

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**6-Shogaol Ve 6-Gingerol' Un Lps İle İndüklenmiş Endotoksemide Cox-2
Üzerinden Etkileri**

Proje No: TDK-2013-4622

Tez Projesi, Doktora

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr. Mükerrerem Betül AYCAN
Eczacılık Fakültesi/Farmakoloji AD

Araştırmacı
Bilge CUMAOĞLU
Eczacılık Fakültesi/Farmakoloji AD

Bu proje Erciyes Üniversitesi BAP Birimi tarafından doktora tezi olarak desteklenmiştir.

Haziran 2015

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

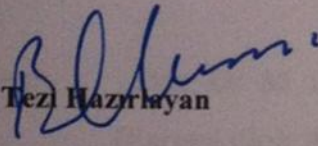
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Bilge CUMAOĞLU

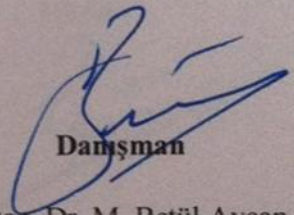
İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

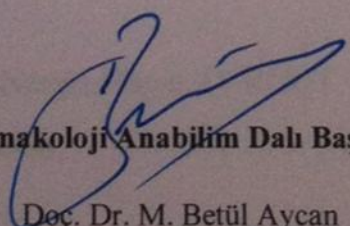
“6-Shogaol ve 6-Gingerol’ ün Lps İle İndüklenmiş Endotoksemide Cox-2 Üzerinden Etkileri” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.


Tezi Hazırlayan

Bilge CUMAOĞLU


Danışman

Doç. Dr. M. Betül Aycan


Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

Doç. Dr. M. Betül Aycan

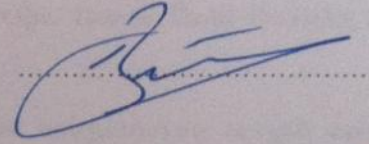
Doç. Dr. M. Betül AYCAN danışmanlığında Bilge CUMAOĞLU tarafından hazırlanan "6-Shogaol ve 6-Gingerol'un LPS İle İndüklenmiş Endotoksemide COX-2 Üzerinden Etkileri" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

12.06/2015

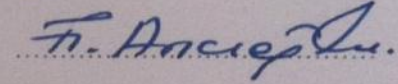
JÜRİ

İmza

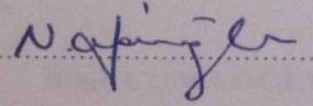
Danışman : Doç. Dr. M. Betül AYCAN
(Farmakoloji ABD)



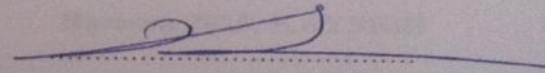
Üye : Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
(Farmakoloji ABD)



Üye : Doç. Dr. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI
(Eczacılık Temel Bilimler ABD)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Zafer SEZER
(Farmakoloji ABD)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Nergiz Hacer TURGUT
(Farmakoloji ABD)



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 03.7.2015 tarih ve 684 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

03.07/2015
Prof. Dr. Sait ÖZDAMAR



6-SHOGAOL VE 6-GİNGEROL' ÜN LPS İLE İNDÜKLENMİŞ ENDOTOKSEMİDE COX-2 ÜZERİNDEN ETKİLERİ

Bilge CUMAOĞLU

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Haziran 2015
Danışman: Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

ÖZET

Çalışmamızda, geleneksel Çin tıbbında enflamasyon ve oksidatif hasarın neden olduğu çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan *Zingiber officinale* Rosc. (Zingiberaceae) bitkisinden elde edilen 6-shogaol ve 6-gingerol'ün enflamasyonda in vivo etkileri araştırıldı.

Deneylerde; Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden sağlanan ağırlıkları 300±25 g arasında değişen 10 haftalık 36 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deneyler; kontrol, 6-shogaol, 6-gingerol, LPS (Lipopolisakkarit), LPS+ 6-shogaol, LPS+ 6-gingerol olmak üzere 6 grup üzerinde gerçekleştirildi. Endotoksemi; hayvanlara 15 mg/kg LPS uygulanarak oluşturuldu ve tedavi gruplarında 6-gingerol ve 6-shogaol 4 mg/kg dozlarında intraperitoneal uygulandı. Alınan serum örneklerinde TNF- α (Tümör nekrozis faktör- α), IL-1 β (İnterlökin-1 β), IL-6(İnterlökin 6), IL-10(İnterlökin 10), NO(Nitrik oksit) ve PGE2(Prostaglandin E2)düzeyleri ölçüldü. Karaciğer ve böbrek dokularında ise COX-2(Siklooksijenaz 2) ve iNOS(indüklenebilir nitrik oksit sentaz) enzim aktivitelerine, PGE2 düzeylerine bakıldı. Yine bu doku homojenatlarında western blot analizi ile COX-2 ve iNOS protein miktarlarına, RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile COX-2, iNOS ve mPGES-1(mikrozomal prostaglandin E sentaz 1) enzimlerinin mRNA düzeyleri ölçüldü.

LPS uygulanan grupta TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, NO ve PGE2 düzeylerinin kontrol grubuna göre ($p<0,05$) yükseldiği gözlenirken 6-shogaol ve 6-gingerol ile tedavi gruplarında azalma ($p<0,05$) meydana gelmiştir. Karaciğer dokusunda PGE2 düzeyleri ve COX-2 enzim aktivitesi açısından gruplar arasında fark gözlenmezken böbrek dokusunda tedavi gruplarında artış ($p<0,05$) meydana gelmiştir. iNOS enzim aktivitesi ise hem karaciğer hem de böbrek dokusunda 6-gingerol ile tedavi gruplarında azalmıştır

($p<0,05$). Karaciğer dokusu western blot analizinde COX-2 ve iNOS enzim miktarları LPS uygulaması ile artmış ve tedavi gruplarında azalmıştır ($p<0,05$). Karaciğer dokusunda COX-2, iNOS ve mPGES-1 enzimlerinin mRNA düzeyleri LPS uygulaması ile artmış tedavi gruplarında azalmıştır ($p<0,05$). Böbrek dokusunda COX-2 enzimi mRNA düzeyi LPS uygulaması ile artmış tedavi gruplarında azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). iNOS ve mPGES-1 enzimlerinde LPS ile artış ise tedavi gruplarında artmaya devam etmiştir ($p<0,001$; $p<0,05$).

Sonuç olarak 6-gingerol ve 6-shogaol'ün, ratlarda LPS ile indüklenmiş endotoksemiye karşı etkilerinin ilk defa araştırıldığı bu çalışma ile zencefilin antienflamatuar etkilerinin bu bileşenlerinden kaynaklanabileceği ve bu antienflamatuar etkinin de, proenflamatuar sitokinleri, iNOS ve COX-2 enzim aktivitelerini ve bunların NO, PGE2 gibi ürünlerini sistemik olarak azaltmasından kaynaklandığı ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 6-Gingerol, 6-Shogaol, COX-2, PGE2, Endotoksemi

THE EFFECT ON COX-2 OF 6-SHOGAOL AND 6-GINGEROL LPS-INDUCED ENDOTOXEMIA

Bilge CUMAOĞLU

**Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Pharmacology
Doctorate Thesis, June 2015
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Betül AYCAN**

ABSTRACT

In our study, we examined the in vivo effects of 6-shogaol and 6-gingerol during inflammation. These agents are subtracted from *Zingiber officinale* Rosc. (Zingiberaceae) and have been widely used in the treatment of various inflammatory and oxidative diseases in traditional Chinese medicine.

The experiments were performed on 36 ten weeks old Wister Albino type male rats which are provided by Erciyes University Experimental and Clinical Research Center and their weights were ranging between 300 ± 25 grams. The subjects were categorized into six groups as controls, 6-shogaol, 6-gingerol, LPS (Lipopolysaccharide), LPS plus 6-shogaol, LPS plus 6-gingerol. Endotoxicity was created by applying 15 mg / kg LPS and the treatment groups received 4 mg/kg 6-gingerol and 6-shogaol intraperitoneally. Blood serum levels of TNF- α (Tumor necrosis factor alpha), IL-1 β (Interleukin 1 beta), IL-6 (Interleukin 6), IL-10 (Interleukin 10), NO (Nitric oxide) and PGE₂(Prostaglandin E₂) were measured. The activities of COX-(Cyclooxygenase-2) and iNOS(Inducible nitric oxide synthase) enzymes and the levels of PGE₂ were examined on the kidney and liver tissues of animals. On aforementioned tissue homogenates, we measured the amounts of COX-2 and iNOS protein by western blotting, and the mRNA levels of COX-2, iNOS and mPGES-1(Microsomal Prostaglandin E₂ syntase-1) enzymes through RT-PCR (Real time polymerase chain reaction)

It was observed that the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, NO and PGE₂ were elevated in LPS applied group when compared to the controls ($p < 0,05$), the levels were decreased in the treatment groups with 6-shogaol and 6-gingerol ($p < 0,05$). There was no significant difference between the groups for the COX-2 and PGE₂ enzyme activities in

liver tissue, however the treatment groups demonstrated higher activity in kidney tissue ($p<0,05$). The western blotting analysis of liver tissues showed that COX-2 and iNOS enzyme amounts were increased with LPS application and decreased in the treatment groups ($p<0,05$). In that liver tissues, the mRNA levels of COX-2, iNOS and mPGES-1 enzymes were increased with LPS application and decreased in the treatment groups ($p<0,05$). In the kidney tissues, COX-2 enzyme mRNA levels were increased with LPS application and decreased in the treatment groups ($p<0,05$). iNOS and mPGES-1 enzyme levels were elevated with LPS application in the kidney tissues, including the treatment groups ($p<0,001$, $p<0,05$).

As a conclusion, in this first study looking for the effects of 6-gingerol and 6-shogaol against LPS induced endotoxicity on rats, it was demonstrated that the anti-inflammatory effects of ginger might be through these molecules and these anti-inflammatory effects work by systematically diminishing the activities of pro-inflammatory cytokines, iNOS and COX-2 enzymes and their products like NO and PGE₂.

Keywords: 6-gingerol, 6-shogaol, COX-2, PGE₂, Endotoxemia

İÇİNDEKİLER

6-SHOGAOL VE 6-GİNGEROL' UN LPS İLE İNDÜKLENMİŞ ENDOTOKSEMİDE COX-2 ÜZERİNDEN ETKİLERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
ONAY	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. SEPSİS	3
2.1.1.Tanımlar.....	3
2.1.2. Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	6
2.1.3. Fiziopatolojisi	7
2.2. ENFLAMATUAR YANIT	9
2.2.1. Araşidonik Asit(Eikazonoidler) ve Ürünleri.....	9
2.2.1.1. Siklooksijenaz-2(COX-2) ve Ürünleri	10
2.2.1.2. Lipooksijenaz ve Ürünleri.....	13
2.2.2. Sitokinler.....	14
2.2.3. Nitrik Oksit Sentaz ve Nitrik Oksit.....	18
2.3. <i>Zingiber officinale</i> (ZENCEFİL).....	22
2.3.1. 6-Gingerol.....	24
2.3.2. 6-Shogaol.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	26

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	27
3.3. Deney Hayvanları ve Deney Grupları	30
3.4. Serum TNF- α Düzeylerinin Ölçülmesi	33
3.5. Serum IL-6 Düzeylerinin Ölçülmesi	34
3.6. Serum IL-1 β Düzeylerinin Ölçülmesi	34
3.7. Serum IL-10 Düzeylerinin Ölçülmesi	35
3.8. Serum Total Nitrit/Nitrat Düzeylerinin Ölçülmesi.....	35
3.9. Serum ve Doku Homojenatında PGE ₂ Düzeylerinin Ölçülmesi	36
3.10. Doku Homojenatında iNOS Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	37
3.11. Doku Homojenatında COX-2 Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	38
3.12. Lowry İle Protein Miktar Tayini	38
3.13. Western Blot Deneyi	39
3.14. RNA İzolasyonu ve qRT-PCR Deneyi.....	42
3.15. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1.Pilot Çalışma Serum IL-6 ve IL-1 β Düzeyleri	45
4.2. Serum TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 Düzeyleri.....	46
4.3. Serum Total Nitrit/Nitrat Düzeyleri	49
4.4. Serum ve Doku Homojenatı PGE ₂ Düzeyleri.....	49
4.5. Doku Homojenatı iNOS Enzim Aktivitesi.....	51
4.6. Doku Homojenatı COX-2 Enzim Aktivitesi	52
4.7. Lowry İle Protein Miktar Tayini	53
4.8. Western Blot Deneyi Sonuçları.....	53
4.9. qRT-PCR Deneyi Sonuçları	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR	65
EKLER.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	76

KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
12-HPETE	: 12-hidroperoksieikozatetraenoik asid
13-HODE	: 13-hidroksioktedekadienoik asid
5-LOaz	: 5-Lipooksijenaz
ACCP/SCCM	: American Collage of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine
ANOVA	: Varyans analizi
AP	: Alkalen Fosfataz
APS	: Amonyumpersülfat
BEAS-2B	: Bronşial Epitelyal Cell Line
BH4	: Tetrahidrobiyopterin
BSA	: Bovine Serum Albumin
BV-2	: Microglial Cell Line
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
COX	: Siklooksijenaz
cPGES	: Sitozolik Prostaglandin E Sentaz
CRP	: C Reaktif Protein
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotit Karışımı
DTT	: Dithiothreitol
EP	: Prostaglandin E Reseptörü
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotid
FMN	: Flavın Mono Nükleotid
g	: Gram
HL-60	: Promyelocytic Leukemia Cell Line
IFN-γ	: İnterferon gama
IL-10	: İnterlökin 10
IL-1β	: İnterlökin-1β
IL-2	: İnterlökin 2

IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
JNK	: c-Jun N-terminal kinases
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
LBP	: Lipopolisakkarit Bağlayan Protein
LPS	: Lipopolisakkarit
LTA₄	: Lökotrien A ₄
LTB₄	: Lökotrien B ₄
LTC₄	: Lökotrien C ₄
LTD₄	: Lökotrien D ₄
LTE₄	: Lökotrien E ₄
mA	: Miliamper
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinases
mg	: Miligram
mm³	: milimetreküp
mmHg	: milimetre civa
MODS	: Multiple Organ Fonksiyon Bozukluğu Sendromu
mPGES	: Mikrozomal prostaglandin E sentaz
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik asit
N	: Normalite
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa β
NK	: Doğal Katil Hücreler
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
NO•	: Nitrik oksit radikali
NO²⁻	: Nitrit
NO³⁻	: Nitrat
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
OONO⁻	: Peroksinitrit
PaCO₂	: Parsiyel Arteriyel Karbondioksit Basıncı
PAF	: Platelet Aktivatör Faktör

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCT	: Prokalsitonin
pg	: Pikogram
PG	: Prostaglandin
PGDS	: Prostaglandin D sentaz
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PGES	: Prostaglandin E sentaz
PGFS	: Prostaglandin F sentaz
PGH₂	: Prostaglandin H ₂
PGHS	: Prostaglandin H sentaz
PGI₂	: Prostaglandin I ₂
PGIS	: Prostatiklin sentaz
pNPP	: P-nitrofenil fosfat
PVDF	: Polivinilidenflorür
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAW 264.7	: Macrophage Like Cell Line
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAaz	: Ribonükleik Asit Sentaz
RT	: Revers Transkriptaz
SDS	: Sodyum Dodecyl Sülfat
SIRS	: Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu
TACE	: TNF- α dönüştürücü enzim
TBS	: Tris-Buffered Saline
TBST	: Tris-Buffered Saline-Tween
TEMED	: N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylenediamine
TNB	: 5-thio-2-(nitrobenzoikasit)
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
TSST-1	: Toksik Şok Sendromu Toksini-1
TxA₂	: Tromboksan A ₂
V	: Voltaj

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Sepsise Neden Olan Mikroorganizmalar ve Konağın Durumu.....	7
Tablo 2.2. Sepsis Patogenezinde Rol Oynayan Sitokinler ve Temel Fizyolojik Etkileri.....	9
Tablo 2.3. Nitrik oksit sentezleyen enzimler.....	18
Tablo 3.1. Yığınlayıcı ve ayırıcı jel çözeltileri içerikleri	39
Tablo 3.2. cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve 1 reaksiyon için gerekli miktarları	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Enfeksiyon, Sepsis ve SIRS arasındaki ilişki(16)	5
Şekil 2.2.	Sepsisin Fizyopatolojisi(24)	8
Şekil 2.3.	Araşidonik Asit ve Ürünleri(26)	10
Şekil 2.4.	Siklooksijenaz Ürünleri(29)	11
Şekil 2.5.	Lipooksijenaz Ürünleri (29)	13
Şekil 2.6.	Sitokinlerin sepsiste plazma konsantrasyonlarının zamana göre değişimi .	14
Şekil 2.7.	Enfeksiyon Şiddetine Göre Serum PCT Düzeyleri(48,49)	17
Şekil 2.8.	Sepsiste iNOS aktivitesinin artması (62)	20
Şekil 2.9.	NO biyosentezi (69)	22
Şekil 2.10.	Zencefil Rizomu	23
Şekil 2.11.	6-Gingerol Molekül Yapısı (76)	24
Şekil 2.12.	6-Shogaol Molekül Yapısı (78)	25
Şekil 3.1.	Pilot Çalışma Deney Grupları	31
Şekil 3.2.	Ana Çalışma Deney Grupları	32
Şekil 3.3.	2000 pg/ml Ana Stok TNF- α Çözeltisinden Standartların Hazırlanması....	33
Şekil 3.4.	Rat TNF- α ELİSA Kit Deney Prosedürü Özeti.....	34
Şekil 3.5.	Griess yöntemi ile Nitrat/Nitrit tayini	35
Şekil 3.6.	PGE ₂ standart eğrisi	36
Şekil 3.7.	PGE ₂ ELİSA Kit Deney Prosedürü Özeti	37
Şekil 3.8.	BSA standart eğrisi.....	38
Şekil 3.9.	Western blot jel dökme aparatı, elektroforez tankı ve güç kaynağı	39
Şekil 3.10.	Örneklerin kuyulara yüklenmesi	40
Şekil 3.11.	Örneklerdeki proteinlerin jelde göçü.....	40
Şekil 3.12.	Western blot transfer tankı	41
Şekil 3.13.	Western blot transfer tankı ve transfer sandviçi hazırlanması	41
Şekil 4.1.	Pilot Çalışma Serum IL-6 Düzeyleri (%kontrol)	45

Şekil 4.2.	Pilot Çalışma Serum IL-1 β Düzeyleri (%kontrol)	46
Şekil 4.3.	Serum TNF- α düzeyleri (pg/mL)	47
Şekil 4.4.	Serum IL-1 β düzeyleri (pg/mL)	47
Şekil 4.5.	Serum IL-6 düzeyleri(pg/mL)	48
Şekil 4.6.	Serum IL-10 düzeyleri (%kontrol)	48
Şekil 4.7.	Serum Total Nitrit/Nitrat Miktarı (μ M),	49
Şekil 4.8.	Serum PGE ₂ miktarı (%kontrol)	50
Şekil 4.9.	Karaciğer dokusu PGE ₂ miktarı değişimi (%kontrol)	50
Şekil 4.10.	Böbrek dokusu PGE ₂ miktarı değişimi (%kontrol),	51
Şekil 4.11.	Karaciğer dokusu iNOS enzim aktivitesi (nmol/L),	51
Şekil 4.12.	Böbrek dokusu iNOS enzim aktivitesi (nmol/L),	52
Şekil 4.13.	Karaciğer dokusu COX-2 enzim aktivitesi (nmol/L)	52
Şekil 4.14.	Böbrek dokusu COX-2 enzim aktivitesi (nmol/L),	53
Şekil 4.15.	iNOS enzimi western blot görüntüleri	54
Şekil 4.16.	Karaciğer dokusunda iNOS enzimine ait Western Blot görüntü konsantrasyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.	54
Şekil 4.17.	COX-2 enzimi western blot görüntüleri	55
Şekil 4.18.	Karaciğer dokusunda COX-2 enzimine ait Western Blot görüntü konsantrasyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.	55
Şekil 4.19.	iNOS enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)	56
Şekil 4.20.	COX-2 enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)	56
Şekil 4.21.	mPGES-1 enzimi gen ekspresyonu(%LPS	57
Şekil 4.22.	iNOS enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)	57
Şekil 4.23.	COX-2 enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)	58
Şekil 4.24.	mPGES-1 enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)	59

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endotokseminin neden olduğu sepsis, enflamasyonu ve enflamasyona karşıt yanıtı tetikleyerek inatçı hipotansiyon ve hipoperfüzyona bağlı olarak akciğer, karaciğer, böbrek, beyin gibi yaşamsal öneme sahip organlara yeterli kan ve oksijenin ulaşamaması sonucu bu organlarda giderek ilerleyen işlev bozukluklarının gelişmesine ve ölüme neden olur (1).

Enflamatuvar ve immün cevap, septik şokun patogeneğinde çok önemli bir rol oynar. Enflamasyon, prostaglandinlerin, prostasiklinin ve lökotrienlerin, sitokinlerin dokuda çeşitli etkenlerden ileri gelen lokal iltihap hallerinde iltihaplı bölgede konsantrasyonlarının yükseldiği durumdur. TNF-alfa ve IL-1 β gibi proenflamatuvar sitokinler septik şok kaskadındaki en önemli sitokinlerdir. Sitokinler; Fosfolipaz A₂, siklooksijenaz 2 (COX-2), nitrik oksit sentaz için gen ekspresyonunu ve protein sentezini aktive eder (2). Enflamatuvar yanıt ile indüklenen COX-2, prostaglandin H₂ (PGH₂) üretimini sağlamaktadır. PGH₂ prostaglandin E sentazlar ile PGE₂ ye dönüşmektedir. PGE₂, proenflamatuvar ve hiperaljezik etki yönünden en güçlü prostanoiddir (3). Enflamasyonla birlikte artan indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), nitrik oksit (NO) seviyesini yükseltmektedir (4).

Yüksek mortalite ile seyreden sepsiste vazgeçilmez tedavi seçeneği halen antibiyotikler olmakla birlikte, antibiyotiklere karşı hızlı direnç gelişimi nedeniyle yeni destek tedavilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Zencefil, Güneydoğu Asya'da doğal olarak yetişir. Nijerya, Hindistan, Tayvan ve Jamaikada kültürü yapılmaktadır.%5-8 oranında oleorezin taşır. %3 oranında uçucu yağ, oleorezinlerin %20-%25 ini oluşturur. Oleorezinlerin %25 ini oluşturan acı bileşikler; gingeroller, shogaoller ve ilgili fenolik keton türevlerinden oluşur (5). Zencefil rizomları, antiemetik, antienflamatuvar, antikansorejen, antidiyareik, antioksidan,

antiplatelet agregasyonu gibi etkileri nedeniyle Kore, Çin, Japonya geleneksel tıbbında sık kullanılmaktadır (6).

Antienflamatuar aktivitesi üzerine yapılan *in vivo* çalışmada, zencefil ekstresinin oral uygulanmasının sıçanlardaki pençe ödemi azalttığını göstermiştir. Ekstrenin etkinliği asetil salisilik asit etkinliği ile karşılaştırılabilir durumdadır. 6-shogaoller, sıçanlardaki karrageninle indüklenmiş pençe ödemi, siklooksijenaz aktivitesini inhibe ederek önlemiştir (7).

Lipopolisakkarit ile indüklenen HL-60 hücrelerinde yapılan çalışmada *Zingiber officinale*(zencefil) ekstresi karışımı denenmiş ve PGE₂ üretimini indometazin ile karşılaştırılabilir kadar iyi derecede inhibe ettiği gözlenmiştir (8). *Zingiber officinale*, üzerinde yapılan *in vitro* deneylerde PGF₂-α, PGE₂, ve PGD₂ sentezini doz bağımlı inhibe etmiştir (9). Gingerol, gingerdion, 6-shogaol gibi bazı bileşiklerin 5-lipooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği ve bazılarında 8-shogaol, 8-paradol ve 8-gingerolün etkin COX-2 inhibitörü olduğu gösterilmiştir (5). 6-shogaol'un BV-2 mikrogliya hücrelerinde enflamatuar yanıt üzerindeki etkisine bakılmıştır. Çalışma sonucunda COX-2, MAPK, NF-kβ ekspresyonunu azalttığı ve PGE₂'yi azalttığı bulunmuştur (10). 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol maddeleri lipopolisakkarit ile indüklenmiş enflamatuar yanıtı sahip RAW264.7 hücresinde PGE₂ üretimini doza bağımlı bir şekilde inhibe etmiştir (11). 6-gingerol ve 6-shogaol insan bronşial epitelyal hücrelerde(BEAS-2B) Lipopolisakkarit ile indüklenmiş proenflamatuar sitokinlerin sekresyonunu azaltmıştır (12).

Zencefilin etanollü ekstresinin *in vivo* ve *in vitro* antienflamatuar etkisi gösterilmiştir. Ekstrenin bu etkisinin hangi bileşeninden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. Zencefil ekstresinden elde edilen shogaol ve gingerol analoglarının makrofaj hücrelerinde PGE₂ ve NO üretimi üzerinde önemli inhibitör etkisi gösterilmiştir. 6-gingerol ve 6-shogaol'un lipopolisakkarit ile indüklenmiş ratlarda *in vivo* antienflamatuar etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmada lipopolisakkarit ile indüklenmiş endotokseminde karaciğer ve böbrek dokusunda 6-gingerol ve 6-shogaol'un COX-2, PGE₂ sentaz, iNOS düzeyleri üzerine ve PGE₂, NO miktarlarına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SEPSİS

Sepsis, Yunanca'da çürüme, bozulma, kokuşma anlamına gelmektedir (13). Tıp literatüründe ise uzun yıllar mikroorganizmanın kendisinin veya biyolojik aktif ürünlerinin insan organizmasında bulunması anlamında kullanılmıştır. Sepsis, konağın enfeksiyona verdiği enflamatuvar yanıt olarak tanımlanır. Konağın sepsiste verdiği yanıtlar ise temel olarak proenflamatuvar, antienflamatuvar ve her ikisinin birlikte olduğu durumlardır. Proenflamatuvar sitokinler immun cevabın başlaması ve sürdürülmesini sağlarlar. Antienflamatuvar sitokinler ise enflamasyonun daha sonraki evrelerinde salınarak aşırı sistemik enflamasyonun kötü sonuçlarını önlerler (14).

Ülkemizde sepsis ve buna bağlı ölüm oranına ilişkin oran vermek mümkün olmamakla birlikte özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda büyük sorun oluşturmaktadır.

2.1.1.Tanımlar

Sepsisin terminolojisini tanımlamak üzere Ağustos 1991 yılında bilim adamları bir araya gelmişlerdir. 'American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine' tarafından gerçekleştirilen bu konsensüs toplantısında sepsisle ilgili tanımlamalar ve sınıflandırmalar yapılmıştır. Haziran 1992 yılında yayınlanan bu tanımlar;

Enfeksiyon: Mikroorganizmaların varlığına karşı ortaya çıkan enflamatuvar yanıt ya da steril konak dokusunda mikroorganizmaların invazyonunu gösteren durumdur.

Bakteremi: Kanda canlı bakteri bulunmasıdır.

