BAKIR ÜSTÜNDAĞ, Funda TÜZÜN, Nuray DUMAN, Kemal Uğur TUFEKÇİ, Şermin GENÇ, Pembe KESKİNOĞLU, Abdullah KUMRAL'ın araştırmacı olduğu, 60.. adet farenin talep edildiği projede;

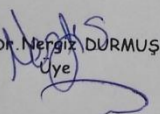
- Normokalik diyetin hangi birime tekabül ettiğinin açıklanması,
- Sepsis oluşumunun nasıl belirlendiğinin açıklanması ve takip kriterlerinin belirtilmesi,
- Hayvanların dışkılarını yeme özelliğinden kaynaklanan enerji ve vitamin eksikliği nedeni ile oluşan ihtiyacın nasıl giderileceğinin açıklanması,
- İmmühistokimyasal değerlendirmeler ve histopatolojik incelemenin ayrıntılarının belirtilmesi ve her iki analizinde kim tarafından, nasıl ve nerede yapılacağına belirtilmesi,
- Kanda bakılacak parametrelerin açıklanması gerekmektedir.
- Proje yürütücüsünün bir sonraki Etik Kurul toplantısına davet edilmesi uygun bulunmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


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

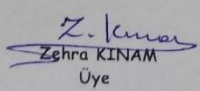

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Üye


Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Üye

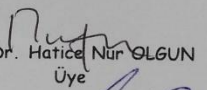
Prof. Dr. Türkan ERTAY
Üye (Topl. Katılmadı)

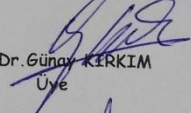

Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ
Üye

Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

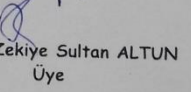

Zehra KINAM
Üye

Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili
(Topl. Katılmadı)


Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye


Prof. Dr. Günay KIRKIM
Üye

Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman


Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye

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

Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye

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