Sistemik Enflamatuvar Cevap Sendromu (SIRS): Farklı klinik uyarılara karşı konakta gelişen yanıtı tanımlar. Aşağıdaki bulgulardan en az ikisinin varlığı ile tanımlanır:

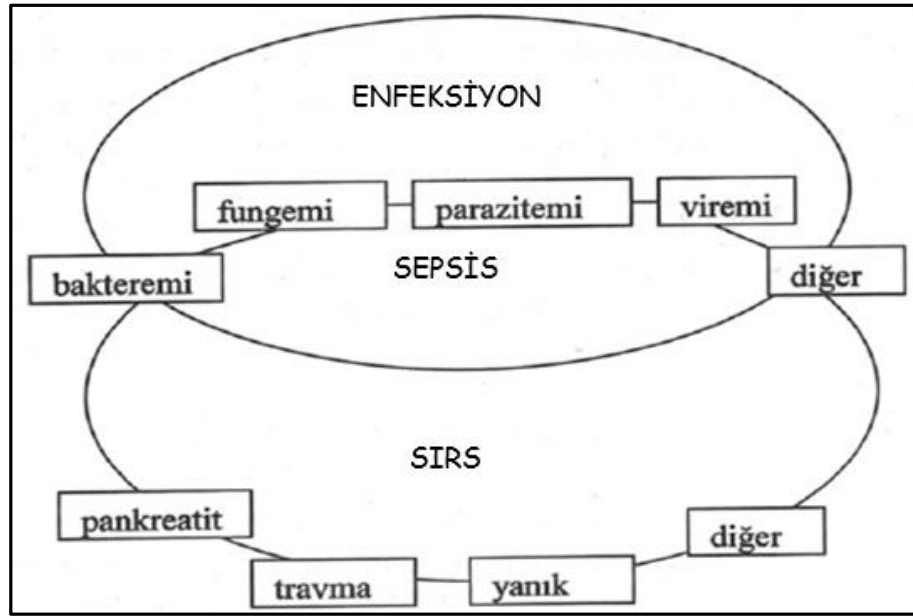
- Vücut ısısı $> 38^{\circ}\text{C}$ ya da $< 36^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı > 90 /dakika
- Solunum hızı > 20 /dakika ya da $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- Lökosit sayısı $> 12.000/\text{mm}^3$ ya da $< 4000/\text{mm}^3$
- Periferik yaymada %10 genç nötrofillerin saptanması

Sepsis: SIRS'ın klinik bulgularıyla birlikte enfeksiyon görülmesidir.

Şiddetli Sepsis: Organ disfonksiyonları, hipoperfüzyon ve hipotansiyon ile birlikte görülen sepsis. Perfüzyon bozuklukları; laktik asidoz, oligüri ya da mental durumdaki bozulmayı içermektedir. Hipotansiyon sistolik kan basıncının < 90 mmHg ya da hipotansiyona yol açabilecek bilinen başka bir neden yokken başlangıçtakinden > 40 mmHg düşme görülmesi şeklinde tanımlanır.

Septik Şok: Yeterli sıvı resüsitasyonu, inotropik ve vazopressör ilaç desteğine karşın hipotansiyon ve hipoperfüzyon bulgularının varlığı, mental durumda bozulma, laktik asidoz ve oligürinin yer aldığı klinik tablodur.

Çoklu Organ Fonksiyon Bozukluğu Sendromu (MODS): Akut olarak ortaya çıkan ve desteksiz olarak homeostazın devam edemeyeceği çoklu organ fonksiyon bozukluklarıdır. Primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer MODS, iyi bilinen ve konağa doğrudan hasar veren spesifik bir olaya bağlı olarak gelişirken, sekonder MODS ise spesifik bir olaya direkt yanıt olmaktan çok, konağın anormal sistemik yanıtına bağlı olarak gelişir. Sekonder MODS, SIRS'ın çok şiddetli inflamatuvar yanıtı ve ölüme yol açan son basamağıdır (15).



Şekil 2.1. Enfeksiyon, Sepsis ve SIRS arasındaki ilişki(16)

2001 yılındaki ACCP/SCCM(American Collage of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine) toplantısında, sepsisli hastaların değerlendirilmesinde ve prognozlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere yeni bir sınıflama sisteminin kullanılması önerilmiştir.

Bu sınıflama kısaca PIRO olarak adlandırılmıştır.

P (predisposition): Hastada önceden var olan risk faktörlerini içerir. Önceden var olan faktörler, sepsiste sonucu değiştirmektedir ve tedavi planlanırken bunlar da dikkate alınmalıdır. Hastanın önceki sağlık durumu, kullanmakta olduğu ilaçlar ve alışkanlıkları sepsisin klinik seyrini etkiler.

I (infection): Enfeksiyon varlığını ve yaygınlığının değerlendirilmesidir. Enfeksiyonun yeri, tipi ve yaygınlığının prognoza önemli etkisi vardır.

R (response): Hasta yanıtının ne ölçüde olduğunu belirtmektedir.

O (organ dysfunction): Tutulan organ sayısı veya disfonksiyonunun skorlama sistemleri ile belirlenmesidir (17).

2.1.2. Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Sepsis, Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık yılda 500.000 olgu olarak bildirilen ve ortalama mortalitesi %10-90 bulunan bir enfeksiyondur. Mortalite altta yatan hastalık, enfeksiyon etkeni, enfeksiyona yanıt yeteneği, uygun antimikrobiyal tedavi ve septik şok gelişim süreciyle ilgilidir. Ülkemizde sepsis olgularının sayısı konusunda yeterli bir bilgi yoktur (18).

Sepsis bildirimi zorunlu bir hastalık olmadığından, gerçek sıklığı konusunda kesin rakamlar söylemek mümkün değildir. Ancak sepsis oluşumunda konak ve çevresel faktörler etkili olduğundan sıklığı hasta popülasyonları arasında farklılık göstermektedir. Ülkemizde toplum kökenli sepsis insidansı konusunda yeterli veri bulunmamakla beraber yoğun bakım ünitelerindeki nozokomiyal bakteriyemi/sepsis insidansı %7.6-15.8 arasında bildirilmektedir (19).

Hastane kaynaklı sepsisler gittikçe artan sıklıkta görülmektedir. Toplumda ileri yaş grubunun artması, kronik hastalığı olan hastaların yaşam süresinin uzaması, immünsupresif ilaçların kullanımı, teşhis veya tedavi amacıyla invaziv tekniklerin yaygın kullanılması sepsis görülme sıklığını arttırmaktadır. Sepsisin görülme sıklığı hastaneden hastaneye değişmektedir (20).

Ülkemizde 1983-1989 yılları arasında yapılan sepsis ile ilgili en geniş çalışmada, yedi yıllık dönemdeki gram negatif bakteriyemi olguları değerlendirilmiş, yatan hastalar arasında insidansı 4.2/1000 ve mortalitesi %45 olarak bulunmuştur (21).

Sepsis tablosu bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitlerden kaynaklanabildiği gibi, ağır travma veya pankreatit gibi enfeksiyöz olmayan olaylarda da gelişebilmektedir. Olguların yarısında etken gösterilememesine karşın, bu grubun çoğunluğunun antibiyotik tedavisine yanıt vermesi, bu hastalarda da etkenin bakteriyel olduğunu düşündürür (22).

Toplum kökenli sepsislerde genelde en sık rastlanan etkenler; *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*'dur. Hastane kaynaklı sepsislerde ise asıl etken o hastanenin hatta o birimin florasıdır. Sepsise neden olan mikroorganizmalar ve konağın durumu Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Sepsise Neden Olan Mikroorganizmalar ve Konağın Durumu (16,25)

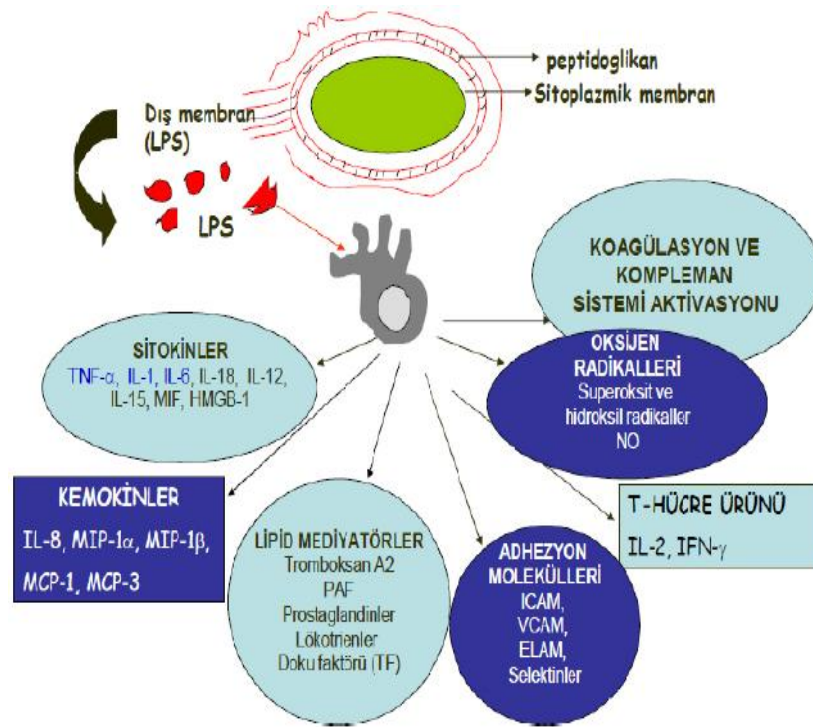
Konağın Durumu	Muhtemel Patojen
Cilt bütünlüğünün bozulması	Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae Staphylococcus aureus, Neisseria meningitidis
Anormal Üriner Sistem	Escherichia Coli, Enterobacteriaceae
Alkolizm	Klebsiella spp., S. Pneumoniae
Siroz	Gram–negatif basiller, Vibrio, Yersinia, Salmonella türleri
Aspleni	S. pneumoniae, H. İnfluenzae, M. meningitidis Capnocytophaga canimorsus
Diabetes mellitus	E. coli, Pseudomonas türleri, mukormikoz
Hipogamaglobulinemi	S. pneumoniae, H. İnfluenzae, N. Meningitidis, E. Coli
Yanık	S. aureus, P. Aeruginosa, nozokmiyal gram–negatif basiller
Kistik fibroz	Çok ilaca dirençli Pseudomonas ve Burkholderia türleri
AIDS	Pneumocystis carinii, Pseudomonas spp, Mycobacterium aivum intracellulare compley cytomegalovirus
Solid organ alıcısı	Gram–negatif bakteriler, cytomegalovirus
Damar içi kateter	S. aureus, koagülaz–negatif Statilokoklar
Kronik steroid kullanımı	S. pneumoniae, H. İnfluenzae,
Yenidoğan	Grup B streptokok, Listeria monocytogenes, S. Pneumoniae, H. İnfluenzae
Yaşlılar	S. pneumoniae, H. İnfluenzae, S. aureus, Enterobacteriaceae, L. Monocytogenes
Postoperatif hastalar	S. aureus, Enterobacteriaceae, nozokomiyal gram-negatif basiller

2.1.3. Fiziopatolojisi

Sepsiste ortaya çıkan klinik bulgular sepsise neden olan mikroorganizmanın toksin ve hücre duvarı gibi komponentlerine bağışıklık sisteminin verdiği enflamatuvar yanıtla ilgili olarak oluşmaktadır. Etken gram-negatif bakteri olduğunda, gram negatif bakterilerin hücre duvarı komponentlerinden olan ve LPS yapısında olan endotoksin enflamatuvar yanıtı uyarmaktadır. Endotoksin molekülü hücre membranında kaldığı sürece biyolojik olarak inaktiftir, ancak hızlı hücre bölünmesi ve hücre yıkımı sırasında salıverilir (23).

LPS, lipopolisakkarit bağlayan protein (LBP) ile birleştikten sonra monosit ve makrofajlara CD14 reseptörü aracılığı ile bağlanırlar. Bu bağlanma sonucunda

sitoplazmik sinyal sistemi işlemeye başlar ve dakikalar içinde tümör nekroz faktör (TNF), interlökin IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, platelet aktive edici faktör (PAF) ve interferon gamma gibi sitokinlerin transkripsiyonu gerçekleşir.



Şekil 2.2. Sepsisin Fizyopatolojisi(24)

Bu sitokinler ve nitrik oksit, intrasellüler adezyon molekülleri, prostaglandinler ve lökotrienler septik şok patogeneğinde rol alırlar. Sepsise neden olan mikroorganizma gram-pozitif bakteriler, virusler, parazitler, protozoalar veya helmintler olduğunda patogeneze biraz daha farklı olmaktadır. LPS içermeyen bu mikroorganizmalar sitokin üretiminin alternatif yolunu uyarmaktadırlar (25).

Gram-pozitif bakterilerin peptidoglikan ve teikoik asit gibi hücre yapıları kompleman zincirini alternatif yoldan aktive etmektedirler. Kompleman zinciri aktive olduğunda lenfosit proliferasyonu ve aktivasyonu ile birlikte makrofaj aktivasyonu ve sitokin salınımı gerçekleşmektedir. Aynı zamanda peptidoglikan ve lipoteikoik asit, doğrudan monosit ve makrofajlardan IL-1 salınımına neden olurlar. Lipoteikoik asit ek olarak TNF-α ve IL-6 salınımını tetikler. Grampozitif bakterilerin ekzo ve enterotoksinleri IL-1, IL-6 ve TNF-alfa salınımını artırır. Stafilokokların salgıladığı toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1), IL-1 salınımını LPS'den çok daha güçlü bir şekilde uyarır (16).

Tablo 2.2. Sepsis Patogenezinde Rol Oynayan Sitokinler ve Temel Fizyolojik Etkileri
(16,25)

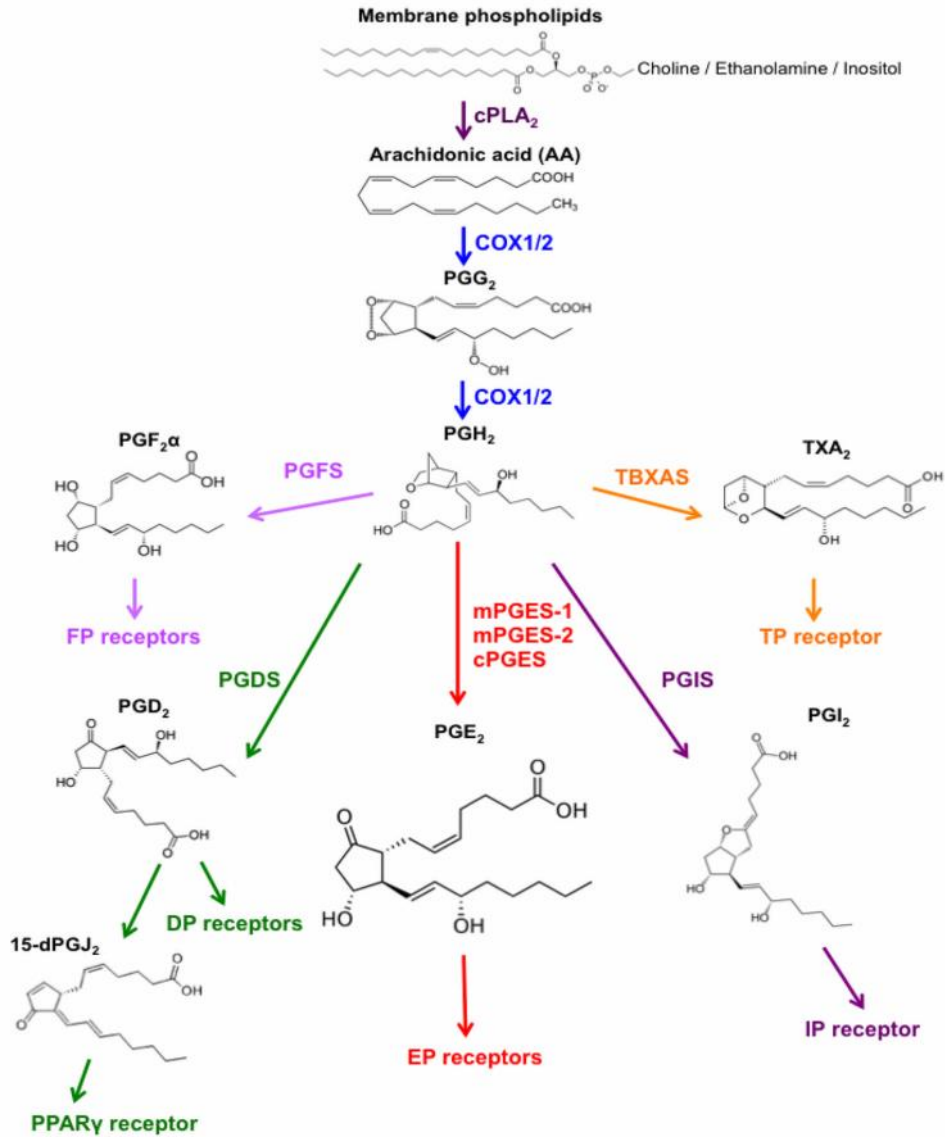
Sitokin	Kaynağı	Temel Fizyolojik Etkisi
TNF- α	Makrofaj	Vazodilatasyon, hipotansiyon, ateş, akut faz reaktanı sentezi
TNF- β	Th, NK hücreler	Vazodilatasyon, hipotansiyon, ateş, akut faz reaktanı sentezi
IL-1	Makrofaj, endotel	Vazodilatasyon, ateş
IL-6	T ve B hücreler	B hücre diferansiyonu
IL-8	Endotel, monosit	Kemotaksis
IL-2	T hücreler	Kan basıncı ve kardiyak ejeksiyon fraksiyonunda azalma
IFN-gamma	T hücreler	Hipotalamus üzerinden ateş yüksekliği
PAF	Nötrofil, endotel	Mikrovasküler sızıntı, negatif inotropi, platelet agregasyonu
Lökotrienler	Araşidonik asit	Vasküler geçirgenlikte artış, vazokonstriksiyon, koroner kan akımında azalma, pulmoner vasküler dirençte artış
Tramboksan A2	Araşidonik asit	Platelet ve nötrofil agregasyonu, vasküler geçirgenlikte artış
Prostaglandin E2	Araşidonik asit	Katabolizmada artış, hipotalamus üzerinden ateş yüksekliği

2.2. ENFLAMATUAR YANIT

2.2.1. Araşidonik Asit(Eikazonoidler) ve Ürünleri

Eikozanoidlerin sentezinde kullanılan yağ asitlerinin kaynağı, hücre membranında bulunan fosfolipidlerdir. Yirmi karbonlu yağ asitlerinin membran fosfolipidlerinden mekanik, kimyasal ve fizik uyarıları ve diğer mediatörlerin etkisi ile oluşan hücresel fosfolipazlar (örneğin, fosfolipid A2) sayesinde açığa çıkarlar. Araşidonik asit metabolitlerine eikazonoidler denir ve iki majör enzim aracılığı ile sentezlenirler. Eikozanoidler, prekürsör yağ asitlerinden oluşmalarında rol oynayan enzim türüne göre siklooksijenaz ürünleri, lipoksijenaz ürünleri ve 450 monoksüenaz ürünleri şeklinde üç ana gruba ayrılırlar. Bu grupların fizyolojik ve patolojik olaylara katkıları ve çeşitli sistem ve organlara etkileri bakımından aralarında belirgin farklar vardır.

Siklooksijenaz yolu ile prostasiklin (PGI_2), tromboksan A_2 (TxA_2), PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ meydana gelir. Bunlar enflamasyonda ağrı ve ateş gelişiminde de rol oynarlar. Lipooksijenaz yolu ile lökotrienler oluşur ve enflamasyonda önemli görevleri üstlenirler. Proenflamatuvar ve antienflamatuvar etkileri vardır. Sitokrom P_{450} epooksijenaz yolunda epoksitler ve dioller oluşur (3).



Şekil 2.3. Araşidonik Asit ve Ürünleri(26)

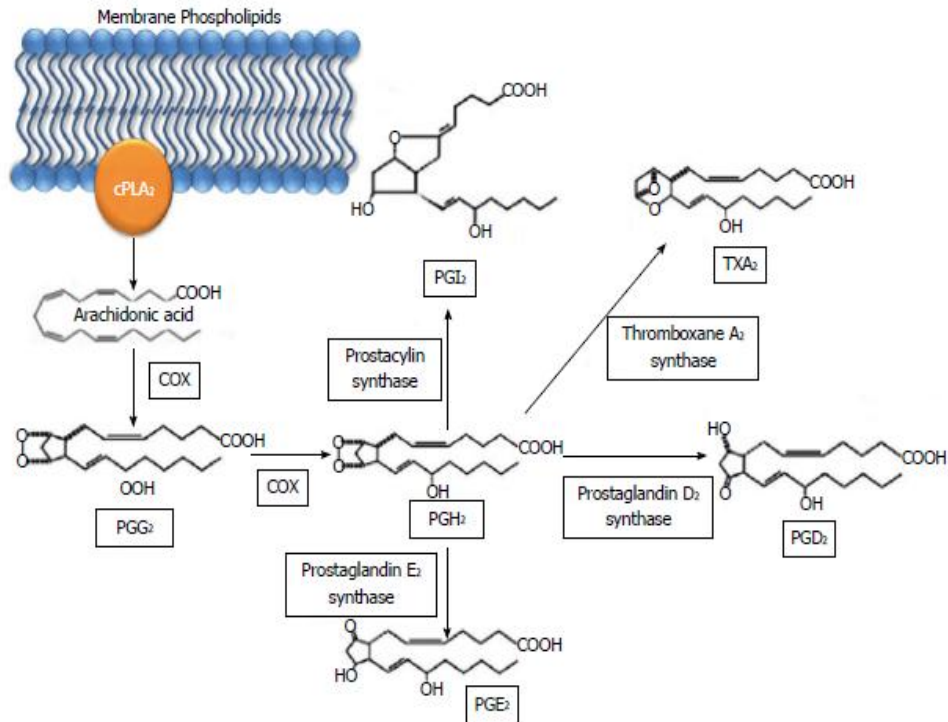
2.2.1.1. Siklooksijenaz-2(COX-2) ve Ürünleri

Prostanoidler diye de adlandırılan siklooksijenaz ürünü eikozanoidler; prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlardır. Siklooksijenaz enzimleri (COX-1 ve COX-2) araşidonik asidin, adı geçen prostanoidlerin prekürsörleri olan prostaglandin

G ve H'ye dönüşümünü katalize eder. Bu enzimlerin diğer adı prostaglandin G/H sentazdır.

COX-1, doku hemostazının sağlanması için gerekli prostanoidlerin sentezinden sorumludur ve üretildiği hücrelerde sürekli exprese edilirken, COX-2 enzimi bunların zıttı etki yapar. COX-2 izoformu sağlıklı insanlarda neredeyse görülmez. Sitokinler, büyüme faktörleri, tümör nekroz ajanlar, bakteriyel endotoksin gibi proenflamatuvar stimulanlar enflamasyonlu hücrelerdeki yanıtlarıyla süratle COX-2'nin ekspresyonuna neden olurlar. COX-2 ürünü prostaglandinler enflamatuvar reaksiyonlarda major rol oynar ve kızarıklık, ateş, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybı gibi karakteristik enflamatuvar semptomlardan sorumludurlar (27).

COX-2'nin sentezlenmesinden sonraki enzimler, hücreye özgün bir şekilde düzenlenir. Tromboksen sentaz plateletlerde ve makrofajlarda bulunur, prostasiklin sentaz endotelial hücrelerde, PGFS uterusda ve PGDS'in beyinde ve mast hücrelerinde bulunur. Mikrozomal prostaglandin E sentaz (mPGES), PGE₂ sentezinden sorumludur (28).



Şekil 2.4. Siklooksijenaz Ürünleri(29)

PGE₂

COX-2 tarafından PGH₂'nin sentezlenmesinden sonra PGH₂'yi PGE₂'ye dönüştüren mikrozomal PGES'lerin 3 izoformu vardır. Bunlar, sitozolik PGE sentaz, mikrozomal PGE sentaz (*microsomal prostaglandin E synthase*; mPGES)-1 ve mPGES-2'dir. mPGES-1 enflamasyon sırasında PGE₂ oluşumundan sorumlu olan başlıca enzimdir. COX-2'ye benzer biçimde mPGES-1'in de deneysel enflamasyon modellerinde indüklendiği ve seçici mPGES-1 inhibitörlerinin endotoksin gibi bakteriyel ürünlerin neden olduğu enflamatuvar hiperaljezide yararlı etkileri olabileceği bildirilmiştir (30-31).

PGES'in sitozolik formu (cPGES), yapısal COX-1 ile kompleks oluştururken; mPGES-2 her iki COX izoformuyla da kompleks oluşturabilir (32).

PGE₂ sentezlendikten sonra EP(prostaglandin E) reseptörleri aracılığı ile etkisini gösterir. EP reseptörlerinin EP₁, EP₂, EP₃ ve EP₄ alttipleri belirlenmiştir. Hepsi de hücre yüzeyinde yerleşmiş yedi transmembranal segmentli, G-proteini ile kenetli reseptörlerdir. Enflamasyon oluşumunda önemli katkıları vardır. PGE'ler için başlıca bulgular şunlardır:

- i) PGE'ler lokal uygulandıklarında damar permeabilitesini artırır, kızarıklık, ödem ve ağrı gibi belirtilere neden olurlar,
- ii) Akut iltihaplı dokuda sentezleri artar,
- iii) Lökositlerin doku içine infiltrasyonuna neden olurlar; başka bir deyişle, lökotaktik etki yaparlar,
- iv) İltihaplı dokuda salıverilen histamin, serotonin ve bradikinin gibi otakoidlerin etkilerini potansiyalize ederler.

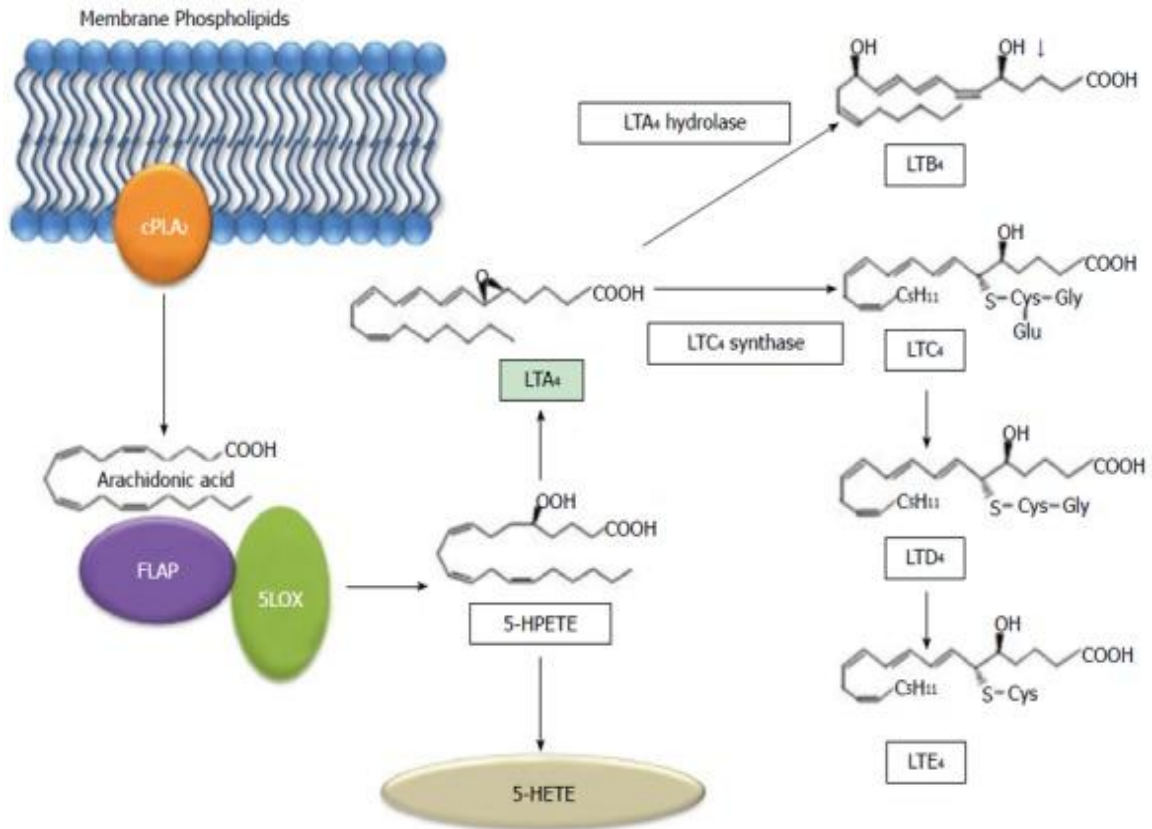
PGE₂, proenflamatuvar ve hiperaljezik etki yönünden en güçlü prostanoiddir(3).

Prostaglandin E₂ aynı zamanda antienflamatuvar etkili prostanoiddir. Bu özelliğini destekleyen en önemli etkilerinden biri T hücrelerinde IL-2 reseptör ekspresyonunu ve IL-2 sentezini inhibe etmesidir. IL-2 sinyal yolağının baskılanması T hücrelerinin proliferasyonunu ve aktivasyonunu inhibe eder (33).

PGE₂, doğal katil hücreler (NK), T hücreleri, CD8+ sitotoksik T lenfositlerde sitokin reseptör ekspresyonlarını down-regüle ederek bu hücrelerin sitotoksik etkilerini baskılar (34).

2.2.1.2. Lipooksijenaz ve Ürünleri

Araşidonik asidin ve benzeri polidoymamış yağ asidlerinin lipooksijenaz enzimleri (5-, 12- ve 15- lipooksijenazlar) tarafından metabolize edilmesi sonucu meydana gelen ürünlerdir. Lipooksijenazlar tarafından bu ürünlerin meydana getirilmesi esas olarak trombositlerde ve lökositlerde incelenmiştir. Trombositlerde sadece 12-LOaz bulunur. Lökositlerde 5-Lipooksijenaz (5-LOaz) araşidonik asidi 5-HPETE'ye çevirir. 5-Lipooksijenaz mast hücrelerinde de bulunur. Trombosit lipooksijenazı (12-lipooksijenaz), araşidonik asidi 12-hidroperoksieikozatetraenoik asid'e (12-HPETE'ye) dönüştürür. Arteriyel endotel hücreleri 15-lipooksijenaz enzimi içerirler. Bu enzim etkisi ile endotel hücresinde linoleik asidden 13-hidroksioktedekadienoik asid (13-HODE) oluşur. Bu önemli metabolit, endotel yüzeyinde trombosit ve lökositlerin agregasyonunu engeller. Lipooksijenazların prekürsör yağ asidlerinden birinci aşamada oluşturdıkları hidroperoksi türevi ara ürünleri (HPETE'ler)'den hidroksi türevi ara ürünler (HETE'ler) ve onlardan da lökotrienler meydana gelir. 5-LOaz ürünleri arasında LTA_4 primer lökotiendir; diğer beş lökotrien ondan oluşurlar (3).

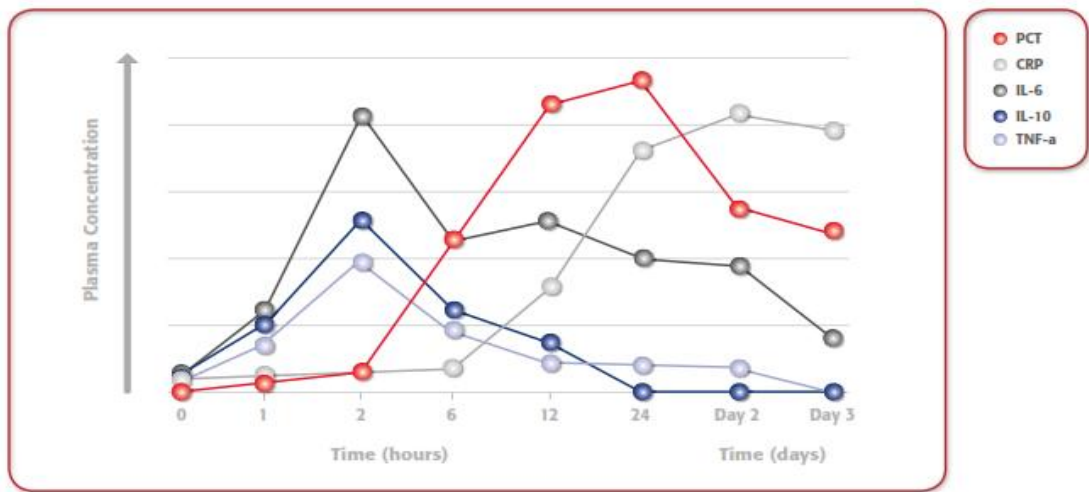


Şekil 2.5. Lipooksijenaz Ürünleri (29)

LTB₄ (kimyasal adıyla 5, 12di-HETE) güçlü kemotaktik etkinlik gösteren güçlü proinflatuvar maddelerdir. LTC₄ ve LTD₄ hem damar ve hem de damar dışı düz kasları büzer. LTD₄ en güçlü bronkokonstriktör ve kapiler permeabilitesini artırıcı etkinlik gösteren bileşiktir. Postkapiler venüllerden plazma sıvısının dokuya sızmasına ve ödeme neden olur. LTC₄, LTD₄ ve LTE₄, aşırı duyarlık (tip I alerji) reaksiyonları sırasında mast hücreleri ve bazofil lökositlerden salıverilen bir lökotrienlerdir (3).

2.2.2. Sitokinler

Protein veya polipeptid yapıda moleküllerdir. Kendilerinin hiçbir intrinsek ve enzimatik aktivitesi olmadığı halde enflamasyon sırasında uyarana karşı (bakteri, yabancı cisim vs.) başlatılmış immün cevabın bir parçası olarak görev alırlar. Bu şekilde hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanır ve hücre davranışını değiştirirler. Kök hücrelerinden, özellikle lenfosit, makrofaj, endotel, epitel ve bağ dokusu hücrelerinde sentezlenir ve salgılanırlar. Otokrin, parakrin, endokrin etkileri olabilir. Uyarın ne olursa olsun (enfeksiyöz/enfeksiyöz olmayan) organizmadaki tüm sitokin ağı harekete geçer. Sadece birinin aktivasyonu hepsini tetikler ve aşırı düzeylerde salgılanır. Böylelikle proenflatuvar sitokinler (TNF, IL-1, IL-12, IFN-g, IL-6 vb.), bunlarla zıt etkileri olan antiinflatuvar sitokinler (IL-10) ve çözünür haldeki proinflatuvar sitokin inhibitörler (çözünür haldeki TNF- α ve IL-1) salınır (35, 36).



Şekil 2.6. Sitokinlerin sepsiste plazma konsantrasyonlarının zamana göre değişimi (37)

Proenflamatuvar ve antienflamatuvar sitokinler arasındaki denge ne tarafa doğru değişirse enflamasyonun gidişi de o yönde olur. Bu sitokinlerin bağlı oldukları genlerin ekspresyonunda intraselüler transkripsiyon faktörleri rol oynar. Bunlardan en önemlisi nükleer faktör kappa B'dir (NF- κ B). NF- κ B'nin düzeylerinin yüksek olması sistemik enflamatuvar reaksiyon sendromu (SIRS) ve sepsisteki hastalarda kötü prognozu göstermektedir (38).

Tümör Nekozis Faktör- α (TNF- α)

Proenflamatuvar bir sitokin olan TNF- α , başlıca etkinleştirilmiş makrofajlar ve T lenfositleri tarafından oluşturulur. Enflamatuvar hastalıklarda monosit/makrofajların başlıca TNF- α kaynağı olmasına karşın, mast hücreleri, T ve B lenfositleri, doğal öldürücü hücreler, nötrofiller, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, kalp kası hücreleri, fibroblastlar ve osteoklastlarda da TNF- α oluşmaktadır. Membrana bağımlı ve çözünebilir (*soluble*) biçimleri olan TNF- α trimerik olduğunda etkindir, ayrıca her iki türün biyolojik etkinlikleri değişiktir. Hücre yüzeyinde TNF- α salıverilmesine aracılık eden TNF- α dönüştürücü enzim (*TNF- α converting enzyme*; TACE), TNF- α reseptörleri gibi çeşitli membrana bağımlı proteinlerin TNF- α 'nın etkilerini nötralize etmek üzere çözünebilir biçimlerine dönüşmeleri için salıverilmelerine neden olduğundan dolayı, TACE'nin etki ettiği hücreye göre proenflamatuvar veya antienflamatuvar bir enzim olabileceği bildirilmiştir.

TNF- α düzeylerinin sağlıklı bireylerde genellikle ölçülememesine karşın, enflamatuvar ve enfeksiyöz durumlarda serum ve dokudaki düzeyleri artmakta, ayrıca serumdaki düzeyleri enfeksiyonun derecesi ile yakın bir ilişki göstermektedir. TNF- α 'nın bakteriyel, viral ve parazitik enfeksiyonlara karşı konakçının savunma mekanizmalarında fizyolojik olarak önemli bir rol oynamaktadır (39-40).

İnterlökin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β ; 17 kilodalton molekül ağırlığında olup başlıca makrofaj ve endotel hücresinden salgılanır. TNF- α ile benzer fonksiyonel ve biyolojik karakteristiklere sahiptir. Yeterli konsantrasyonu konakçı direnci için önemlidir. Yüksek konsantrasyonları ise ölüme yol

açmaktadır. TNF- α gibi sepsis sendromunda sekonder mediyatörler için kuvvetli bir uyarıcıdır.

TNF- α 'dan farklı olarak serum IL-1 β seviyeleri daha uzun süre aynı seviyelerde kalır. Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki çeşit reseptörü vardır. Tip 1 reseptör hemen hemen tüm hücrelerde bulunur. Tip 2 reseptör ise tamamen inhibitör özelliğe sahiptir (41).

İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, 21 kDa ağırlığında, moleküler konfigürasyonu tam olarak bilinmeyen proenflamatuvar, antienflamatuvar ve endokrin fonksiyonları olan sitokindir. Glikoprotein yapıda olan IL-6; lenfositler, fibroblastlar ve monositleri içeren çoğu hücre tipleri tarafından üretilir. IL-6 reseptörleri diğer sitokin reseptörlerinden farklı olarak IL-6'nın etkinlerini arttırmaktadır. IL-6'nın B ve T lenfositlerinin aktivasyonunun başlatılması, karaciğerden akut faz proteinlerinin salınması ve hematopoezisin ayarlanması gibi görevleri vardır (42).

Bunlara ilaveten IL-6 koagülasyon sisteminin aktivasyonuna ve pirojen gibi olaylara neden olabileceği de bildirilmiştir. IL-6'nın in vitro çalışmalarda TNF- α ve IL-1 β 'nın üretimini baskıladığı görülmüştür (43-44).

İnterlökin-10(IL-10)

En güçlü sitokin sentezi inhibitörüdür. Monosit ve nötrofillerden proenflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe eder. Enflamasyon sırasında gerek enflamasyonun kendisi ve gerekse salınan mediyatörler konak organizmanın sağlam dokularına da zarar verebilmektedir. Enflamasyonda proenflamatuvar sitokinlerin yanında antienflamatuvar sitokinlerin de salınması, enflamasyonun sınırlanmasına yöneliktir. IL-10, enflamasyon ve immün yanıtın potent inhibitörüdür. En önemli antienflamatuvar sitokin olarak kabul edilen IL-10; TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 ve IFN- γ gibi proenflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe ederler. Endotoksemi ve sepsiste, IL-10 uygulamasının TNF- α salınımını ve mortaliteyi azaltarak prognoz açısından pozitif etkilere sahip olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Anti-IL-10 uygulanan farelerde ise TNF- α salınımının ve mortalitenin arttığı gözlenmiştir (45).

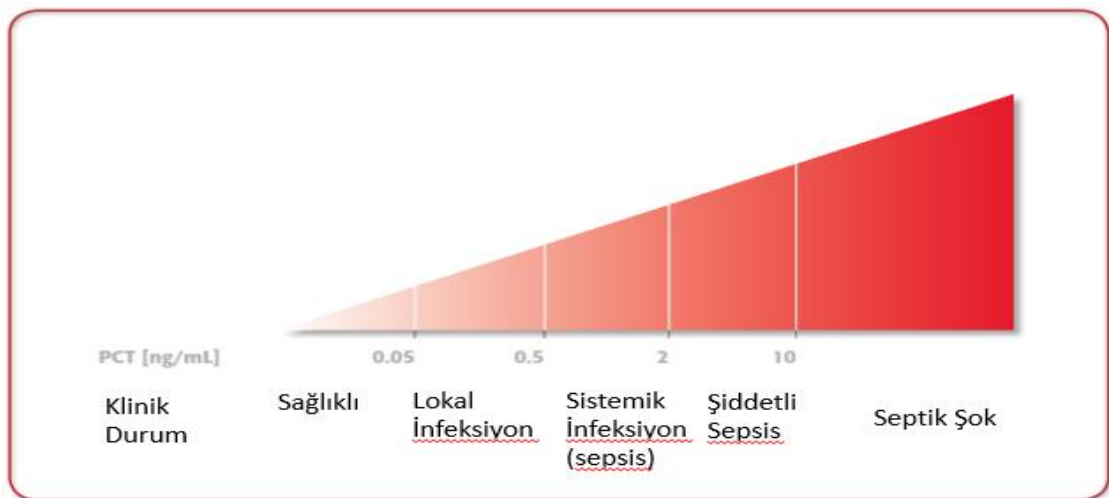
C-Reaktif Protein

C-reaktif protein ilk kez 1930'da Tillet ve Frances tarafından belirlenmiştir. CRP'nin sadece pnömokokal pnömonilerde değil farklı etkenlerin neden olduğu akut enfeksiyonlarda da tespit edildiği görülmüş ve CRP pnömokokların polisakkarid C'si ile tepki verdiği için CRP adını almıştır (46).

C-reaktif protein hepatositler tarafından sentezlenen akut faz reaktandır. Beş nonkovalent bağlı aynı alt ünitelerden oluşan pentametik bir proteindir. Enfeksiyona ya da doku enflamasyonuna cevap olarak, CRP üretimi başta IL-6, IL-1 ve TNF olmak üzere sitokinler tarafından uyarılır (47).

Prokalsitonin

Troid C hücreleri (parafoliküler hücreler) tarafından sentezlenen kalsitonin hormonunun öncüsüdür. Normal fizyolojik koşullarda serum seviyesi çok düşüktür (<0.1 ng/mL). Bakteriyel enfeksiyon varlığında ektratroidal nöroendokrin dokulardan sentezi artar. Sistemik PCT(parakalsitonin) salınımı, sistemik bakteriyel enfeksiyonlarda spesifik olarak görülen enflamatuvar cevabın bir komponentidir. Gram negatif bakteremilerde, gram pozitif bakteremilere göre daha fazla yükselir. Sistemik bakteriyel enfeksiyonlarda ilk 4 saatten sonra yükselmeye başlar ve 8 ile 24 arasında pik seviyeye ulaşır. Yarı ömrü yaklaşık 24 saattir (48,49).



Şekil 2.7. Enfeksiyon Şiddetine Göre Serum PCT Düzeyleri(48,49)

Platelet Aktivatör Faktör (PAF)

Biyoaktif fosfolipid kaynaklı mediatördür. Bazofil, nötrofil, monosit, makrofaj, mast ve endotel hücrelerinden PAF sentezi yapılır. Düşük dozlarda vazodilatasyon yapar. Venüllerde permeabiliteyi artırıcı etkisi histamine göre 100 kat daha potenttir. Lökositlerin endotel adezyonu, kemotaksis, degranülasyon ve oksidatif reaksiyonu artırır (37).

2.2.3. Nitrik Oksit Sentaz ve Nitrik Oksit

Nitrik Oksit Sentaz

Günümüzde bilinen üç NOS izoformu vardır. eNOS endotel hücresinden nNOS nöronlardan izole edilmiştir. Üçüncüsü ise sentezi sitokinlerle uyarılabilen iNOS (inductible NOS)'tur. Bu enzimlerin genleri üç ayrı kromozom üzerinde kodlanmıştır(eNOS 7. kromozomda, nNOS 12. kromozomda ve iNOS 17. kromozomda) (50).

Tablo 2.3. Nitrik oksit sentezleyen enzimler(50)

NOS İziform	Tip I(nNOS)	Tip II(iNOS)	Tip III(cNOS)
Salınım	Devamlı	İndüklendiğinde	Devamlı
Kaynak	Sinir hücreleri	Makrofaj, damar düz kası, miyokard, endotel, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epiteli	Vasküler endotel hücreler, platelet, myokard, endokard, mast hücreleri, nötrofil
Regülasyon	Kalsiyum bağımlı	Sitokinler, Endotoksinler, Oksidanlar tarafından indüklenme	Kalsiyum bağımlı
NO miktarı	Düşük(pikomol)	Yüksek (nanomol)	Düşük(pikomol)
Kromozom	12	17	7

Bu enzimler başlıca iki gruba ayrılırlar:

1. Yapısal (Constitutive) NOS (cNOS): Yapısal NOS'un nNOS(nöronal) ve eNOS(endotelial) olarak adlandırılan iki izoformu vardır. Çeşitli reseptörlerin uyarılmasına (asetilkolin, bradikinin gibi) veya damar duvarındaki gerilmelere (shear stress) cevap olarak picomol-nanomol miktarlarda aralıklı olarak nitrik oksit sentezi yaparlar (51).

Diğer izoformdan ayırıcı özellikleri aktivitelerinin Ca^{2+} 'a (ikincil haberci olarak) bağımlı olmalarıdır. Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etkileşimde, kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks ya Ca^{2+} ya da kalmodulin cNOS'un aktifleşmesini sağlar ve NO sentezlenir. Ancak kalsiyumu artıran uyarı kesildiğinde hücre içi kalsiyum miktarı azalmaya başlar ve enzim aktivitesi azalarak NO sentezi durur. Sonuç olarak cNOS ilgili hücrelerde daima mevcuttur fakat Ca^{2+} düzeyi yükselinceye kadar aktif değildir (52).

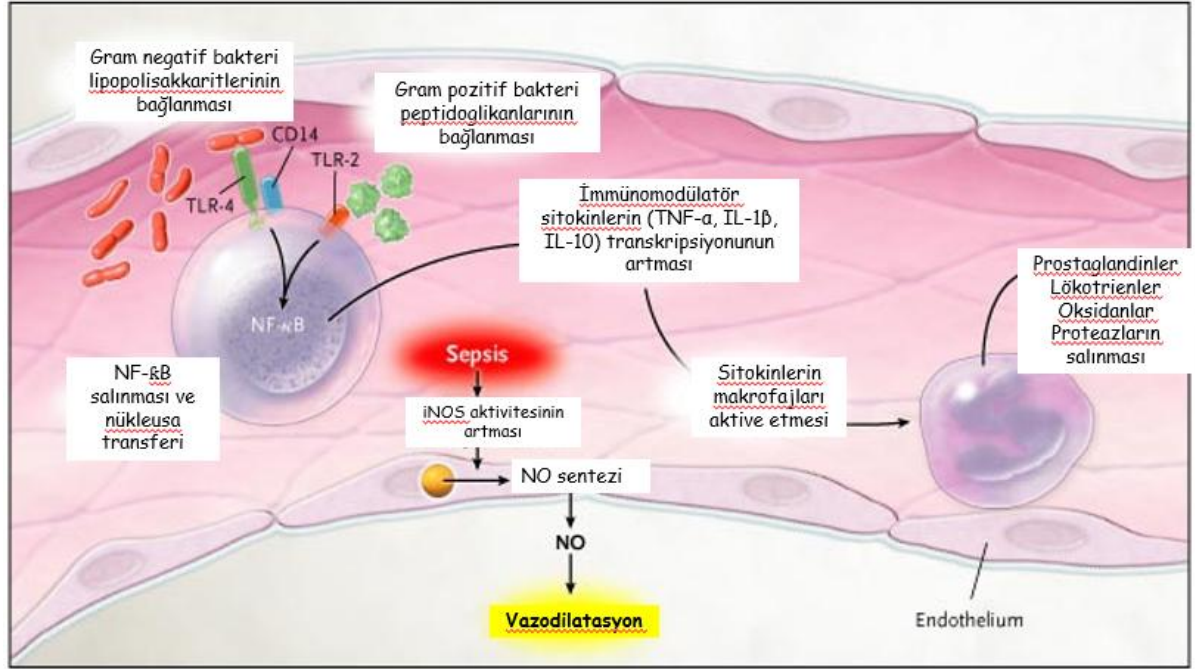
cNOS izoenzimlerinin başlıca bulundukları yerler ve etkileri farklıdır. nNOS kaynaklı NO santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur (53). Koku alma (54), ağrıyı algılama (55), görme (56), ve hafıza oluşması (54) gibi işlevlerde rol oynar. Periferik sinir sisteminde nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitterdir(53-57). Solunum fonksiyonlarında (57), penil ereksiyonunda (58), GİS (gastrointestinal sistem) motilitesinde (59), mesane sfinkter işlevinde (60) ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır.

eNOS kaynaklı NO düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve dolayısıyla kalp kasılmasını düzenler. Trombositlerin adezyon ve agregasyonunu inhibe eder. Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahiptir (61).

2. Uyarılabilir (inductible) NOS (iNOS) : iNOS başta makrofajlar olmak üzere PMNL (polimorfonükleer lökosit)' ler, hepatositler, damar düz kasları, damar endoteli tarafından salınır ve endotoksin, TNF- α , interferon gama gibi uyarıcılar tarafından uyarılır.

Enzim indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Özellikle non spesifik immünitede önemli rol oynar.

Bakteri, mantar, virüs ve tümör hücrelerinde sitotoksik ya da sitostatik etki oluşturur (50).



Şekil 2.8. Sepsiste iNOS aktivitesinin artması (62)

Nitrik Oksit

Atmosferde kirliliğe neden olan, suda ve yağda kolaylıkla çözünebilen gaz olan nitrik oksit ilk defa 1980 yılında Furchgott ve Zawadski tarafından endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak bildirilmiştir. 1987 yılında ise Palmer ve arkadaşları endotel kaynaklı gevşeme faktörünün NO olduğunu bulmuştur. NO'nin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü hakkında daha fazla bilgi elde edilmesinden sonra 1992 yılında "Science" dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir (63,64).

Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO• serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. NO• lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz sentezlenmesi hücreler için zararlıdır (65).

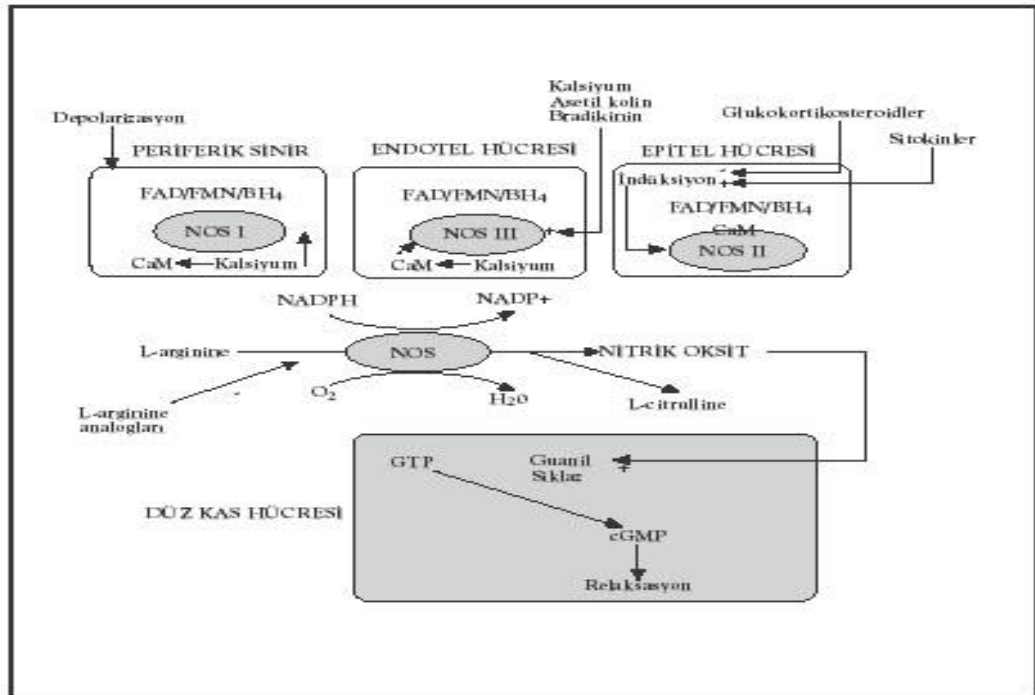
Oksijen varlığında hızlı bir biçimde nitrit ve nitrata (NO^{2-} ve NO^{3-}) dönüşerek inaktif olur. Suda ve plazmada nitrite okside olan nitrik oksit birkaç saat bu şekilde kararlı

kalır. Kandaki nitrit nitrata dönüşür, bu yüzden kanda bazal nitrat konsantrasyonu nitrit konsantrasyonundan fazladır. Oluşan NO metabolitleri böbrekler yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. NO'nin hemoglobine afinitesi oksijeninkinden 3000 kat daha fazladır, bu da fizyolojik ortamda ömrünün çok kısa olmasının nedenlerinden biridir (66).

Hücre zarlarından kolaylıkla geçebilen bir serbest radikal olan NO'nin hedef molekülleri oksijen, diğer radikaller, tiol grupları ve metallerdir. Örneğin, NO guanilat siklazı, bu enzimin hem (heme) grubuna bağlanarak aktive eder. Aktive olan guanilat siklaz vasküler düz kasta gevşeme ile vasodilatasyonu, merkezi sinir sisteminde ise sinir iletisini sağlar (67).

NO, serbest tiol grupları ile birleşerek "S-nitrosothioller" oluşturur, böylelikle daha stabil hale geldiğinden yarı ömrü uzar ve plazminojen aktivatörü gibi bazı katalitik enzimlerin fonksiyonlarını artırabilir. Nitrik oksit, süperoksit anyon radikali (O_2^-) ile reaksiyona girerek sitotoksik bir molekül olan peroksinitrite ($OONO^-$) dönüşür. Peroksinitrit, hücre membranlarında lipid peroksidasyonunu artırırken, aynı zamanda DNA hasarına yol açar ve proteinlerle de etkileşir (68).

Biyosentezi: NO, NOS denilen bir enzim ailesi tarafından L-arjinin amino asitinden sentezlenir. NO sentezlenirken NOS dışında moleküler oksijen ve dört tane kofaktöre ihtiyaç duyar. Bunlar Hem, FAD(flavin adenin dinükleotid), FMN(flavin mono nükleotid) ile BH₄ (tetrahidrobiyopterin)'dir. Bu reaksiyon sonucunda NO yanında L-sitrulin de oluşur (65).



Şekil 2.9. NO biyosentezi (69)

Etki Mekanizması: NO'nun biyolojik etkisi guanilat siklaz enzimi tarafından yürütülür. Hücre içinde sentezlenen veya dışında sentezlenip de komşu hücrelerden difüzyonla geçen NO, guanilat siklazın hem grubuna bağlandığında siklik guanozin monofosfatın (cGMP) artışına, bu da cGMP'ye bağımlı protein kinazların aktivasyonuna neden olur. Sonuçta, hücre içi kalsiyum azalır ve kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalları açılır. Potasyum hücre dışına çıktığında hiperpolarizasyon olur ve düz kas gevşemesi meydana gelir. Nitrik oksit, cGMP'a bağlı olarak aynı mekanizma ile vasküler olmayan düz kasta gevşemeye, trombositlerde adezyon ve agregasyonun, nötrofillerde de kemotaksisin inhibisyonuna neden olmaktadır (70).

2.3. *Zingiber Officinale* (ZENCEFİL)

Güneydoğu Asya'da doğal olarak yetişen zencefil, ilk defa İngiliz botanikçi William Roscoe (1753-1831) tarafından 1807 yılında tanımlanmıştır ve *Zingiber officinale* Roscoe adını vermiştir (71).

Taze ve kuru olarak rizomları kullanılan zencefil, Zingiberaceae familyasına dahil bir türdür. Çok yıllık, boyu 1,50 metreye kadar ulaşabilen otsu bir bitkidir. Toprak altında dijital olarak dallanmış rizomları bulunur. Yapraklar 5-30 cm uzunluğunda, 8-20 mm

genişliğinde lanseolat, alternan, yüzeyi düz, soluk yeşildir. Sarımsı mor çiçeklerden oluşan çomak şeklindeki spikanın altında yeşilimsi sarı brakteler vardır. Kaliks tüp şeklinde, bir yandan açılan, 3 dişli, korolla çift ayalıdır. Meyve küçük arilluslu tohumlu bir kapsüldür (72).

%5-8 oranında oleorezin taşır. %3 oranında uçucu yağ, oleorezinlerin %20-25'ini oluşturur. Uçucu yağın ana bileşenleri; kamfen, β -fellandiren ve 1,8-sineol, granal ve neraldir. Monoterpen olarak limonen, mirsen, α -pinen, borneol, sitronellol, graniol, granil asetat ve linalol gibi bileşikler bulunur. Bunların dışında seskiterpenlerden(%30-70): β -bisabolen, (-)-zingiberen, (+)-arkurkumen, (-)- β seskifellandiren, fernasen de vardır. Oleorezinlerin %25'ini acı bileşikler oluşturur. Bunlar; gingerol, shogaol ve fenolik keton türevleridir. Rizomlarda bulunan diğer bileşiklerde, diarilheptanonlar, diterpenlaktonlar, galanolakton (bazı türlerde), 6-gingesülfonikasit ve monoaçıldigalaktozil gliseroler ile nişasta ve müsilaajdır (5,73).

Zencefil rizomları, antiemetik, anti-enflamatuar, antikansorejen, antidiyareik, antioksidan, anti platelet agregasyonu gibi etkileri nedeniyle Kore, Çin, Japonya geleneksel tıbbında sık kullanılmaktadır (6). Zencefilin, majör farmakolojik etkisinden sorumlu komponentleri gingerol ve shogaollerdir (74,75).

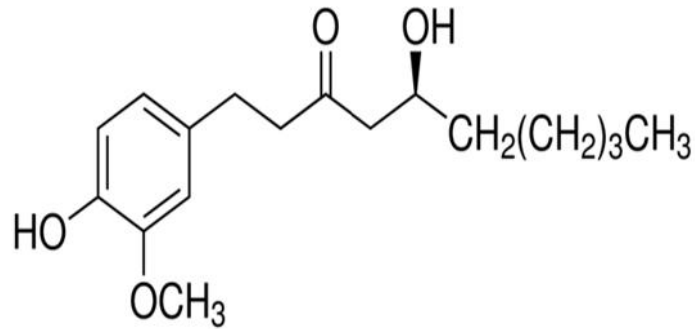


Şekil 2.10. Zencefil Rizomu

Farelere 2.5 g/kg dozda oral yolla uygulanan zencefilin kurutulmuş %80'lik etanolü ekstresi, 10 hayvanın 2'sinde görülen diyare dışında, yan etki ya da mortalite görülmezsizin iyi tolere edilmiştir. 3.0 g/kg ve 3.5 g/kg dozlarının verilmesi, uygulamadan sonraki 72 saat içerisinde istem dışı iskelet kası kasılmalarına bağlı olarak sırasıyla %20-%30 oranında mortalite ile sonuçlanmıştır (7).

2.3.1. 6-Gingerol

Gingeroller, taze zencefil yumrularında fazlaca bulunan acı bileşiklerdir(30-31). 6-Gingerol'ün[3-dekanon,5-hidroksi-1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)], kimyasal formülü $C_{17}H_{26}O_4$ ve molekül ağırlığı 294,39 g/mol'dür (76).



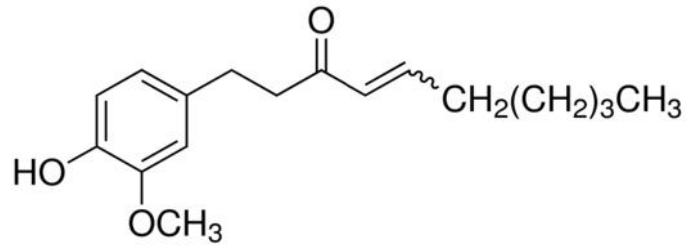
Şekil 2.11. 6-Gingerol Molekül Yapısı (76)

6-gingerolün, sıçanlara 3mg/kg dozda uygulanmasından sonra plazma konsantrasyon-zaman eğrisi, iki kompartmanlı açık modelle belirlenmiştir. Gingerol 7.23 dakika terminal yarılanma ömrü ve 16.8 ml/dk/kg total vücut klirensi ile plazmadan hızla uzaklaşmıştır ve serum proteinlerine bağlanma oranı %92.4 olarak açıklanmıştır (77).

2.3.2. 6-Shogaol

6-Shogaol, 6-Gingerolün dehidratasyona uğramış formu olmakla birlikte kuru zencefil yumrularında daha fazla bulunmaktadır (74,75).

6-Shogaol'ün[1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4-deken-3-on], kimyasal formülü $C_{17}H_{24}O_3$ ve molekül ağırlığı 276,37 g/mol'dür. Sarı viskoz sıvı görünümünde ve keskin kokusu vardır (78).



Şekil 2.12. 6-Shogaol Molekül Yapısı (78)

6-gingerol ve 6-shogaol ile yapılan farmakolojik çalışmalarda, intravenöz 1,75-3,5 mg/kg dozlarında ve oral uygulama ile 70-140 mg/kg dozlarında uygulandıklarında, spontan motor aktivitede azalma, antipiretik ve analjezik etki, hegzobarbital ile uyuma zamanının uzaması, gastrik kontraksiyonda azalma, düşük dozlarda kan basıncında azalma gibi etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Bu etkiler açısından 6-shogaol, 6-gingerol'den daha etkin bir bileşiktir (79).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

3.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Deneylerde;

- -20 ° C dondurucu ve +2/+8 ° C (Siemens)
- -80 ° C dondurucu (OPERON),
- DS-11 Spektrofotometre(DeNovix®)
- Etüv(EcoCell)
- Güç kaynağı(PowerPac™Basic-BioRad)
- Hassas Terazı (Adventurer, OHAUS),
- Isıtıcı ve Magnetik Karıştırıcı(Hei-Standart, Heidolph MR),
- Isıtıcı ve Soğutucu Blok(CHB-202,Bioer)
- İnkübitör (Biosan),
- Küçük Uçlu Parçalayıcı (IKA®T10 basic ULTRA-TURRAX®),
- Mikropipet ve Multipipet(Eppendorf),

- Multifonksiyonel Mikroplate Okuyucu (Biotek synergy HT),
- Parçalayıcı (IKA®T25 digital ULTRA-TURRAX®),
- PCR cihazı (Lightcycler®Nano Roche)
- Santrifüj (Nüve NF 1200R, Nüve Mikro200R),
- Spin Capsulefuge(GmClab,GILSON®)
- T100™Thermal Cycler(Bio-Rad)
- Vorteks (UM-10,Wisemix),
- Western blot cihazı (Mini-Protean®Tetra System-BioRad) kullanıldı.

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler gerekli ortam sıcaklıklarında saklandı. Deneylerde kullanılan çözelti ve tamponlar deiyonize su ile hazırlandı. Kimyasal maddeler;

- 1-Butanol (Fluka, 19430)
- 2-Merkaptoetanol (Sigma, M3148-100 ml)
- 2-Propanol (Riedel-de Haen, 24137)
- 6-Gingerol (Sigma, G1046-10 mg)
- 6-Shogaol (Sigma, 39303-10 mg)
- Bakır(II) sulfat pentahidrat (Sigma, 12849- 1 kg)
- Bisakrilamid (AppliChem, A3636-50 g)
- Bovin Serum Albumin (Santa Cruz, SC2323-50 g)
- Kloroform (Sigma, C2432-500 ml)
- COX-2 Poliklonal Antibadi (Cayman, 160106)

- Dimetil Sulfoksit (Sigma, D8418- 250 ml)
- Etanol absolü (AppliChem, A3678-500 ml)
- Folin&Ciocalteu's fenol reagent (Sigma, F9252-500 ml)
- Gliserol (Merck, K42347192)
- Glisine (Sigma, G8898-500 g)
- iNOS Poliklonal Antibadi (Cayman, 160862)
- Lipopolisakkarit (Sigma, L2630-100 mg)
- Methanol (Merck, I690709)
- Monoklonal Anti- β -Aktin (Sigma, A5441)
- N,N,N,N'-Tetrametil-etilenediamin (Sigma, T9281-50 ml)
- N,N'-Metilenbisakrilamid (Sigma, M7256- 50 g)
- Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (Merck, A0270087-1 kg)
- Sodyum Karbonat (Merck, A0250292-1 kg)
- Sodyum Klorit (AppliChem, A4256-1 kg)
- Sodyum dodecil sülfat (SDS)(Sigma, 71725-500 mg)
- Süper Signal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
- Süt tozu (Fluka, 70166- 500 g)
- Tripure Isolation Reagent (Roche,50 ml)
- Tris Hidroklorid (Amresco, 0234-1 kg)
- Trizma Baz (Sigma, T6066- 1 kg)
- Tween®20 (Sigma, P5927-100 ml)

Lowry protein miktar analizi için çözeltiler;

- Solüsyon A: 1.42 g CuSO₄ (bakır II sülfat) bir miktar su içinde çözülüp ve 100 ml' ye deiyonize su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

- Solüsyon B: 2 g $C_4H_4Na_2O_6$ (sodyum tartarat) bir miktar su içinde çözülüp ve 100 ml' ye deiyonize su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
- Solüsyon C: 14.30 g Na_2CO_3 (sodyum karbonat) ve 2.85 g NaOH (sodyum hidroksit) bir miktar su içinde çözülüp ve 500 ml' ye deiyonize su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
- 1N Folin çözeltisi: 2N Ticari çözeltidir. 1:1 oranında deiyonize su ile dilüe edilerek kullanıldı. Işıktan koruyarak oda sıcaklığında saklandı.
- BSA standart eğri çözeltisi: Bovine Serum Albumin'in standart eğri oluşturmak için 80 $\mu g/\mu L$ olacak şekilde deiyonize su ile stok çözeltisi hazırlandı ve 2 katlı dilüsyonlar yapıldı.

Western blot analizi için hazırlanan çözeltiler;

- 4X Yığınlama(Stacking) jeli çözeltisi: 3,0275 g Tris baz, 0,2 g SDS tartılarak deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. pH: 6,8 e ayarlandı.
- 4X Ayırma(Separating) jeli çözeltisi: 9,09 g Tris baz, 0,2 g SDS tartılarak deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. pH: 8,8 e ayarlandı.
- 10X Elektroforez stok yürütme çözeltisi: 6,055 g Tris baz 28,82 g glisin tartılarak deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı.
- 1X Elektroforez yürütme çözeltisi: 100 ml 10X Elektroforez stok yürütme çözeltisine 10 ml %10 SDS eklendi ve deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.
- 6X Yükleme tamponu(sample buffer): 7 ml 4X yığınlama jeli çözeltisi, 3,6 ml gliserol, 1 g SDS, 1,2 mg bromofenol mavisi deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlandı. 5-10 dakika kaynatıldı.
- 6X Protein yükleme tamponu: 100 μL tampon içine 4 μL β -merkapto etanol eklendi. Taze hazırlandı.
- %10 SDS çözeltisi: 10 g SDS tartılarak hafifçe ısıtılan 100 ml deiyonize su ile çözüldü.
- %30 Bisakrilamide çözeltisi: 30 g bisakrilamide tartılarak deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- %10 Amonyum persülfat çözeltisi: 100 mg amonyum persülfat tartılarak deiyonize su ile 1 ml'ye tamamlandı. Taze hazırlandı.
- Transfer çözeltisi: 100 ml 10X Elektroforez stok yürütme çözeltisine 200 ml metanol eklendi ve hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Karanlıkta saklandı.
- TBS stok blotlama çözeltisi: 2,42 g tris baz, 9 g NaCl (sodyum klorür) tartılıp deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. pH 7,4'e ayarlandı.
- TBST blotlama çözeltisi: 1 litre TBS içerisine 1000 µL Tween 20 eklenir. 10 dk magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Taze hazırlandı.
- %5 Bloklama çözeltisi: 500 mg süt tozu tartılarak 10 ml TBST içinde çözüldü.
- Film banyosunda kullanılan developer çözeltisi: Developer karışımı A(hidrokinon), B (%77.5 asetik asit) ve C (glutaraldehit) şeklinde üç ayrı çözeltiden oluşmaktadır. Çözeltiler korozif ve toksik özellikte olduğundan karışım hazırlanırken gözlük, eldiven, maske ve önlük giyilmelidir. 5 L'lik karışım için, 1400 ml A, 50 ml B, 50 ml C, 3500 ml distile su. Developer güneş ışığından korunmalıdır.
- Film banyosunda kullanılan fixer çözeltisi: Fixer karışımı A (hidrokinon) ve B (%77.5 asetik asit) olmak üzere iki çözeltiden oluşmaktadır. 5 L' lik karışım için, 3500 ml distile su, 1250 ml A, 250 ml B. Karışımın güneş ışığından korunmasına gerek yoktur.

3.3. Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışma Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden sağlanan ağırlıkları 300 ± 25 g arasında değişen 10 haftalık 56 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. 36 adet sıçan ana çalışma için ayrıldı ve 20 adet sıçan pilot çalışmada kullanıldı. Deney hayvanları 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta bırakıldı ve beslenmeleri standart diyet ve su (*ad libitum*) ile sağlandı. Tedavi gruplarında kullanılacak olan 6-gingerol ve 6-shogaol'un uygun dozları pilot çalışma ile belirlendi. Pilot çalışmada denenecek 6-gingerol ve 6-shogaol dozları ise literatür taramasıyla belirlendi.

Deney hayvanları rastgele seçilerek pilot çalışma için on farklı gruba ayrıldı. Gruplar aşağıdaki gibidir;

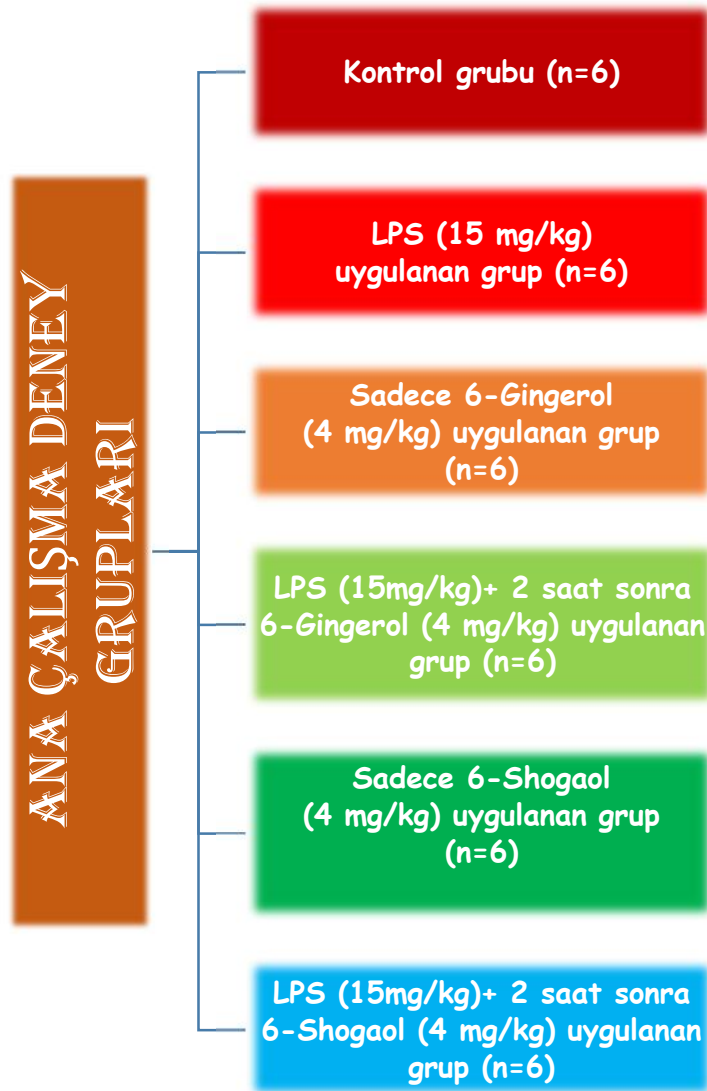


Şekil 3.1. Pilot Çalışma Deney Grupları

Uygulamalar intraperitoneal yapıldı. Uygulama süresinden 4 saat sonra hayvanlar ketamin-ksilazin anestezisi ile anestezi edildikten sonra 5-10 ml kan örneği heparinlenmiş enjektör ile intraabdominal aortadan alındı ve servikal dislokasyon ile hayatlarına son verildi. Kan örnekleri, 4°C’de 2000 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri, çalışma gününe kadar, -20° C’de dondurularak saklandı.

Elde edilen serum örneklerinde ticari ELİSA kitlerde IL-1b, IL- 6 gibi sepsis biyobelirteç ölçüldü. Pilot çalışmanın sonuçlarından faydalanılarak uygun doz olarak her iki ilaç içinde 4 mg/kg belirlendi. Ana çalışma için deney grupları oluşturuldu.

Deney hayvanları rastgele seçilerek ana çalışma için altı farklı gruba ayrıldı. Gruplar aşağıdaki gibidir;



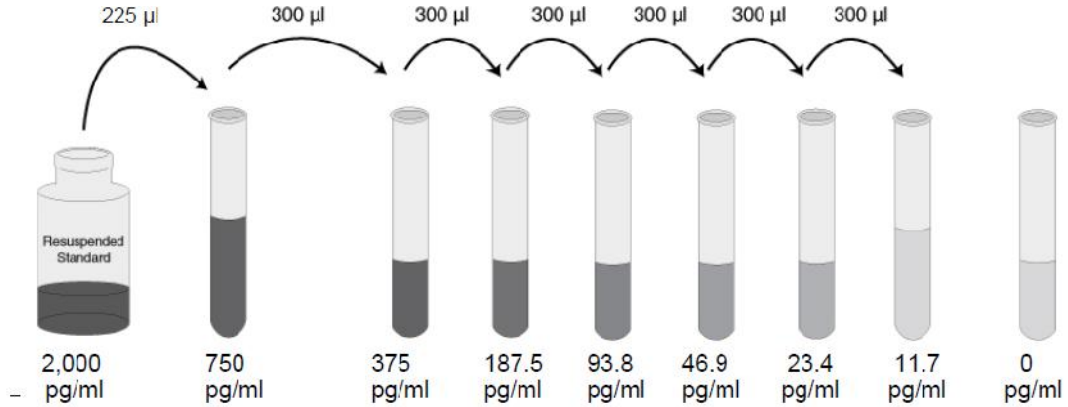
Şekil 3.2. Ana Çalışma Deney Grupları

Uygulamalar intraperitoneal yapıldı. Uygulama süresinden 4 saat sonra hayvanlar ketamin-ksilazin anestezisi ile anestezi edildikten sonra 5-10 ml kan örneği heparinlenmiş enjektör ile intraabdominal aortadan alındı ve servikal dislokasyon ile hayatlarına son verildi. Daha sonra karaciğer ve böbrek dokuları izole edildi.

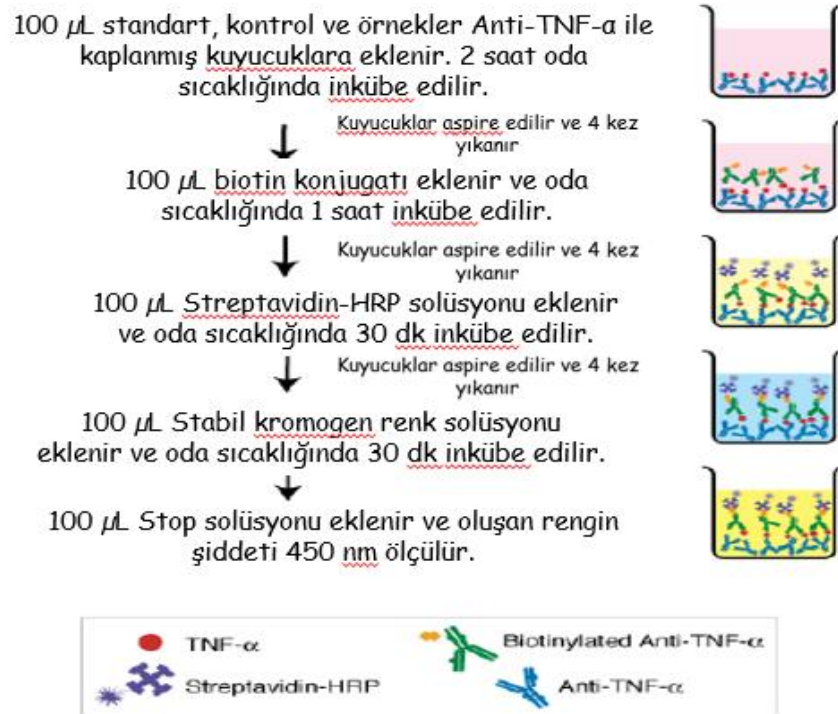
Dokuların diğer kısımları proteinaz inhibitörü içeren tampon içinde homojenize edildi. Dokular ölçümlere kadar -80°C 'de saklandı. Kan örnekleri, 4°C 'de 2000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri, çalışma gününe kadar, -20°C 'de dondurularak saklandı.

3.4. Serum TNF- α Düzeylerinin Ölçülmesi

TNF- α düzeyleri, sıçanlardan elde edilen serum örneklerinde ELİSA kit ile çalışıldı. TNF- α düzeyleri, TNF- α 'ya ait monoklonal antikor ile kaplanmış mikropate içeren İnvitrogen Rat TNF- α ELİSA Kit aracılığıyla serumdaki TNF- α 'nın bağlanma miktarınca gelişen renk şiddeti, 450 nm'de multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak tayin edildi. Serum TNF- α düzeyleri elde edilen standart eğri aracılığı ile hesaplandı ve pg/ml cinsinden ifade edildi.



Şekil 3.3. 2000 pg/ml Ana Stok TNF- α Çözeltisinden Standartların Hazırlanması



Şekil 3.4. Rat TNF- α ELİSA Kit Deney Prosedürü Özeti

3.5. Serum IL-6 Düzeylerinin Ölçülmesi

IL-6 düzeyleri, sıçanlardan elde edilen serum örneklerinde ELİSA kit ile çalışıldı. IL-6 düzeyleri, IL-6'ya ait monoklonal antikor ile kaplanmış mikropate içeren Boster Rat IL-6 ELİSA Kit ve eBioscience Rat IL-6 Platinum ELİSA Kit aracılığıyla serumdaki IL-6'nın bağlanma miktarınca gelişen renk şiddeti, 450 nm'de multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak tayin edildi. Serum IL-6 düzeyleri elde edilen standart eğri aracılığı ile hesaplandı ve pg/ml cinsinden ifade edildi.

3.6. Serum IL-1 β Düzeylerinin Ölçülmesi

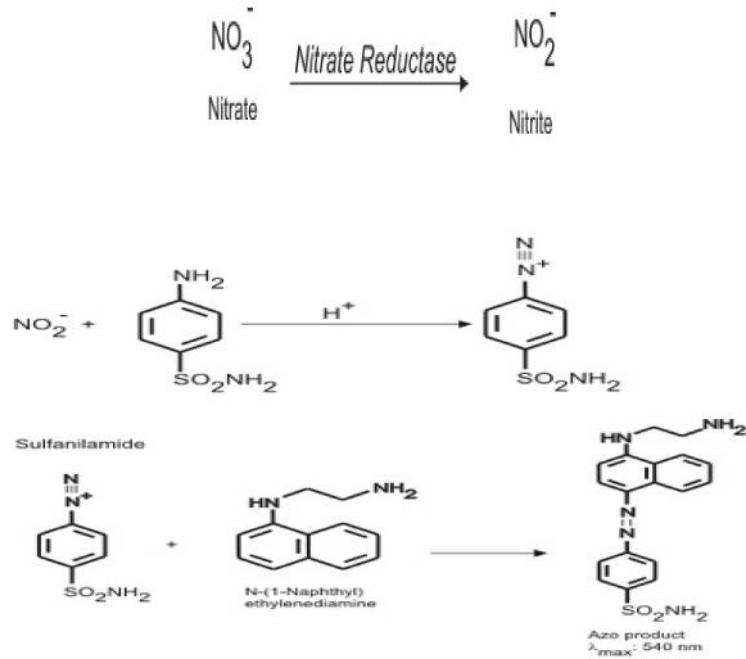
IL-1 β düzeyleri, sıçanlardan elde edilen serum örneklerinde Elisa kit ile çalışıldı. IL-1 β düzeyleri, IL-1 β 'ya ait monoklonal antikor ile kaplanmış mikropate içeren Boster Rat IL-1 β Elisa Kit ve eBioscience Rat IL-1 β Platinum Elisa Kit aracılığıyla serumdaki IL-1 β 'nın bağlanma miktarınca gelişen renk şiddeti, 450 nm'de multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak tayin edildi. Serum IL-1 β düzeyleri elde edilen standart eğri aracılığı ile hesaplandı ve pg/ml cinsinden ifade edildi.

3.7. Serum IL-10 Düzeylerinin Ölçülmesi

IL-10 düzeyleri, sıçanlardan elde edilen serum örneklerinde ELİSA kit ile çalışıldı. IL-10 düzeyleri, IL-10'ya ait monoklonal antikör ile kaplanmış mikropate içeren eBioscience Rat IL-10 Platinum ELİSA Kit aracılığıyla serumdaki IL-10'nın bağlanma miktarınca gelişen renk şiddeti, 450 nm'de multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak tayin edildi. Serum IL-10 düzeyleri elde edilen standart eğri aracılığı ile hesaplandı ve gruplar arasındaki farklılık %kontrol olarak verdi.

3.8. Serum Total Nitrit/Nitrat Düzeylerinin Ölçülmesi

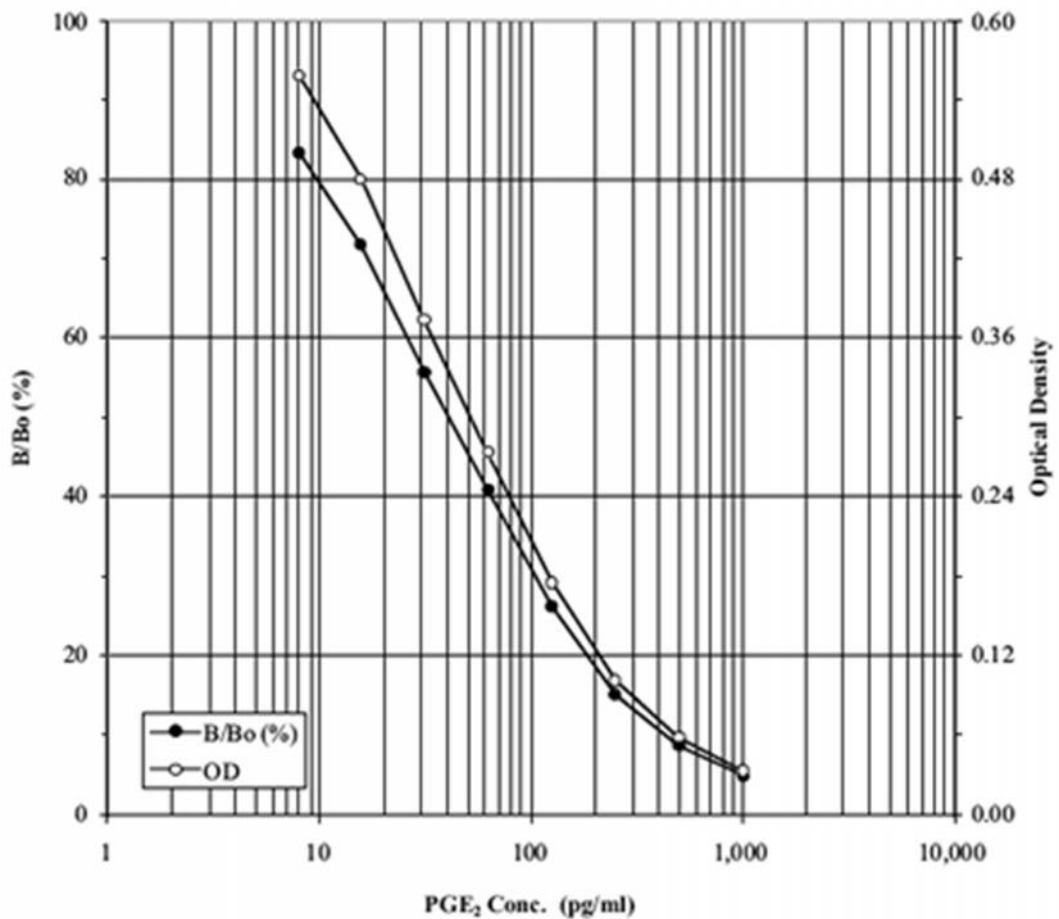
Total Nitrit-Nitrat düzeyleri, sıçanlardan elde edilen serum örneklerinde Cayman Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit ile çalışıldı. Total Nitrate/Nitrite düzeyleri ölçüm metodu iki basamaklıdır. İlk basamakta örneklerdeki nitrat, nitrat redüktaz ile nitrite dönüştürüldü. İkinci basamakta ortamdaki nitrit, Griess rejanları ile reaksiyona girerek oluşan mor renkli azo bileşikler, 540 nm dalga boyunda multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik ölçüldü.



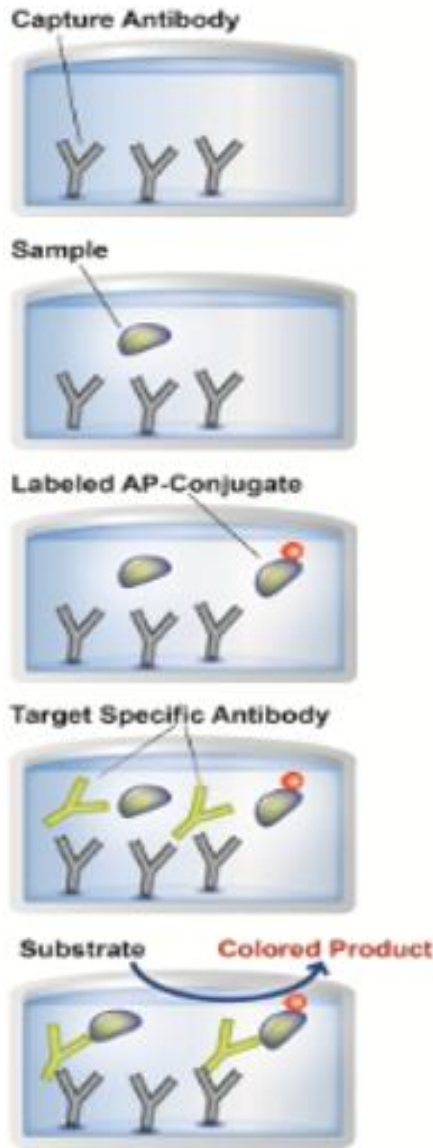
Şekil 3.5. Griess yöntemi ile Nitrat/Nitrit tayini

3.9. Serum ve Doku Homojenatında PGE₂ Düzeylerinin Ölçülmesi

Serum PGE₂ miktarları, Abcam PGE₂ ELİSA Kit ile ölçüldü. Karaciğer ve böbrek doku homojenatı süpernatantı PGE₂ miktarları ise Enzo Life Sciences ELİSA Kit ile ölçüldü. Kit prosedürlerine göre örnek ve standartlardaki PGE₂, alkaline fosfataz (AP) konjuge-PGE₂ antijen yarışmalı olarak monoklonal antikor'a bağlanır. Bağlanmadan sonra ortama fosfataz substratı olan p-nitrofenil fosfatın (pNPP) eklendi ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Reaksiyon stop solüsyonu ile sonlandırıldıktan sonra oluşan renk 412 nm dalga boyunda multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik ölçüldü. Standartlardan 4 parametrelili logistic nonlinear regresyon eğrisi çizdirildi. Örneklerdeki PGE₂ miktarları kontrole göre %artış-azalış şeklinde ifade edildi.



Şekil 3.6. PGE₂ standart eğrisi



Standartlar ve örnekler hazırlanır

100 μ L standartlar ve örnekler
kuyucuklara eklenir

Standart ve örneklerin üzerine
50 μ L AP-konjugatı eklenir.

50 μ L Spesifik antibody eklenir. Oda
sıcaklığında 2 saat inkübe edilir

Ortama AP substratı pNpp eklenir.
45 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
50 μ L stop solüsyonu eklenerek
oluşan rengin şiddeti 412 nm dalga
boyunda ölçülür.

Şekil 3.7. PGE₂ ELİSA Kit Deney Prosedürü Özeti

3.10. Doku Homojenatında iNOS Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

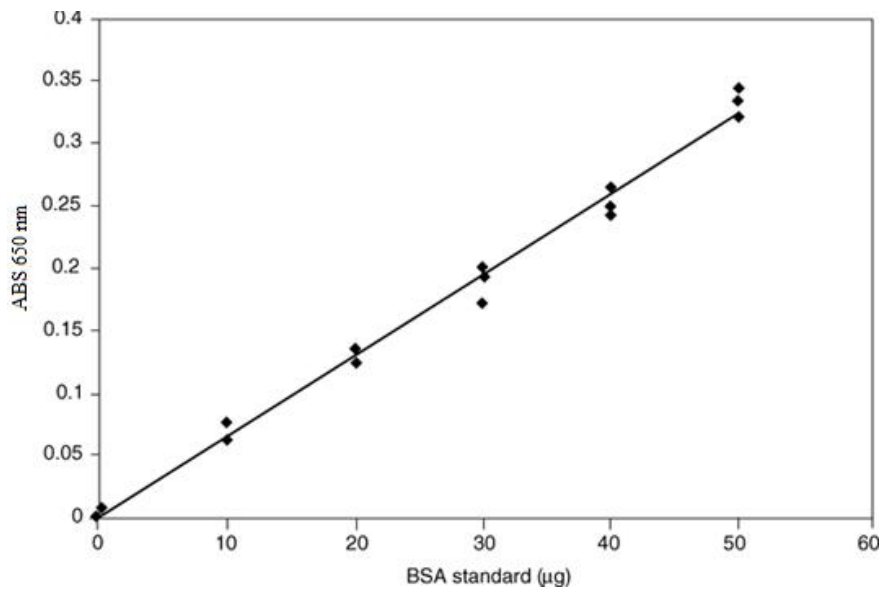
Nirik Oksit Sentaz düzeyleri, sıçanlardan elde edilen karaciğer ve böbrek doku homojenatında ELİSA kit ile çalışıldı. NOS aktivitesi; NOS'a ait monoklonal antikor ile kaplanmış mikropate içeren EIAab® Nitric Oxide Synthase ELİSA Kit aracılığıyla NOS bağlanma miktarınca gelişen renk şiddeti, 450 nm'de multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.11. Doku Homojenatında COX-2 Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

COX-2 düzeyleri, sıçanlardan elde edilen karaciğer ve böbrek doku homojenatında ELİSA kit ile çalışıldı. COX-2 aktivitesi; COX-2'e ait monoklonal antikor ile kaplanmış mikropate içeren EIAab® Rat Prostaglandin G/H Synthase 2 (COX-2) ELİSA Kit aracılığıyla COX-2 bağlanma miktarınca gelişen renk şiddeti, 450 nm'de multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.12. Lowry İle Protein Miktar Tayini

Karaciğer ve böbrek doku homojenatlarında Lowry yöntemiyle protein miktar tayini yapıldı (80). Lowry analizi boyunca tüm örnek ve standart protein çözeltileri buz içinde bekletildi. Taze hazırlanan Solüsyon A, Solüsyon B ve Solüsyon C çözeltileri 1:1:33 oranlarında karıştırılarak tampon çözelti hazırlandı. Her bir örnek ve standart için santrifüj tüpü hazırlandı ve 2 ml tampon çözelti eklendi ve tampon üzerine 10 µL örnek ve standartlar eklendi. Tüpler 3-5 dk vortekslendi ve 30 dakika bekletildi. Üzerlerine 200 µL 1N folin reaktifi eklendi, vortekslendi ve karanlıkta 30 dakika bekletildi. Tüplerden 100 µL örnek ve standartlar alınarak 96'lık plate dağıtıldı ve protein miktarları 650 nm dalga boyunda multifonksiyonel mikropate okuyucuda spektrofotometrik olarak tayin edildi. Protein konsantrasyonu µg/µL cinsinden hesaplandı.



Şekil 3.8. BSA standart eğrisi

3.13. Western Blot Deneyi

Western blot; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünojenik metotlarla gösterilmesidir. İlk defa 1979 yılında Towbin ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (81). Bu çalışmada karaciğer dokusunda iNOS, COX-2, mPGES-1 enzimlerine ait protein düzeylerine bakıldı.

İşlem 6 aşamada gerçekleştirildi:

1. **Western blotta poliakrilamid jelin hazırlanması;** Yığınlıyıcı ve ayırıcı olmak üzere jel çözeltileri hazırlandı. Jel içerikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.1. Yığınlıyıcı ve ayırıcı jel çözeltileri içerikleri

	Deiyonize su (mL)	%30 Bisacrylamide (mL)	Jel buffer (mL)	%10 w/v SDS (mL)
%5 Yığınlıyıcı jel çözeltisi	5,7	1,7	2,5	0,1
%8 Ayırıcı jel çözeltisi	4,7	2,7	2,5	0,1
%10 Ayırıcı jel çözeltisi	4,1	3,3	2,5	0,1

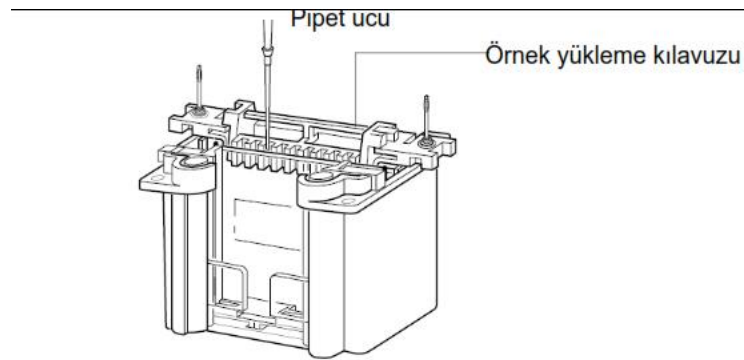


Şekil 3.9. Western blot jel dökme aparatı, elektroforez tankı ve güç kaynağı

Jel çözeltileri hazırlandıktan sonra dökme işlemi için aparat hazırlandı. Jel çözeltilerini aparata dökmeden hemen önce, donmayı sağlamak amacıyla, 10 mL jel çözeltisi için 100 μ L %10 luk amonyum persülfat (APS) çözeltisi ve N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) eklendi. Aparata önce ayırıcı jel çözeltisi döküldü ve jel üst sınırının düzgün olması için hava ile temas eden yüzeyine n-butanol dikkatlice eklendi. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki n-butanol döküldü ve jel distile su ile yıkandı. Jel

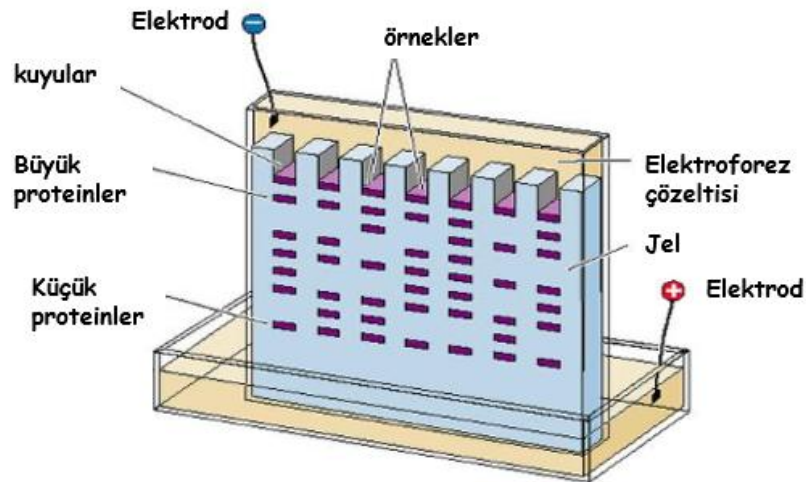
yüzeyindeki su uzaklaştırıldıktan sonra yığılayıcı jel çözeltisi dökülerek örnek kuyularını oluşturmak üzere 45° açıyla girerek tarak yerleştirildi. Yığılama jeli polimerleştikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve kuyular 1X elektroforez yürütme çözeltisi ile yıkandı.

2. **Örneklerin hazırlanması;** Protein miktarları eşit olacak şekilde yükleme tamponu içerisinde örnekler hazırlandı.
3. **Elektroforezin yapılması;** Jel elektroforez için tanka yerleştirildi. Örnekler kuyulara pipetlendi. 1X elektroforez yürütme çözeltisi ile tank dolduruldu.



Şekil 3.10. Örneklerin kuyulara yüklenmesi

Örnekler yığılayıcı jelde 80 V ile yürütölmeye başlandı ve ayırıcı jele geçince voltaj 150 V çıkarıldı. Bromofenol mavisi jelin en alt sınırına gelince elektroforez sonlandırıldı.



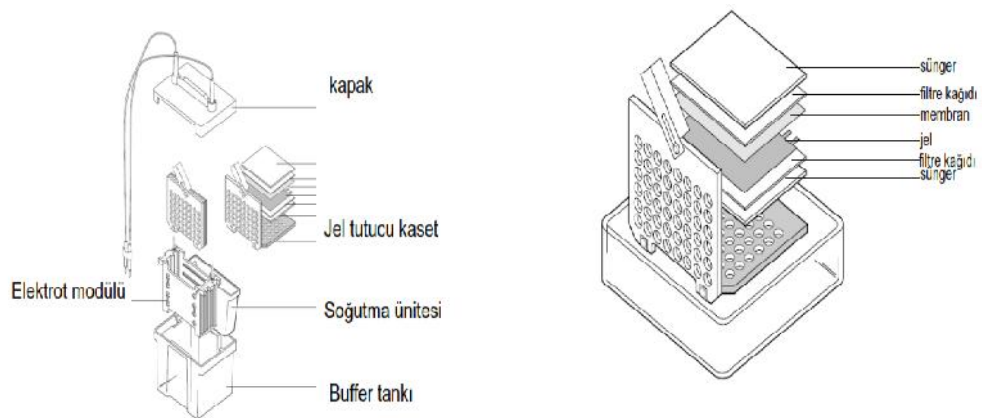
Şekil 3.11. Örneklerdeki proteinlerin jelde göçü

4. Western blotta proteinlerin membrana transferi; jeldeki proteinlerin tamamının jeldeki yerlerini ve ayrılma derecelerini bozmadan protein tutucu (Nitroselüloz, Polivinilidenflorür (PVDF)) membrana aktarılmasıdır. Elektroforez tamamlandıktan sonra jelde protein bulunmayan yığılma kısmı kesilip atıldı. Jel, kaset, sünger, filtre kağıdı içinde transfer çözeltisi bulunan uygun bir kaba alındı. PVDF membran uygun boyutta (6cm*8cm) kesilerek %100 lük metanol içinde 15 saniye tutularak hidrate edildi ve aynı kab içerisine alındı.



Şekil 3.12. Western blot transfer tankı

Kasetin siyah yüzü alt tarafa gelecek şekilde açıldı ve sırasıyla sünger-filtre kağıdı-jel-membran-filtre kağıdı-sünger yerleştirilerek kapatıldı. Kaset dikey olarak, renksiz yüzü elektrod modülünün kırmızı kısmına, siyah yüzü elektrod modülünün siyah kısmına bakacak şekilde yerleştirildi. Güç kaynağı 250 mA ayarlanarak 1,5 saat soğukta transfer yapıldı.



Şekil 3.13. Western blot transfer tankı ve transfer sandviçi hazırlanması

5. Membranların primer ve sekonder antikor ile inkübasyonu; Transfer sonlandıktan sonra membran 10 ml TBST çözeltisi içinde hazırlanan %5 lik süt tozu ile 1 saat blokaj yapıldı. Sonrasında TBST ile hazırlanan primer antikor içinde 1 gece 4°C’de inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 3 defa 10 dk TBST ile yıkandı ve 2 saat sekonder antikor içinde oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 2 defa 10 dk TBST ile yıkandı.

6. Görüntüleme işlemi; Karanlık odada görüntüleme işlemine geçildi. Membran şeffaf dosya üzerine koyuldu. Karanlık odada görüntülemeye kolaylık sağlaması açısından fosforlu etiketlerle işaretlendi. Üzerine 1 mL 1:1 oranında karıştırılmış kemolüminisans görüntüleme solüsyonu eklendi. Işıma meydana geldiğinde röntgen filmi membranın üzerine kapatıldı. 1 dk bekletildi. Film önce developer solüsyonunda kısa süre bekletildi, sonra suda yıkandı, daha sonra fixer solüsyonunda bekletildi ve tekrar yıkandı. Banyo sonrası filmde siyah bantlar görüldü.

Elde edilen bantların yoğunlukları İmaj-j programı yardımıyla hesaplandı. Gruplardaki enzim oranları kontrole göre % olacak şekilde grafik ile gösterildi.

3.14. RNA İzolasyonu ve qRT-PCR Deneyi

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), ilk defa Kary Mullis tarafından 1985’ te bulunmuş ve 1993 yılında bu çalışma ile Nobel ödülü kazanmıştır (81). Bu yöntem, DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak (amplifikasyon) için kullanılan, moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan *in vitro* bir tekniktir. Bu yöntemle hücre içinde gerçekleşen doğal replikasyonu bir tüp içinde taklit edilir. PCR ile DNA nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında; çoğaltılacak olan kalıp DNA, bu DNA da çoğaltılması planlanan bölgedeki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler, enzim olarak Taq polimeraz, sentezde kullanılacak deoksinükleotid trifosfatlar, polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler bulunmalıdır. Bu yöntemle RNA çoğaltılmak istenirse bunun önce reverse transkriptase kullanılarak DNA kopyası çıkarılır ve PCR ile bu DNA molekülü çoğaltılır (82).

Bu çalışmada karaciğer ve böbrek dokusunda iNOS, COX-2, mPGES-1 inflamasyonda rol alan enzimlere ait genlerin mRNA düzeylerine bakıldı.

İşlem 3 aşamada gerçekleştirildi:

1. RNA Ekstraksiyonu: 50-100 mg arasında tartılan dokular steril 2 mL hacmindeki ependorf tüplerine alındı. Üzerine 1000µl Tripure çözeltisi eklenerek buz içerisinde homojenize edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekleme sonrasında herbirinin üzerine 200 µl kloroform eklendi. 12000g'de 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen üç fazlı çözeltide, en üstteki renksiz RNA içeren faz alındı. Üzerine 500µl izopropanol eklendi. Elde çalkalandı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. 12000g'de 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml etanol eklenerek, 7500g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet kurutuldu. RNAaz içermeyen su ile daha önce hesaplanmış miktarlarda resüspande edildi. 65°C'de 15 dk bekletildi. 230, 260 ve 280 nm'de spektrofotometrede miktar ve saflık tayini yapıldı.

2. RNA'dan cDNA elde edilmesi: cDNA eldesi üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleşir. Bu işlem için amaca yönelik olarak hazırlanmış otomatize sistemlerden (Thermal Cycler) yararlanıldı. 10 dk 29°C de, 60 dk 48°C de, 5 dk 85°C de cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA sentez kitinden yararlanarak reaksiyon için gerekli maddeler hazırlandı.

Tablo 3.2. cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve 1 reaksiyon için gerekli miktarları

Maddeler	1 Reaksiyon miktarı
RNA	1000 ng
Random primer	1 µL
Oligo DT	1 µL
RNAaz inhibitörü	0,5 µL
dNTP(deoksinükleotit mix)	2 µL
RT buffer	4 µL
RT(Revers Transkriptaz) enzimi	1,1 µL
DTT	1 µL
RNAaz içermeyen su	Değişkendir. Total hacim 20µL'ye su ile tamamlanır.

Elde edilen bu cDNA 1/5 oranında RNAaz içermeyen su ile dilüe edilerek iNOS, COX-2 ve mPGES-1 enzimleri için gerçek zamanlı PZR cihazı ile mRNA ekspresyonlarına bakıldı.

3. qRT-PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu); Gerçek Zamanlı PZR sistemi, floresan boyalar ya da probalar kullanılarak PCR ürününün reaksiyon sırasında görüntülenmesine olanak verir. Ürünün çoğalımı floresan sinyalin artışına neden olduğundan, her döngüde artan DNA miktarı reaksiyon süresince hassas olarak ölçülür. Bu çalışmada gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında hidroliz prob yöntemi kullanıldı.

Gerçek zamanlı PZR ile cDNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımına; çoğaltılacak olan kalıp cDNA, bu cDNA'da çoğaltılması planlanan bölgedeki cDNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler, RNAaz ve DNAaz içermeyen su ve Roche FastStart Essential DNA Probes Master Mix (enzim olarak Taq polimeraz, sentezde kullanılacak deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP), magnezyum klorür ($MgCl_2$), polimerazın çalışması için tampon) eklendi. Reaksiyon hacmi 20 μL 'ye ayarlandı.

95°C de 600 saniye 1 kez ve 2 aşamalı amplifikasyon da 95°C de 10 saniye 60°C de 30 saniye olacak şekilde 45 kez reaksiyon yürütüldü.

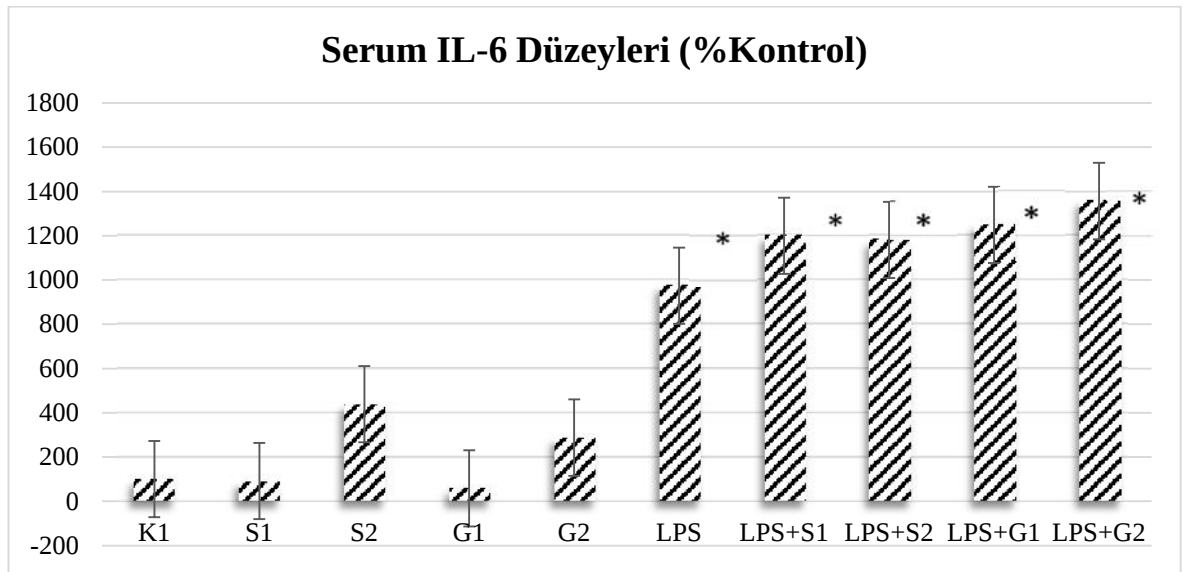
3.15. İstatistiksel Analiz

Çalışma gruplarından elde edilen örneklerden ölçülen parametreler SPSS 18.0 bilgisayar programı kullanılarak analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediğine Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleriyle bakıldı. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi ANOVA veya Kruskal-Wallis testleri kullanılarak gerçekleştirildi. Post Hoc analiz olarak Tukey testi yapıldı. Normal dağılım göstermeyen gruplarda ikili karşılaştırma Mann-Whitney-U testi ile yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,001$ ve $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Pilot Çalışma Serum IL-6 ve IL-1 β Düzeyleri

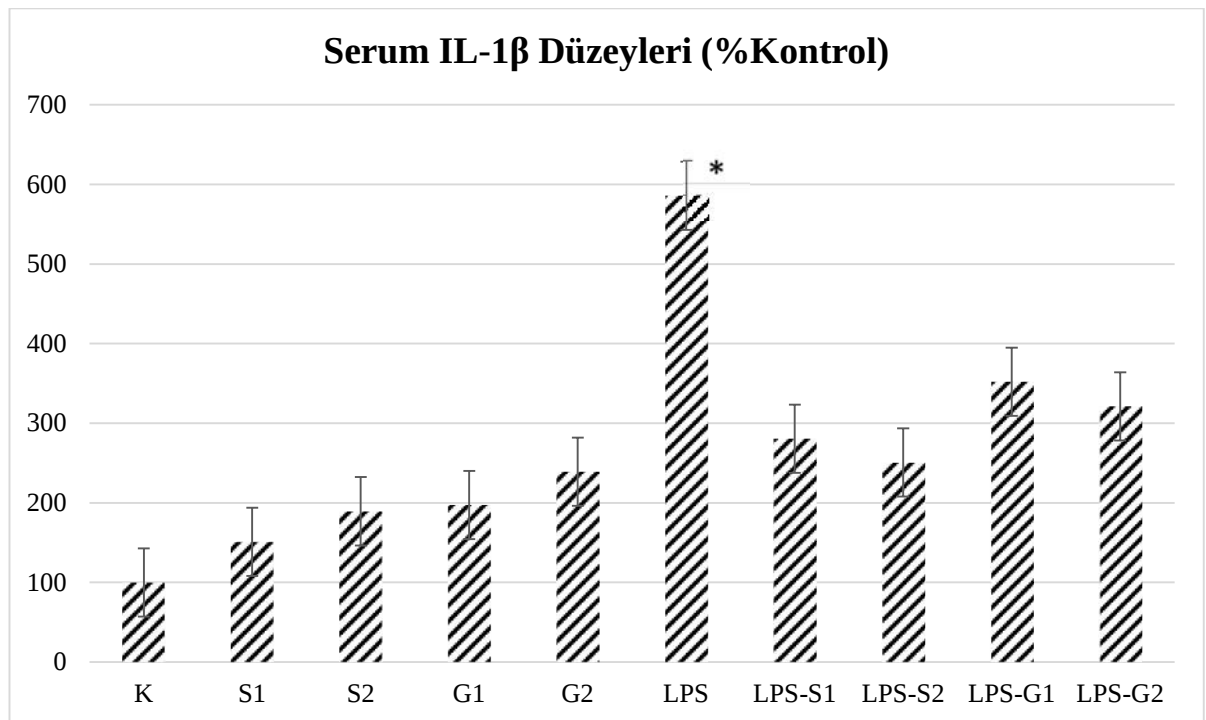
Serum IL-6 düzeylerine bakıldığında, 15 mg/kg olarak uygulanan LPS kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) bir şekilde artırmıştır. LPS uygulamasından sonra iki farklı dozda uygulanan 6-gingerol ve 6-shogaol'un her iki dozlarında da serum IL-6 düzeylerini artırdığı görülmüştür. Proinflatuar ve antiinflatuar özelliği olan IL-6 düzeyleri için beklenen bir durumdur.



K;kontrol, **S1**;6-shogaol (1 mg/kg), **S2**; 6-shogaol (4 mg/kg), **G1**; 6-gingerol (1 mg/kg), **G2**; 6-gingerol (4 mg/kg), **LPS**; Lipopolisakkarit (15 mg/kg), **LPS-S1**; Lipopolisakkarit (15 mg/kg)+ 6-shogaol (1 mg/kg), **LPS-S2**; Lipopolisakkarit (15 mg/kg)+ 6-shogaol (4 mg/kg), **LPS-G1**; Lipopolisakkarit (15 mg/kg)+ 6-gingerol (1 mg/kg), **LPS-G2**; Lipopolisakkarit (15 mg/kg)+ 6-gingerol (4 mg/kg), * $p<0.001$ kontrol grubundan farklı

Şekil 4.1. Pilot Çalışma Serum IL-6 Düzeyleri (%kontrol)

Serum IL-1 β düzeylerine bakıldığında, 15 mg/kg olarak uygulanan LPS kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) bir şekilde artırmıştır. İki farklı dozda uygulanan 6-gingerol ve 6-shogaol'ün her ikisinde IL-1 β düzeylerini düşürmede 4 mg/kg uygulanan dozlarında daha etkin oldukları görüldü. Ana çalışmada 6-gingerol ve 6-shogaol'ün tedavi dozlarının 4 mg/kg olmasına ve sepsis oluşturmak için uygulanacak LPS dozunun 15 mg/kg olmasına karar verildi.

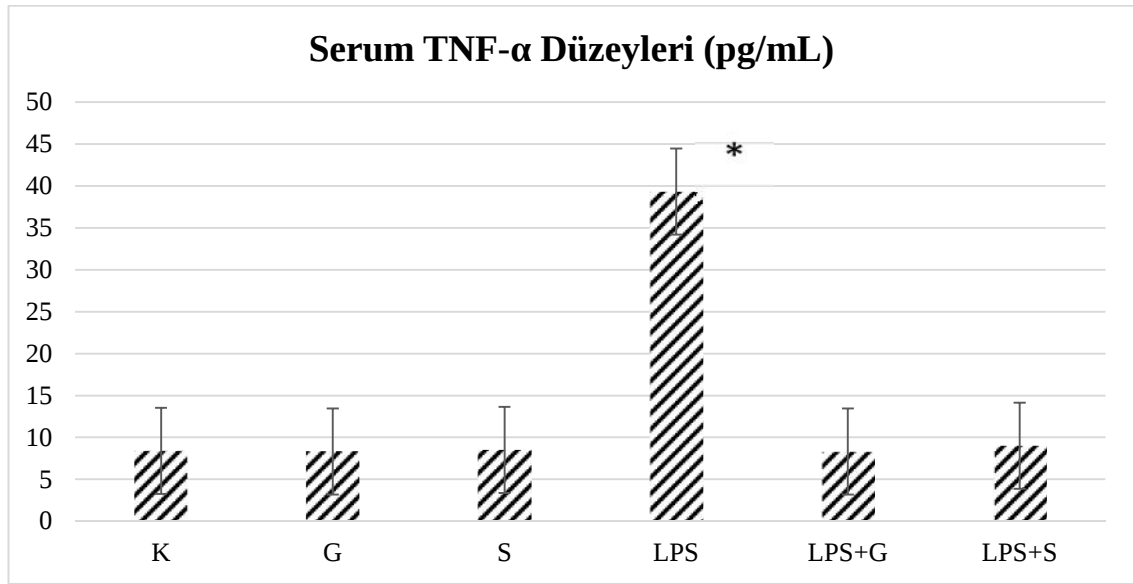


* $p<0.001$ diğer gruplardan farklı

Şekil 4.2. Pilot Çalışma Serum IL-1 β Düzeyleri (%kontrol)

4.2. Serum TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 Düzeyleri

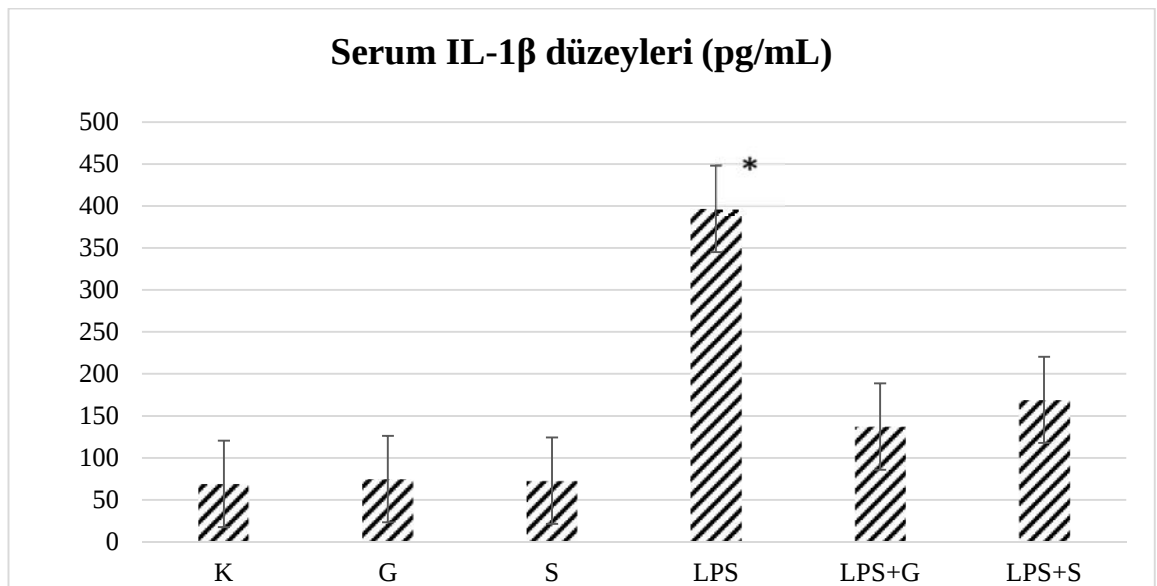
LPS uygulanan grup, kontrol grubuna göre serum TNF- α düzeylerini artırmıştır. LPS sonrası 6-gingerol ve 6-shogaol uygulaması TNF- α düzeylerini kontrol grubuna yaklaştırmıştır. Bu değişim istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) bulunmuştur.



K; kontrol, G; 6-gingerol (4 mg/kg), S; 6-shogaol (4 mg/kg), LPS; Lipopolisakkarit (15 mg/kg), LPS-G; Lipopolisakkarit (15 mg/kg)+ 6-gingerol (4 mg/kg), LPS-S; Lipopolisakkarit (15 mg/kg)+ 6-shogaol (4 mg/kg), * p<0.001 diğer gruplardan farklı

Şekil 4.3. Serum TNF-α düzeyleri (pg/mL)

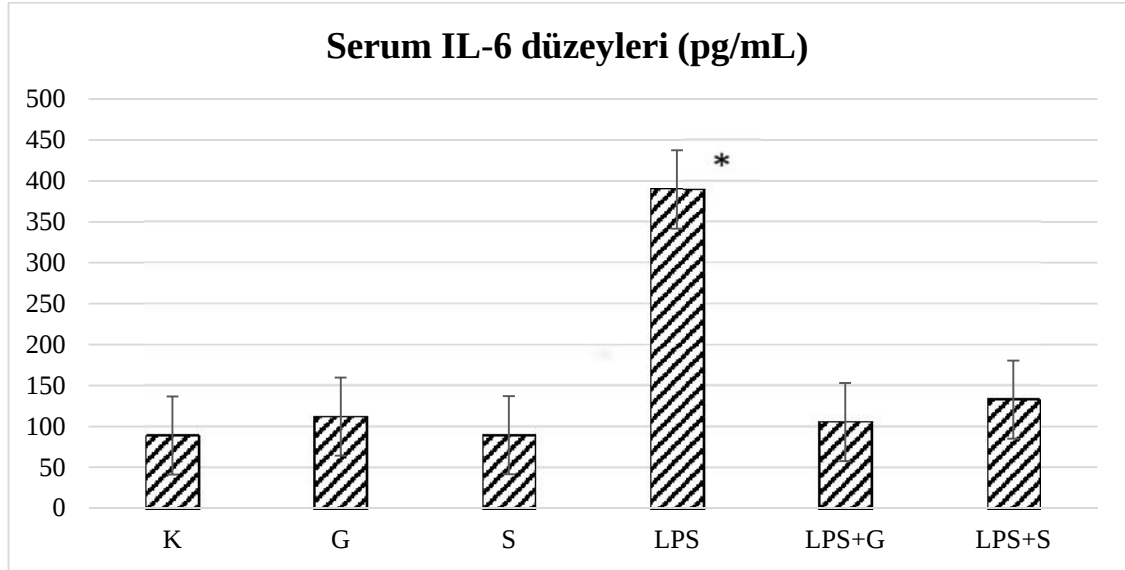
LPS uygulaması ile proinflatuar özellikte bir sitokin olan IL-1β serum düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı (p<0.001) bir şekilde artmıştır. Tedavi gruplarında ise IL-1β serum düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma 6-gingerol ile tedavi edilen grupta daha fazladır.



* p<0.001 diğer gruplardan farklı

Şekil 4.4. Serum IL-1β düzeyleri (pg/mL)

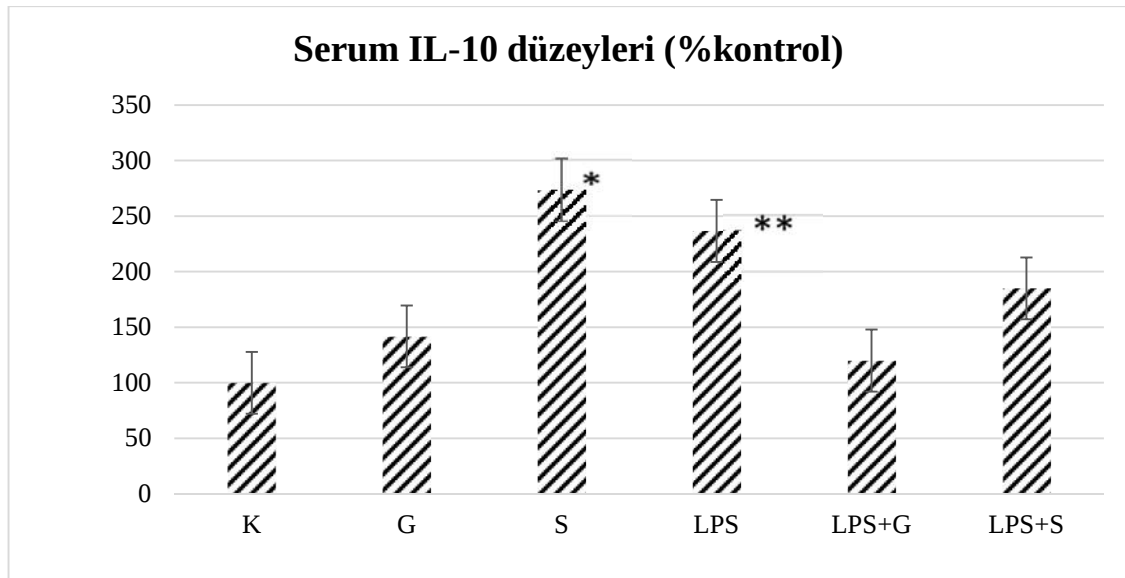
Serum IL-6 düzeyleri ise TNF- α ve IL-1 β düzeyleri ile uyumlu olarak LPS uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ve tedavi gruplarında ise azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak ($p<0.001$) anlamlıdır.



* $p<0.001$ diğer gruplardan farklı

Şekil 4.5. Serum IL-6 düzeyleri(pg/mL)

Antienflamatuar sitokin olan IL-10'nun serum düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna göre 6-shogaol (S) ve LPS gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) artış ve tedavi gruplarında (LPS+G $p<0.001$, LPS+S $p<0.05$) ise istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir.

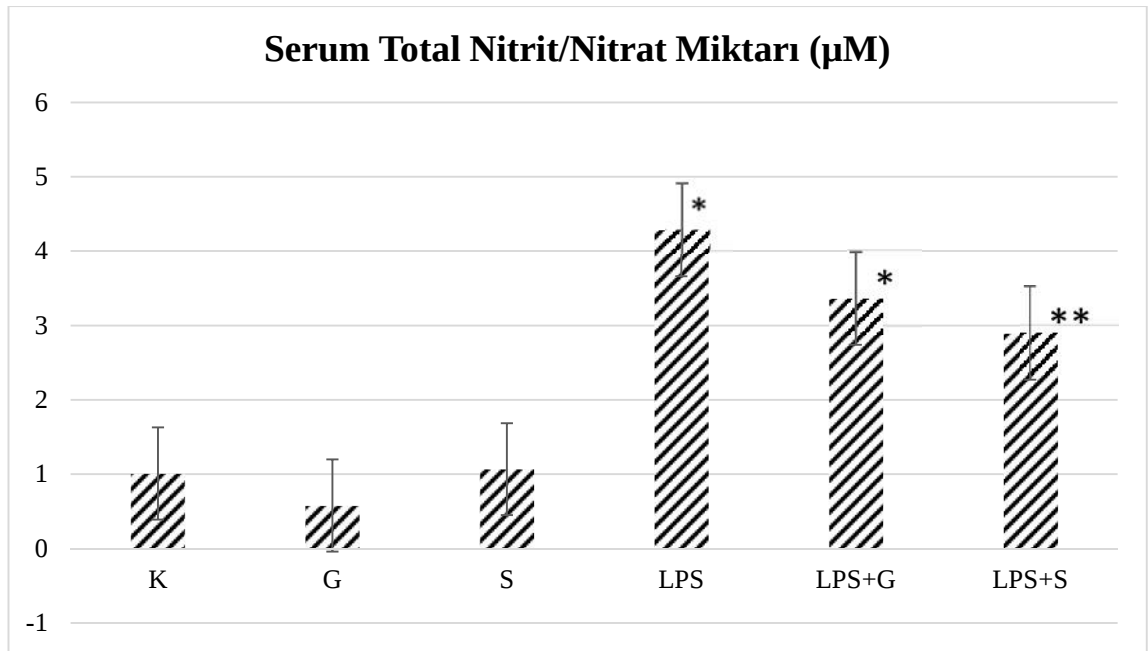


* $p<0.001$ (K, G ve LPS+G gruplarından farklı), * $p<0.05$ (LPS+S grubundan farklı)

Şekil 4.6. Serum IL-10 düzeyleri (%kontrol)

4.3. Serum Total Nitrit/Nitrat Düzeyleri

Serum total Nitrit/Nitrat miktarı LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre artmıştır. Bu artış istatistiksel ($p<0.05$) olarak anlamlıdır. Tedavi gruplarında azalma gözlenmiştir ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tedavi gruplarındaki serum total Nitrit/Nitrat miktarı kontrol, 6-gingerol ve 6-shogaol uygulanan gruplardan istatistiksel ($p<0.05$) olarak yüksektir.

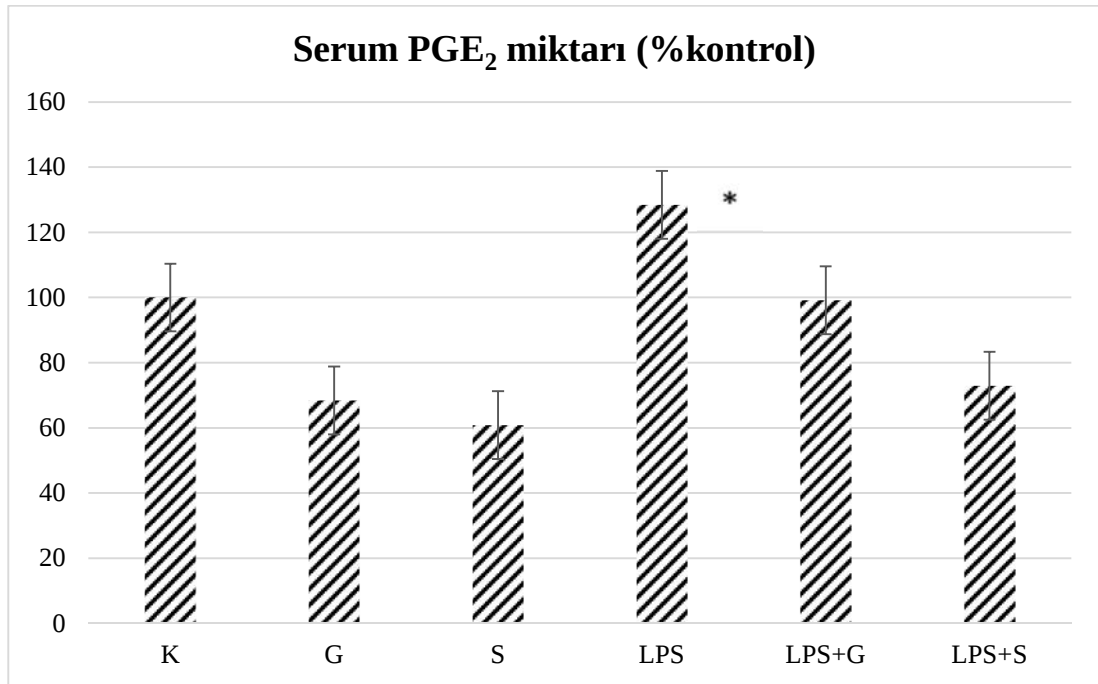


* $p<0.05$ Kontrol, 6-gingerol ve 6-shogaol uygulanan gruplardan farklı, ** $p<0.05$ 6-gingerol ve 6-shogaol uygulanan gruplardan farklı

Şekil 4.7. Serum Total Nitrit/Nitrat Miktarı (µM)

4.4. Serum ve Doku Homojenatı PGE₂ Düzeyleri

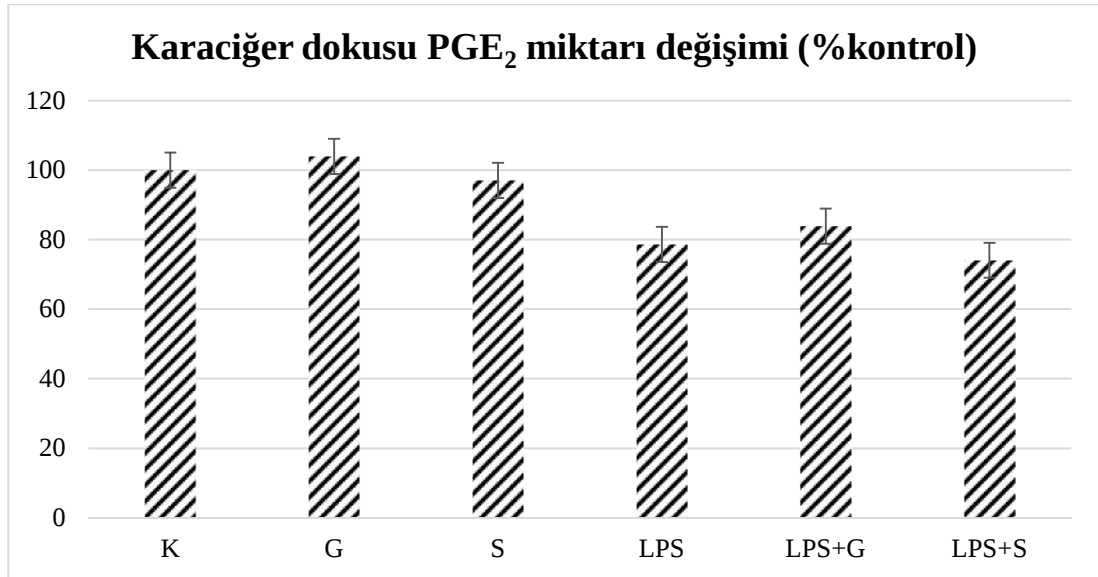
Serum PGE₂ miktarları kontrole göre %değişim şeklinde verilmiştir. Hem enflamasyon varlığında hem de enflamasyon yokken 6-gingerol ve 6-shogaol serum PGE₂ miktarını azaltmıştır. Bu değişimler istatistiksel ($p<0.05$) olarak anlamlıdır.



* p<0.05 anlamlı (G, S, LPS+G, LPS+S gruplarına göre)

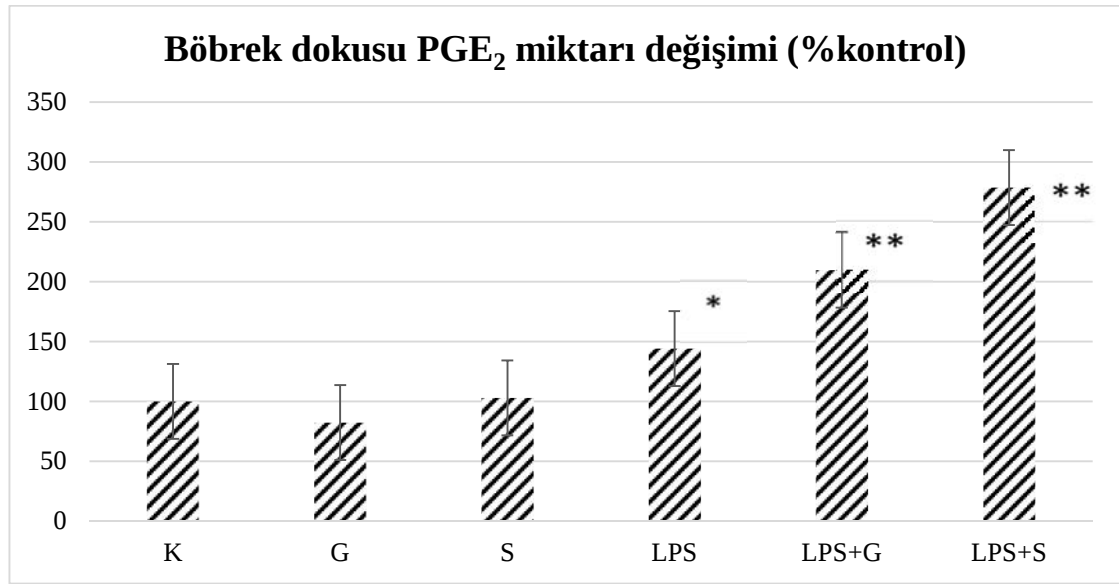
Şekil 4.8. Serum PGE₂ miktarı (%kontrol)

Karaciğer dokusu PGE₂ miktarına bakıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.



Şekil 4.9. Karaciğer dokusu PGE₂ miktarı değişimi (%kontrol)

Böbrek dokusu PGE₂ miktarına bakıldığında ise LPS varlığında PGE₂ düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel (p<0.05) olarak anlamlı bir şekilde artmış ve tedavi gruplarında ise bu artış daha fazla olmuştur (p<0.001).

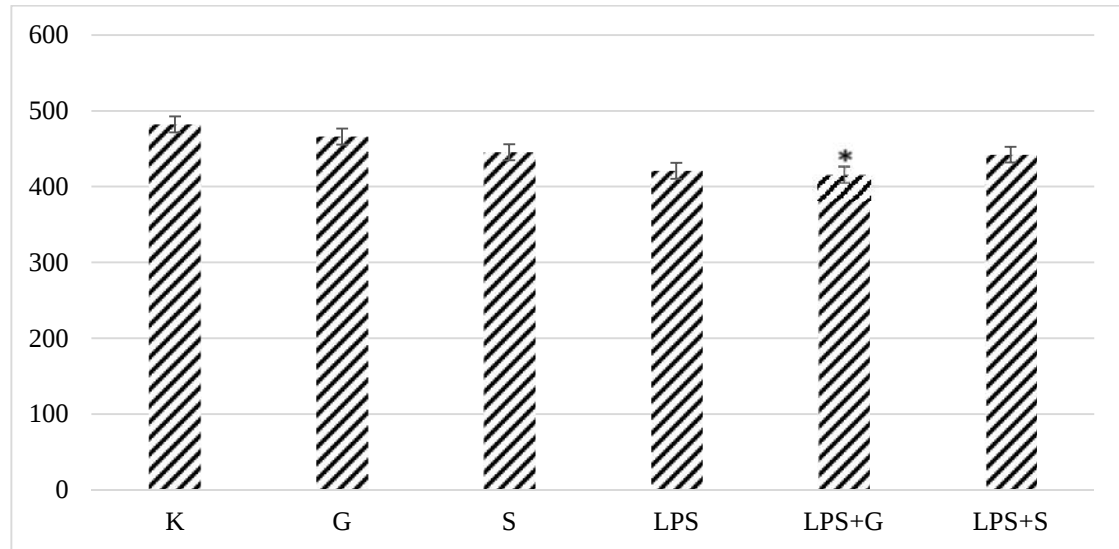


* p<0.05 anlamlı, ** p<0.001 anlamlı

Şekil 4.10. Böbrek dokusu PGE₂ miktarı değişimi (%kontrol),

4.5. Doku Homojenatı iNOS Enzim Aktivitesi

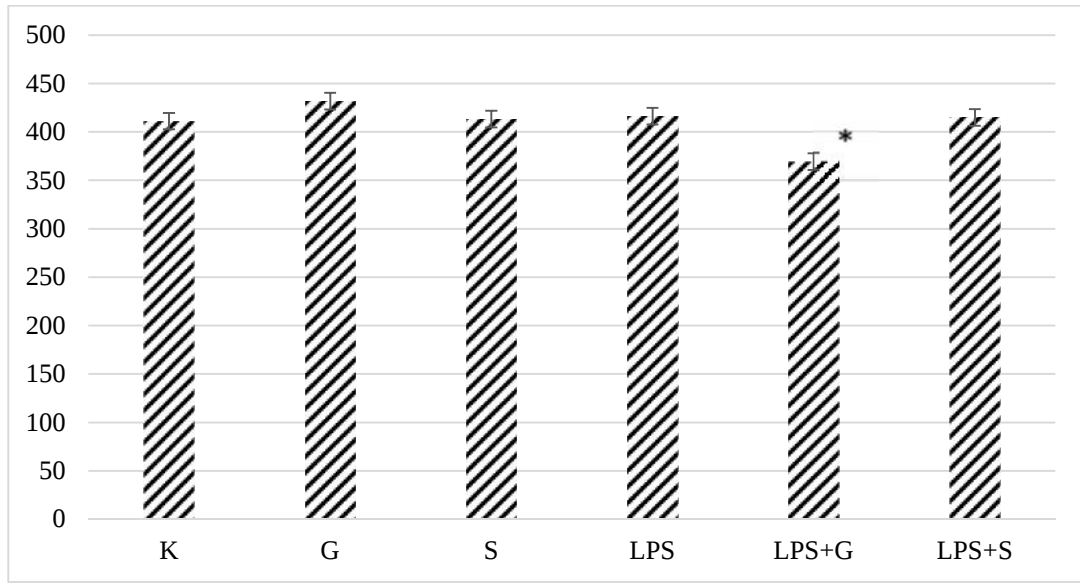
Karaciğer doku homojenatında iNOS enzim aktivitesini, sepsis oluşturduktan sonra 6-gingerol uygulaması kontrole göre istatistiksel ($p<0.05$) olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.



* p<0.05 (kontrol grubuna göre)

Şekil 4.11. Karaciğer dokusu iNOS enzim aktivitesi (nmol/L)

Böbrek doku homojenatında karaciğer doku homojenatında olduğu gibi sepsis sonrası 6-gingerol uygulaması diğer tüm gruplara göre iNOS enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde azaltmıştır.

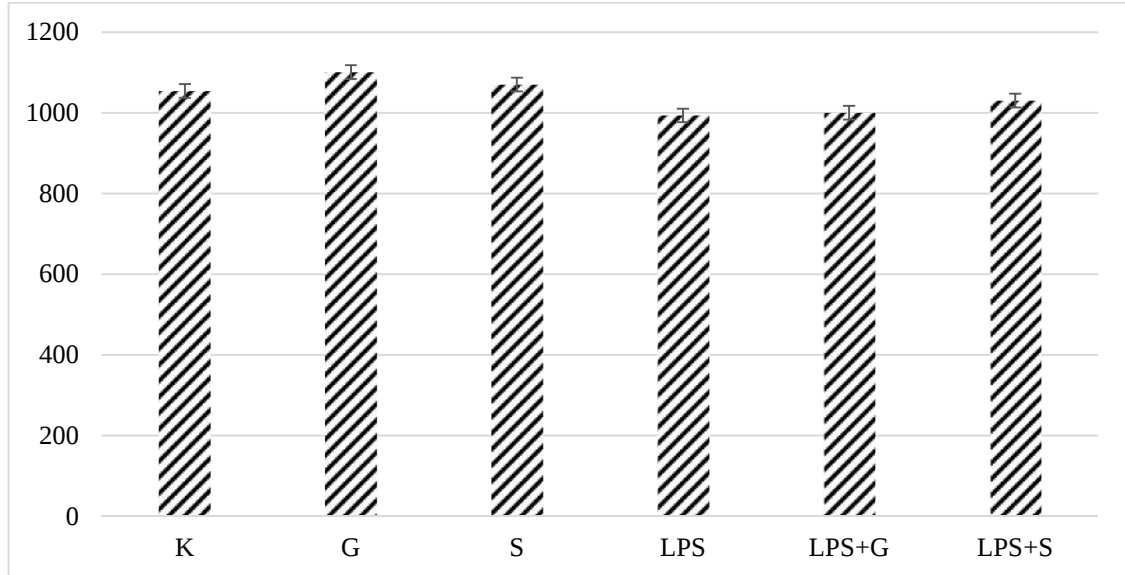


* $p < 0.05$ (diğer grubundan farklı)

Şekil 4.12. Böbrek dokusu iNOS enzim aktivitesi (nmol/L)

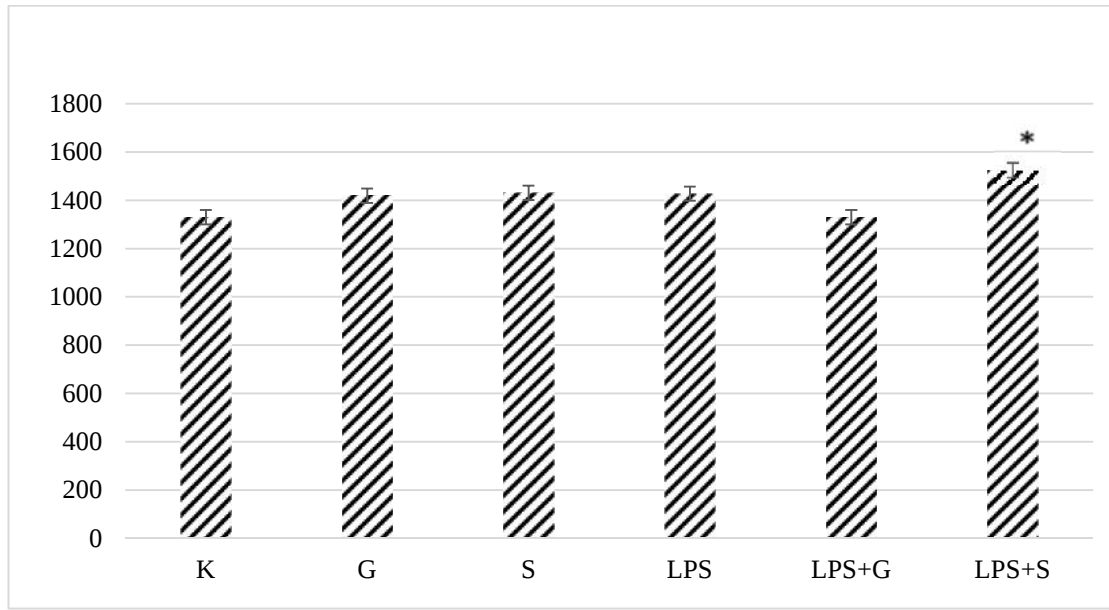
4.6. Doku Homojenatı COX-2 Enzim Aktivitesi

Karaciğer doku homojenatında COX-2 enzim aktivitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.13. Karaciğer dokusu COX-2 enzim aktivitesi (nmol/L)

Böbrek doku homojenatında COX-2 enzim aktivitesi sepsis sonrası 6-shogaol uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde artmıştır.



* p<0.05 (kontrol grubundan farklı)

Şekil 4.14. Böbrek dokusu COX-2 enzim aktivitesi (nmol/L)

4.7. Lowry İle Protein Miktar Tayini

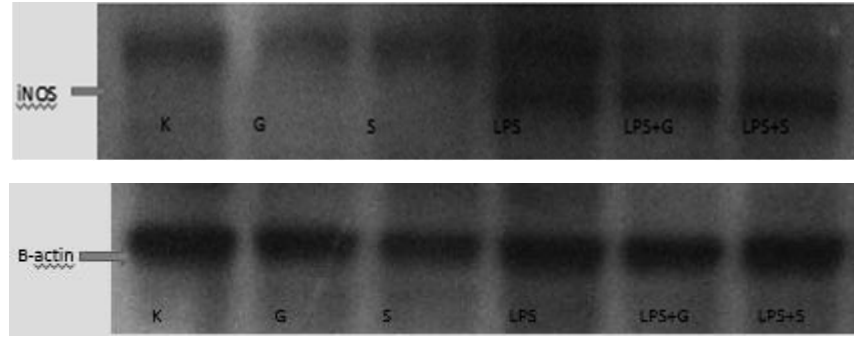
Yaklaşık ağırlıkları 1 gram karaciğer ve böbrek dokusu 3 mL proteinaz inhibitörü içeren deiyonize su ile buz içerisinde homojenize edildikten sonra 4°C, 12000 g, 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantları alındı. Süpernatantlarda protein miktar tayini yapıldı.

Tablo 4.1. Doku protein miktarı

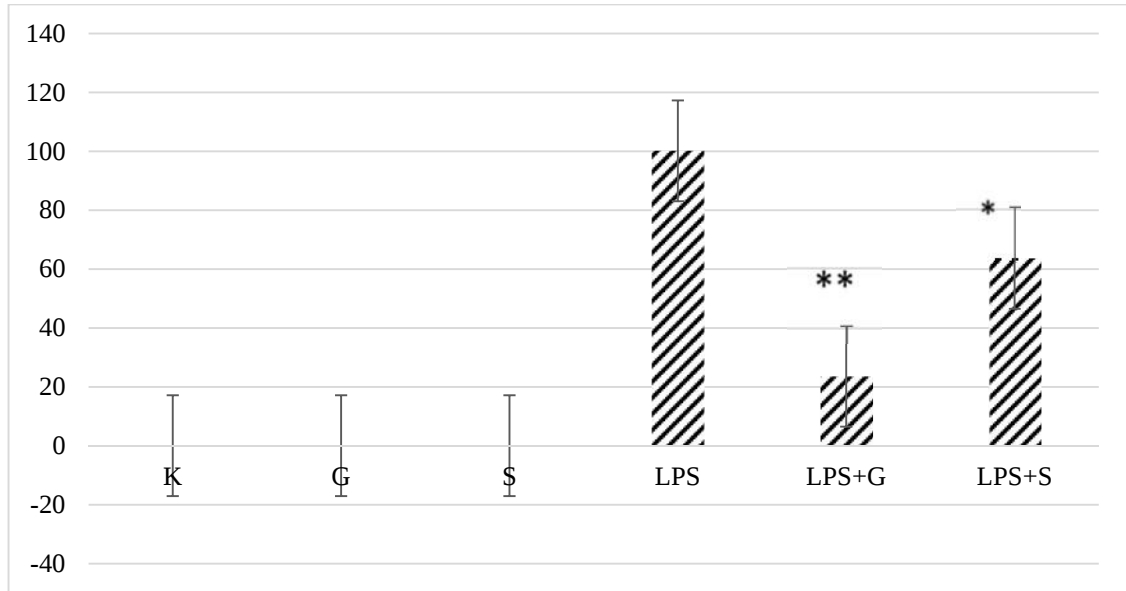
	Doku protein miktarı(µg/µL)
Karaciğer	51,44±11,14
Böbrek	52,21±11,78

4.8. Western Blot Deneyi Sonuçları

Karaciğer dokusundaki 130 kDa ağırlığındaki iNOS enzimini görüntüleyebilmek için elektroforez jelinin kuyucuklarına 50 µg protein yüklendi. Kontrol, 6-gingerol ve 6-shogaol uygulanan gruplarda iNOS'a ait bant izlenmedi (Şekil 4.15). Bakteri lipopolisakkariti ile sepsisin indüklendiği gruplarda bantlar görülmüştür ve bant konsantrasyonları Şekil 4.16 da verilmiştir.



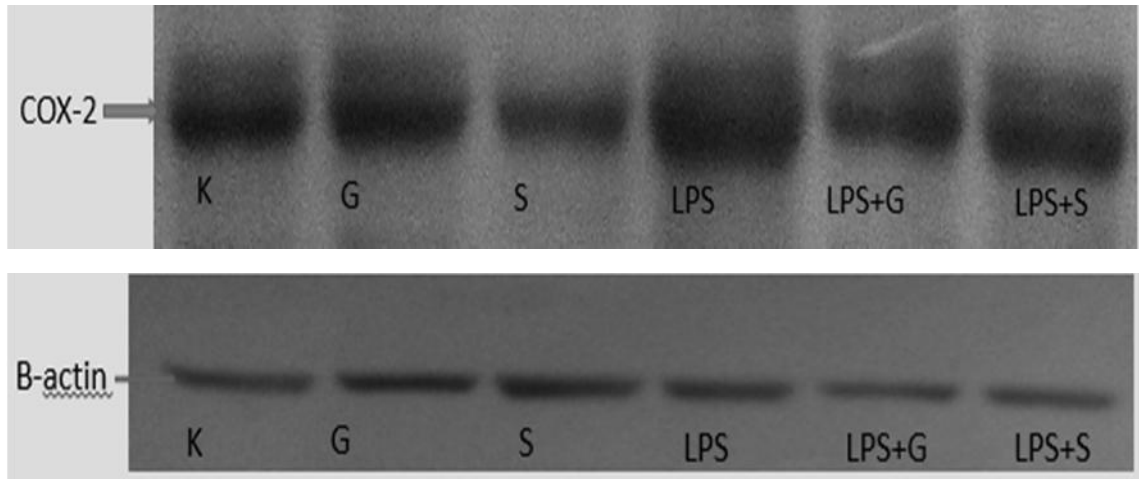
Şekil 4.15. iNOS enzimi western blot görüntüleri



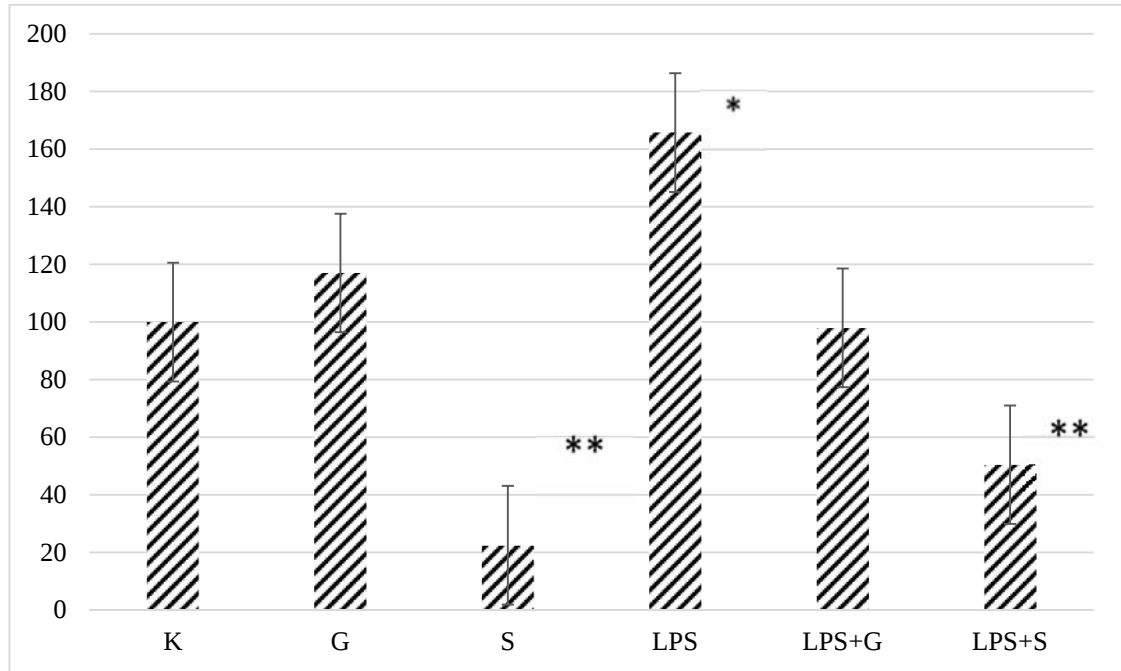
Sonuçlar LPS grubu 100 kabul edilip %konsantrasyon şeklinde verilmiştir. * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı (LPS ve LPS+G gruplarına göre), ** $p < 0.001$ istatistiksel olarak anlamlı (LPS grubuna göre)

Şekil 4.16. Karaciğer dokusunda iNOS enzimine ait Western Blot görüntü konsantrasyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.

Karaciğer dokusundaki 72 kDa ağırlığındaki COX-2 enzimini görüntüleyebilmek için elektroforez jelinin kuyucuklarına 30 µg protein yüklendi. Tüm gruplarda bantlar görüntülendi (Şekil 4.17). Bant konsantrasyonlarına ait grafik Şekil 4.18 de verilmiştir.



Şekil 4.17. COX-2 enzimi western blot görüntüleri

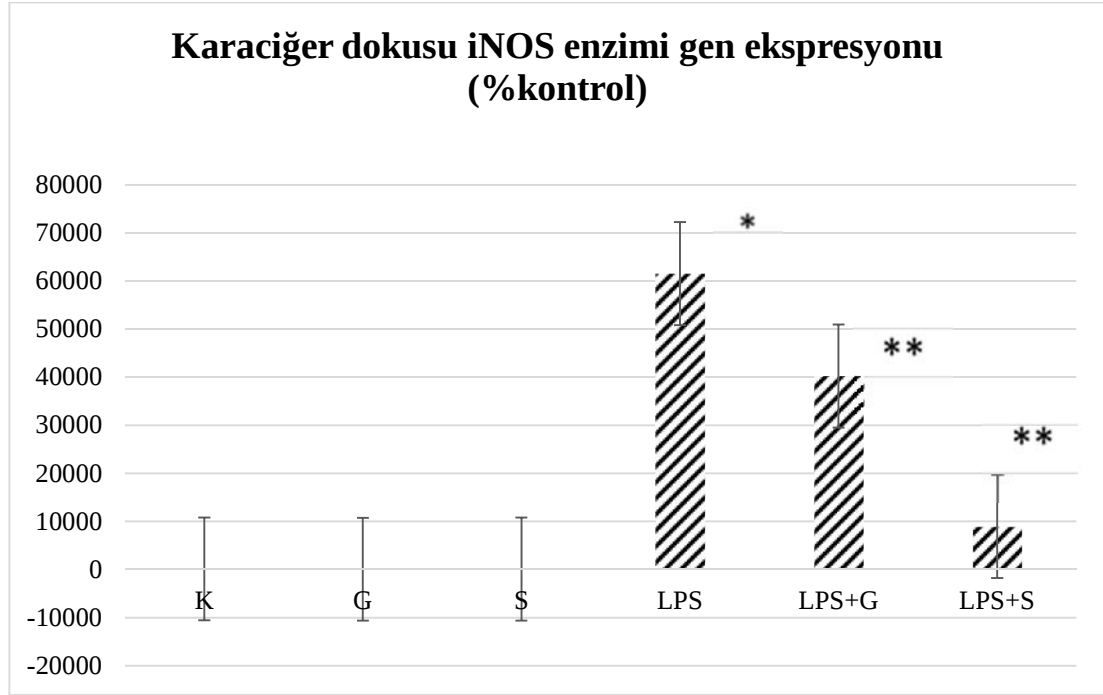


Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip % konsantrasyon şeklinde verilmiştir. * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı artış (K, G ve LPS+G gruplarına göre), ** $p < 0.001$ istatistiksel olarak anlamlı azalış (K, G, LPS, LPS+G gruplarına göre)

Şekil 4.18. Karaciğer dokusunda COX-2 enzimine ait Western Blot görüntü konsantrasyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.

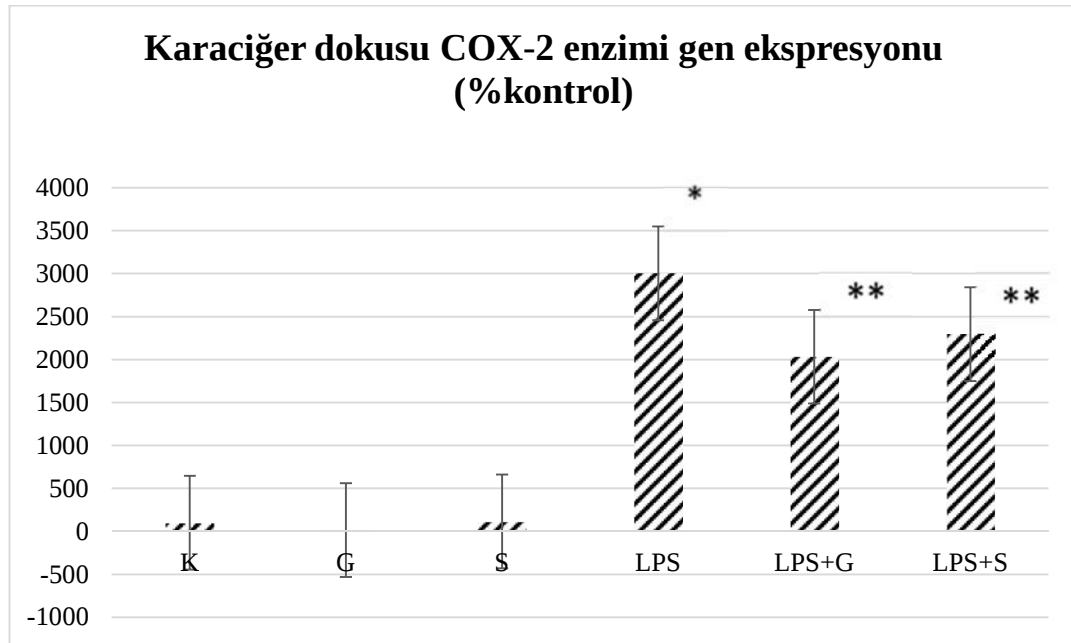
4.9. qRT-PCR Deneyi Sonuçları

Karaciğer ve böbrek dokusunda iNOS, COX-2 ve mPGES-1 enzimlerinin mRNA düzeylerine bakılmıştır.



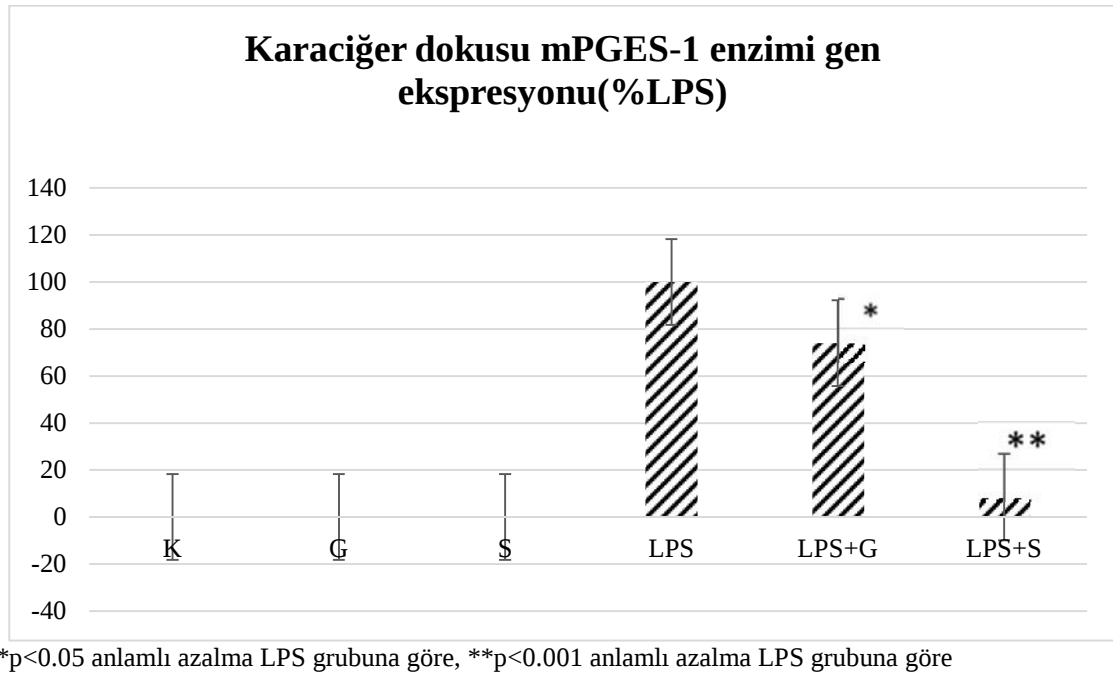
* $p < 0.001$ anlamlı artış K, G, S gruplarına göre, ** $p < 0.05$ anlamlı azalma LPS grubuna göre

Şekil 4.19. iNOS enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)



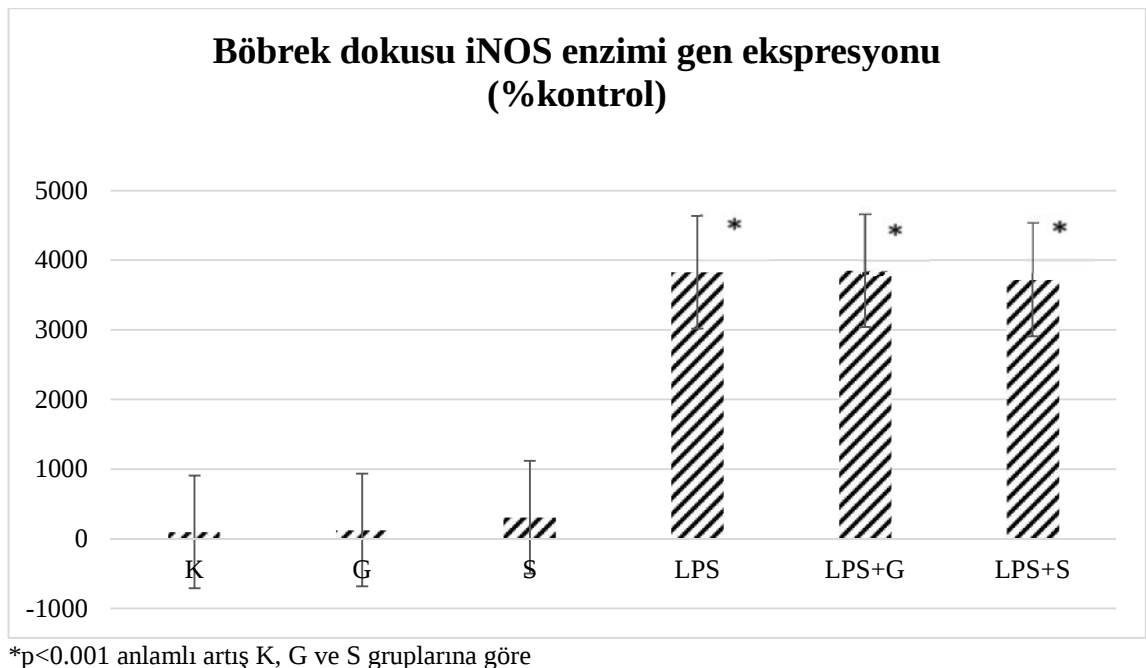
* $p < 0.001$ anlamlı artış K, G ve S gruplarına göre, ** $p < 0.05$ anlamlı azalma LPS grubuna göre

Şekil 4.20. COX-2 enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)



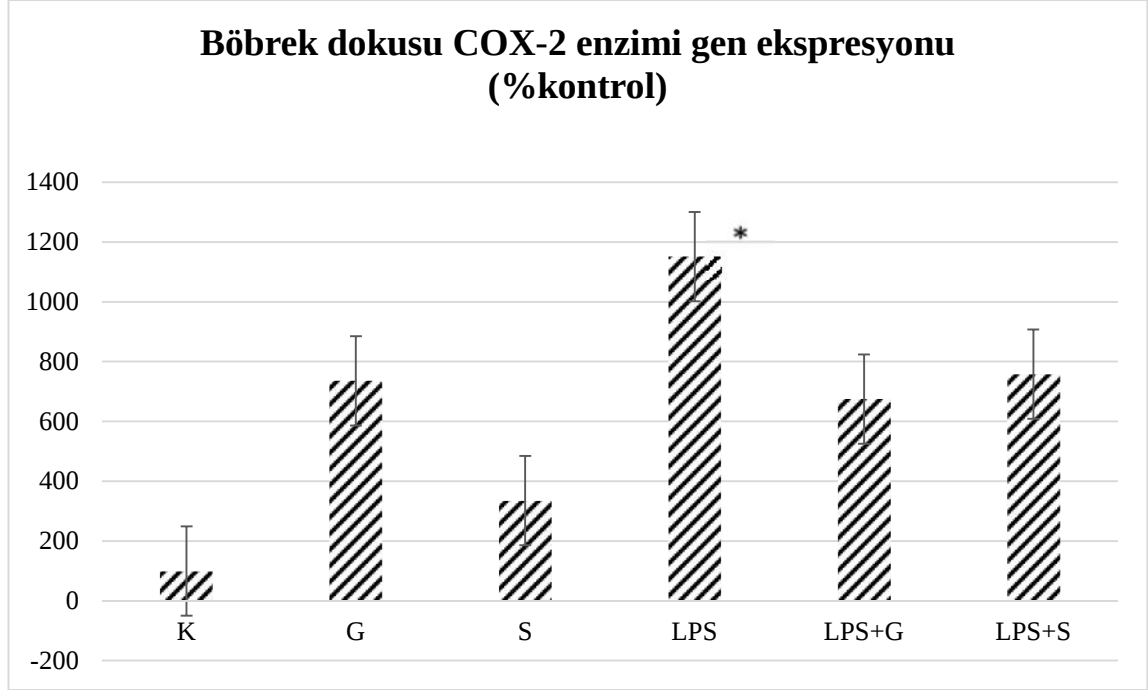
Şekil 4.21. mPGES-1 enzimi gen ekspresyonu(%LPS)

Karaciğer dokusunda, LPS uygulanan grupta K, G ve S gruplarına göre istatistiksel olarak ($p<0.001$) anlamlı iNOS, COX-2, mPGES-1 enzimleri gen ekspresyon profillerin de artış görülmüştür. LPS sonrası 6-shogaol ve 6-gingerol uygulaması da iNOS ($p<0.001$), mPGES-1 ($p<0.05$) ve COX-2 ($p<0.05$) enzimi mRNA düzeylerinde LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olmuştur.



Şekil 4.22. iNOS enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)

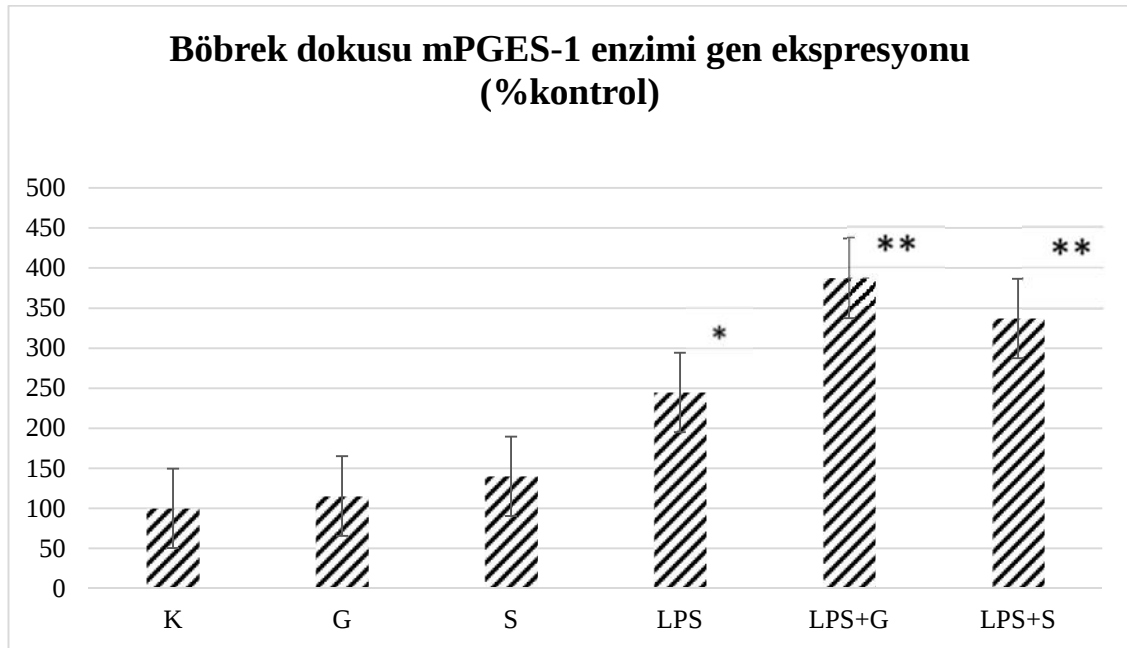
Böbrek dokusu iNOS enzimi gen ekspresyon profiline bakıldığında LPS uygulanan gruplarda (LPS, LPS+G, LPS+S) uygulanmayan gruplara (K, G, S) göre istatistiksel olarak ($p<0.001$) anlamlı artış gözlenmiştir. LPS sonrası 6-gingerol ve 6-shogaol uygulaması iNOS enzimi gen ekspresyonundaki artışı değiştirmemiştir.



* $p<0.001$ kontrol grubuna göre anlamlı artış, * $p<0.05$ (G, S, LPS+G, LPS+S gruplarından farklı)

Şekil 4.23. COX-2 enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)

Sistemik LPS uygulamasıyla böbrek dokusunda COX-2 enzimi gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p<0.001$) anlamlı bir şekilde artış görülmüştür. 6-gingerol ve 6-shogaol uygulaması, COX-2 enzimi gen ekspresyonunda istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı bir şekilde azalma sağlamıştır.



* $p < 0.05$ diğer gruplardan farklı, ** $p < 0.001$ (K, G, S gruplarından farklı)

Şekil 4.24. mPGES-1 enzimi gen ekspresyonu (%kontrol)

Böbrek dokusu mPGES-1 enzimi gen ekspresyon profiline bakıldığında, LPS uygulaması kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı bir şekilde artırmıştır. LPS sonrası 6-gingerol ve 6-shogaol uygulaması gen ekspresyonunda K, G ve S gruplarına göre istatistiksel olarak $p < 0.001$ anlamlılıkta, LPS grubuna göre de $p < 0.05$ anlamlılıkta artış gözlenmiştir.

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Sepsis, çoğunlukla enfeksiyon olmak üzere cerrahi, yanık, pankretit gibi diğer nedenlerle de ortaya çıkan sistemik enflamasyon yanıtı ile karakterize bir sendromdur. Ülkemizde sepsis bildirimi zorunlu bir hastalık olmadığı için sıklığı ve ölüm oranı hakkında oran vermek mümkün olmamakla birlikte özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda morbitide ve mortalite açısından büyük sorun oluşturmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri istatistiklerine göre her yıl 750.000 ağır sepsis vakası görülmekte ve bir ağır sepsis hastasının tedavi maliyeti ortalama olarak 50.000 ABD Doları tutmakta ve bir yılda bu hastalarının tedavisi için 17 milyar ABD Doları harcanmaktadır. Her yıl %1,5 oranında sepsis vakalarında artış gözlenmektedir. Bu artış yaşlı nüfusun artmasına bağlanmaktadır (83). Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç kazanması; travma, yanık ve cerrahi girişimlerin artması; bağışıklığı baskılanmış nüfusun artması sepsis olgularında artışa neden olan diğer risk faktörleridir.

Teorik olarak tüm mikroorganizmalar sepsisi oluşturan sistemik enflamasyon yanıtını başlatabilirler. Önceleri en sık görülen sepsis etkeni gram negatif bakterilerken günümüzde gram pozitif bakteriler ve mantar enfeksiyonlarının sıklığı artmaktadır. Bu tez çalışmasında deneysel sepsis modelinin oluşturulması için gram negatif bakterilerden elde edilen lipopolisakkaritin (LPS, E.coli, 0111; B4) intraperitoneal enjeksiyonu model olarak seçilmiştir. Literatür taramaları dikkate alınarak ratlarda *in vivo* sepsis oluşturmak için gerekli lipopolisakkarit miktarının 15 mg/kg olarak yeterli olacağı düşünülmüş ve bu miktar pilot çalışmamız ile desteklenmiştir.

Sepsiste kalıtsal bağışıklık sistemi uyarılır ve enflamatuvar bir yanıt oluşur. Bu enflamasyon yanıtı normal şartlarda organizmanın bütünlüğünü korumaya ve meydana gelen hasarları tamir etmeye yönelik son derece etkin bir mekanizmadır. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, interferon gama, prokalsitonin, C reaktif protein gibi proenflamatuvar

sitokinler ve PGE₂, LTB₄ gibi prostaglandinler ve lökotrienler ile başlayan enflamasyon yanıtı, eş zamanlı IL-10, çözünebilir TNF- α reseptörü, IL-1 reseptör antagonistleri gibi sitokinlerin varlığında enflamasyon karşıtı yanıt ile kontrol edilir. Bu iki yanıt mekanizması bir denge içinde bulunduğunda ortaya çok önemli bir sorun çıkmaz. Ancak denge bozulduğunda yaygın ve kontrolden çıkmış bir enflamasyon oluşur. Ağır sepsisi oluşturan mekanizma ise, normal enflamasyon yanıtının kontrolden çıkarak aşırı bir hal almasıdır (84).

Biz de çalışmamızda *in vivo* sepsis oluşturulan ratlarda serum TNF- α , IL-1 β gibi proenflamatuar sitokin düzeylerini, hem proenflamatuar hemde antienflamatuar sitokin olan IL-6 düzeylerini, antienflamatuar sitokin olan IL-10 düzeylerini, PGE₂ ve NO miktarındaki değişiklikleri ve sentezlerinden sorumlu COX-2, iNOS ve mPGES-1 enzim aktivitelerini değerlendirdik.

TNF- α , IL-1 β sepsiste meydana gelen erken enflamatuar yanıtın sorumlu majör mediyatörlerdir. TNF- α düzeylerinin 90 dakikada IL-1 β düzeylerinin ise 3. saatte pik seviyeye ulaştığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Enflamatuar yanıt 2-3 saat içerisinde IL-6 eşlik eder (85-86). Bizim çalışmamızda lipopolisakkarit uygulamasından 4 saat sonra alınan serum örneklerinde TNF- α , IL-1 β düzeyleri kontrol grubuna göre artmıştır (Şekil.4.3, Şekil.4.4). IL-6 seviyesinde de proenflamatuar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β 'dakilere benzer bulgular elde edilmiştir (Şekil.4.5).

Panacek et al. (87) 15 prospektif randomize çalışmadan elde ettikleri verilere dayalı çalışmalarında, hastalardaki yüksek IL-6 düzeylerinin mortalite ile ilişkisini değerlendirmiş ve hastalarda mortaliteyi %50-100 oranında artırdığını tespit etmişlerdir. Hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalarda IL-6'nın nötralizasyonu mortaliteyi bazen artırmış bazen de azaltmıştır. Hem antienflamatuar hem de proenflamatuar etkileri olduğundan IL-6 sepsiste bir alarm hormonudur. IL-6 daha çok akut faz yanıtını artırsa da aynı zamanda IL-1 reseptör antagonistinin salınımını artırarak çözücü TNF- α reseptörünün salınımını uyarır. Yapılan bir çok çalışmada ise yüksek IL-6 konsantrasyonu çoğunlukla hastalıkta kötü gidişle ilişkilendirilmiştir. IL-6 konsantrasyonun >1000 pg/mL'den yüksek olması mortaliteyi önemli ölçüde artırmıştır (87).

Yapılan bir tez çalışmasında LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinin saldığı proenflamatuar ve antienflamatuar sitokinler miktar tayini ile incelenmiştir. Enflamasyonla birlikte IL-10, PGE₂ ve TNF- α düzeyleri artmıştır (88).

Gingerol ve shogaol ile ilgili literatür bilgisi incelendiğinde, çalışmaların çoğu çeşitli hücre kültürü hatları üzerinde gerçekleştirilmiş olup, gingerol ve shogaol'ün sitokinler üzerinden antienflamatuar etki gösterdiği yönündedir. Shon et al. (89) 6-shogaol'ün *in vivo* ve *in vitro* mast hücresi kaynaklı alerjik reaksiyona karşı etkisini araştırmış ve bu hücrelerde histamin salınımını, TNF- α , IL-6 ve IL-8 üretimini, NF- κ B aktivasyonunu, JNK fosforilasyonunu inhibe ettiğini bulmuşlardır. Shim et al. (90) çalışmalarında LPS ile indüklenmiş rat astrositlerinde 6-shogaol uygulamasının IL-1 β ve IL-6 gibi proenflamatuar sitokinlerin üretimini, NF- κ B aktivasyonunu, iNOS ve COX-2 enzim ekspresyonlarını önemli derecede baskıladığını göstermiştir. Yine başka bir çalışmada Lawy et al. (91), LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde 6-shogaol'ün TNF- α , IL-1 β ve NO üretimini baskıladığını bulmuşlar ve 6-shogaol'ün antienflamatuar etkisinin bu sitokinleri baskılamasından kaynaklandığını savunmuşlardır. Podlogar et al. (12), 6-gingerol ve 6-shogaol'ün insan bronşial epitelyal hücrelerinde (BEAS-2B) LPS ile indüklenmiş proenflamatuar sitokinlerin sekresyonunu azalttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda tedavi gruplarındaki hayvanlara LPS verildikten 4 saat sonra uygulanan ve zencefilin aktif maddelerinden olan 6-gingerol ve 6-shogaol'ün; TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerini azalttığı gözlenmiştir. Çalışmamız literatürde yer alan bu çalışmaları desteklemektedir.

Antienflamatuar sitokin olan IL-10'un serum düzeylerini, 6-shogaol ortamda enflamasyon olmadan diğer gruplara göre istatistiksel olarak artırmıştır. Proenflamatuar sitokinlerin serum düzeylerini ise kontrol grubuna göre değiştirmemiştir. Bu sonuç 6-shogaol'ün enflamatuar hastalıklara karşı hem koruyucu hem de tedavi edici olarak kullanılabileceğini göstermektedir. LPS uygulanan grupta IL-10 serum düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır (Şekil.4.6). Sepsis varlığında hem pro hemde antienflamatuar sitokinlerin artması beklenen durumdur. Tedavi gruplarında proenflamatuar sitokinlerin azalmış olması nedeniyle karşıt yanıt olan IL-10 düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı azalığını düşünmekteyiz.

LPS ile indüklenen endotoksemilerde iNOS ve COX-2 enzimlerinin aktiviteleri ve NO, PGE₂ gibi bu enzim ürünleri artmaktadır. Ahmad et al. (92) , akut endotoksemi ile indüklenen karaciğer hasarında LPS verilmesinden kısa bir süre sonra karaciğer makrofajlarında belirgin bir şekilde PGE₂ ve nitrik oksit artışının olduğunu aynı zamanda COX-2 ve iNOS ekspresyonlarında artış meydana geldiğini saptamışlardır. Ayrıca iNOS aktivitesindeki artışın prostaglandin üretiminden bağımsız meydana geldiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da LPS ile birlikte serum nitrik oksit ve prostaglandin E₂ konsantrasyonları artmıştır. LPS verilmesinden sonra 6-gingerol ve 6-shogaol uygulaması ile 4 saat sonra NO ve PGE₂'nin serum konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüştür. Bu etki açısından 6-shogaol, 6-gingerol'e göre daha etkindir (Şekil.4.7, Şekil.4.8). Yapılan başka bir tez çalışmasında A549 hücrelerinde 6-gingerol ve 6-shogaol uygulaması PGE₂ düzeylerini azaltmıştır (93).

Dugasania et al. (11), lipopolisakkarit ile inflamasyonun indüklendiği mürin makrofajlarında 6-gingerol ve 6-shogaol'ün iNOS ve COX-2 gen ekspresyonunu önemli derecede baskıladığını bulmuşlardır. Yine Pan et al. (94) çalışmalarında LPS ile indüklenmiş mürin makrofajlarında artmış iNOS ve COX-2 gen ekspresyonunu 6-shogaol'ün baskıladığını göstermişlerdir. Çalışmamızda hayvanların karaciğer dokularında iNOS, COX-2 enzim aktivitelerine, western blot analizi ile protein yoğunluklarına ve gen ekspresyon profillerine bakıldığında; LPS uygulanan hayvanlarda bu enzim ekspresyonları (Şekil.4.19, Şekil.4.20) ve protein yoğunluklarında (Şekil.4.16, Şekil.4.18) artış gözlenirken enzim aktivitelerinde (Şekil.4.11, Şekil.4.13) istatistiki olarak fark gözlenmemiştir. *In vitro* çalışmalarla bu enzimlerin gen ekspresyonlarını azalttıkları kanıtlanan 6-gingerol ve 6-shogaol'ün bu etkileri *in vivo* ilk defa bizim çalışmamız ile desteklenmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda karaciğer dokusunda mPGES-1 enzimi gen ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlenirken, 6-gingerol ve 6-shogaol LPS uygulanan gruba göre anlamlı azalma sağlamışlardır (Şekil.4.21). Karaciğer dokusunda bu enzimin gen ekspresyonu LPS, LPS sonrası 6-gingerol ve 6-shogaol uygulamasından etkilenmiş olmasına rağmen bu enzim ürünü olan PGE₂ düzeylerine (Şekil.4.9) bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark

gözlenmemiştir. 6-gingerol ve 6-shogaol'ün 4 mg/kg tedavi dozlarının tekrarlı uygulanmasıyla gruplar arasında fark görülmesi olasıdır.

Çalışmamızda böbrek dokusu iNOS, COX-2 enzim aktivitelerine ve iNOS, COX-2, mPGES-1 enzimi gen ekspresyon profillerine bakıldığında ise karaciğer dokusunda görülen değişimlerle karşılaşılmanmıştır. Böbrek dokusunda iNOS enzim aktivitesinde LPS sonrası 6-gingerol verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlenirken bu enzim aktivitesi açısından diğer gruplar arasında anlamlı fark yoktur (Şekil.4.12). iNOS enzimi gen ekspresyonunda ise LPS uygulanan grupta anlamlı artış gözlenirken, tedavi gruplarında LPS grubuna göre anlamlı değişim gözlenmemiştir (Şekil.4.22). COX-2 enzim aktivitesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (Şekil.4.14). COX-2 enzimi gen ekspresyon profiline bakıldığında LPS uygulanan grupta anlamlı artış gözlenirken, LPS sonrası 6-gingerol ve 6-shogaol ile tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür (Şekil.4.23). mPGES-1 enzimi gen ekspresyon profilinde ise LPS uygulanmasıyla kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmış ve tedavi gruplarında da bu artış devam etmiştir (Şekil.4.24). Böbrek dokusu PGE₂ düzeylerinde de benzer şekilde değişim gözlenmiştir (Şekil.4.10). Sepsiste en fazla etkilenen organlar kanlanmanın fazla olduğu kalp, akciğerler ve böbreklerdir (95). Oluşturduğumuz endotoksemiye böbrek dokusu karaciğer dokusuna göre daha fazla etkilenmiştir. Küper et al. (96), renal medullar epitelyal hücrelerde, PGE₂'nin pro-apoptotik protein Bad'ı inaktive ederek hücre canlılığını koruduğunu göstermişlerdir. PGE₂ düzeylerinin ve sentezinden sorumlu enzim ekspresyonunun tedavi gruplarında artmış olması böbrek hücrelerini korumaya yönelik savunma mekanizmasıdır. Yine başka bir çalışmada Aoudjit et al. (97) , glomerüler epitel hücrelerinde artmış COX-2 ekspresyonu ve aktivitesiyle birlikte PGE₂'nin artmış olduğunu ve PGE₂'nin, EP₄ reseptörleri tarafından yürütülen anti-apoptotik ve koruyucu etkisini bulmuşlardır.

Sonuç olarak 6-gingerol ve 6-shogaol'ün, ratlarda LPS ile indüklenmiş endotoksemiye karşı etkilerinin ilk defa araştırıldığı bu çalışma ile zencefilin antienflamatuar etkilerinin bu bileşenlerinden kaynaklanabileceği gösterilmiştir. Bu antienflamatuar etkininde, proenflamatuar sitokinleri, iNOS ve COX-2 enzim aktivitelerini ve bunların NO, PGE₂ gibi ürünlerini sistemik olarak azaltmasından kaynaklandığı bu çalışma ile gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Wenzel RP. The mortality of hospital acquired infections: need for a new vital statistics; Int J Epidemiol 1998; 17: pp 225-231
2. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in european intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med (in press).
3. Türker R. K, Kayaalp S O, Eikozonoidler ve diğer otokaidler, ss 1-10
4. Marletta MA. Nitric oxide syntase structure and mecanism. The J Biol Chem 1993; 268: pp 12231-12234.
5. Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD, Zingiberis Rhizoma: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. Phytomedicine 2005; 12: pp 684-701
6. Kubra IR, Rao LJ. An impression on current developments in the tecnology, chemistry, and biological activities of ginger (*Zingiber Officinale Roscae*). Crit Rev Food Sci Nutr 2012; 52: pp 651-688
7. Mascolo N, Jain R, Jain SC, Capasso F, Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*), J Ethnopharmacol 1989; 27: pp 129-140
8. Jolada SH, Lantza RC, Solyom AM et al. Fresh organically grown ginger (*zingiber officinale*): Composition and effects on LPS-induced PGE2 production. Phytochemistry 2004; 13: pp 65-70
9. Srivastava KC, Effects of aqueous extracts of onion, garlic and ginger on platelet aggregation and metabolism of araşidonic acid in the blood vascular system: in vitro study. Prostaglandins Leukot. Med 1984; 13: pp 227-235
10. Ha SK, Moona E, Ju MS et al. 6-shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation. Neuropharmacology 2012; 30: pp 1-13
11. Dugasania S, Pichikac MR, Nadarajahc VD et al. Comparative antioxidant and antienflamatory effects of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol and 6-shogaol. Journal of Ethnopharmacology 2010; 127: pp 515-520

12. Podlogar JA, Verspohl EJ. Antiinflammatory effects of ginger and some of its components in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. 2012; 26: pp 333-336.
13. Badley AD, Steckelberg JM. Sepsis Syndrome. In: Wilson WR, Sande MA (eds): Current Diagnosis and Treatment In Infectious Diseases. McGraw-Hill, New York 2001; pp 231-239.
14. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome. HSR Proceedings in Int Care and Cardiovasc Anest 2010; 2: pp 161-175.
15. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Chest 1992; 101: pp 1644-1655.
16. Badley AD, Steckelberg JM. Sepsis Syndrome. In: Wilson WR, Sande MA (eds): Current Diagnosis and Treatment In Infectious Diseases. McGraw-Hill, New York 2001; pp 231-239.
17. Angus D, Burgner D, Wunderink R, Mira J, Gerlach H, Wiedermann J. The PIRO concept: P is for predisposition. Critical Care 2003; 7: pp 248-251.
18. Aygün G. Sepsis ve Septik Şok, Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No: 31 Kasım 2002; ss 131-140
19. Öncü S. Sepsisi tanıyor muyuz ? ANKEM Derg 2006; ss 20: 40.
20. Doğanay M. Sepsis.. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 1. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (editörler). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2002; ss 621-636.
21. Doğanay M. Sepsis. Willke A, Doğanay M. (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları, 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 2008; ss 877-897
22. Mizuta M, Linkin D, Nachamkin I, Fishman N, Mark G. Identification of optimal combinations for empirical dual antimicrobial therapy of

- Pseudomonas aeruginosa* infection: Potential role of a combination antibiogram. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27: pp 413-415.
23. Ortatlı M, Özgüven V, Şengül A. Sepsis ve ağır infeksiyonların tanı ve takibinde yeni bir marker: Prokalsitonin. Flora 1999; 4: ss 151-155.
 24. Özkanlar S. Deneysel Sepsis Oluşturulan Sıçanlarda Antibiyotik, Kortikosteroid ve Vitamin K Kullanımlarının İnflamatuvar Belirteçler, Hematolojik Parametreler ve Yaşam Süreleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011.
 25. Zanetti G, Baumgartner JD, Glauser MP. Bacteremia, sepsis and septic shock. In: Root RK (ed): Clinical Infectious Diseases-A Practical Approach. Oxford University Press 1999; pp 471-482.
 26. Nakanishi M., Rosenberg DW., Multifaceted roles of PGE₂ in inflammation and cancer. Semin Immunopathol 2013; 35: pp 123–137.
 27. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. : Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases) -1 and -2, Journal of Biological Chemistry 1996; 271: pp 33156-33157.
 28. Jakobsson PJ, Thorén S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96: pp 7220–7225.
 29. Knab ML, Grippo PJ, Bentrem DJ, Involvement of eicosanoids in the pathogenesis of pancreatic cancer: the roles of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. World J Gastroenterol 2014; 20: pp 10729-10739
 30. Kudo I, Murakami M. Prostaglandin e synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E₂ biosynthesis. J Biochem Mol Biol 2005; 38: pp 633-638.
 31. Xu D, Rowland SE, Clark P, Giroux A, Côté B, Guiral S, Salem M, Ducharme Y, Friesen RW, Méthot N, Mancini J, Audoly L, Riendeau D. MF63 [2-(6-chloro-1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-2-yl)-isophthalonitrile], a selective microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitor, relieves pyresis and pain in

- preclinical models of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326: pp 754-763.
32. Nasrallah R, Clark J, Hebert RL. Prostaglandins in the kidney: developments since Y2K. *Clinical Science* 2007; 113: pp 297-311.
 33. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin e2. *J Immunol.* 2012; 188: pp 21–28.
 34. Linnemeyer PA, Pollack SB. Prostaglandin E2-induced changes in the phenotype, morphology, and lytic activity of IL-2-activated natural killer cells. *Journal of immunology* 1993; 150: pp 3747–3754
 35. Schlag G, Redc H. Mediators of injury and inflammation. *World J Surg* 1996; 20: pp 406-410.
 36. Paterson RL, Webster NR. Sepsis and the SIRS. *JR Coll Surg Edin* 2000; 45: pp 178-182.
 37. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J; Geneva Sepsis Network. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: pp 396-402.
 38. Vander Poll T, Van Deventer SJH. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Inf Dis Clin North Am* 1999; 13: pp 413-426.
 39. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; 214: pp 149-160.
 40. Cauwels A, Brouckaert P. Survival of TNF toxicity: dependence on caspases and NO. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462: pp 132-139.
 41. Erikçi S, Mas R, Cömert B, Yamanel L. Sepsis'te Yeni Ufuklar. *Çetin Ofset AS.* 2007; ss 10-13
 42. Borden EC, Chin P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and threrapeutic roles. *J Lab Clin Med* 1994; 123: pp 824-829.

43. Aderka D, Le J, Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide induced tumour necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells and mice. *J Immun* 1989; 143: pp 3517-3523.
44. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghoorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF). *Blood* 1990; 75: pp 40-47.
45. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med* 2002; 30: pp 58-63.
46. Dikmen N, Özgünen T. Harper Biyokimya. 25. Baskı. Ankara: Nobel Kitabevi. 2004; ss 740.
47. Kolb-Bachofen V. A review on the biological properties of C-reactive protein. *Immunobiology* 1991; 183: pp 133–145.
48. Dahaba AA, Metzler H. Procalcitonin's role in the sepsis cascade. Is procalcitonin a sepsis marker or mediator? *Minerva Anestesiologica* 2009; 75: pp 447–452.
49. Shehabi Y, Seppelt I. Pro/con debate: is procalcitonin useful for guiding antibiotic decision making in critically ill patients? *Crit Care* 2008; 12: pp 211-216.
50. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The J. Biol. Chem* 1993; 268: pp 12231-12234.
51. Richard K. Nitric oxide synthases. *The Biochemist* Nov 1994; 16: pp 3-6
52. Yoshifumi I, Bode BP, Beck DJ. et al. Arginine transport and effects of NOS inhibitors. *Ann Surgery* 1993; 218: pp 350-363
53. Hua Wan, Yu Amy. Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. *The J Histochem and cytochem* 1994; 42: pp 451-457.
54. Katayama Y. Nitric oxide: Mysterious messenger. *Dojindo News Letter* 1995; 1: pp 1-20.

55. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of NO-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1991; 206: pp 163-164.
56. Haeflinger IO, Flammer J, Luscher TF. Nitric oxide and endothelium are important regulators of human ophtalmic artery. *Invest Ophtalmol Vis Sci* 1992; 33: pp 2340-2348.
57. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: pp 399-402.
58. Burnett Al, Lowenstien CJ, Bredt DS. Nitric oxide a physiologic mediator of penil erection. *Science* 1992; 257: pp 401- 403.
59. Stark ME, Szurszevski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic fuction disease. *Gastroenterology* 1992; 103: pp 1928-1949.
60. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localisation and function. *Am. J Kidn Dis* 1994; 24: pp 112-129.
61. Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther (USA)* 1994; 8: pp 601-610.
62. <http://anesteziseminerleri.com/sepsis.html>
63. Furchgott RF, Zawadski JV. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 1980; 288: pp 373-376.
64. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* 1987; 327: pp 524-526.
65. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin: A pathway for the regülation of cell functýon and communication. *Biochem pharmacol* 1989; 38: pp 1709-1715.
66. Moncada S. The L -Arginine nitric oxide pathway. *NEJ Medicine* 1993; 329: pp 2002-2012
67. Billiar T. Nitric Oxide , Novel biolgy with Clinical Relevance. *Ann Surgery* 1995; 221: pp 339-349

68. Keaney JF, Simon DI, Stamler SS. et al. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor like properties. *J Clin Invest* 1993; 91: pp 1582-1589
69. Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. *Toraks Dergisi* 2003; 4: ss 88-94
70. Arbaş D. Nitrik oksit: Fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki Rolü. *Klinik Gelişim* 1998; 11: ss 376-380
71. Foster S. Ginger Your Food is Your Medicine. www.herphoto.com/education/monograph/ginger.htm. 2000.
72. WHO Monographs on Selected Medicinal Plant, Vol. 1, Geneva. 1999.
73. Baytop, T. , Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi(Geçmişte ve Bugün), ilaveli 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1999.
74. Sang S, Hong J, Wu H, Liu J, Yang CS, et al. Increased growth inhibitory effects on human cancer cells and antiinflammatory potency of shogaols from *Zingiber officinale* relative to gingerols. *J Agric Food Chem* 2009; 57: pp 10645-10650.
75. Jolad SD, Lantz RC, Solyom AM, Chen GC, Bates RB, Timmermann BN, Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*):composition and effects on LPS-induced PGE₂ production. *Phytochemistry* 2004; 65: pp 1937-1954
76. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g1046?lang=en®ion=TR>
77. Ding GH, Naora K, Hayashibara M, Katagiri Y, Kano Y, Iwamoto K. Pharmacokinetics of 6-gingerol after intravenous administration in rats. *Chem. Pharm. Bull* 1991; 39: pp 1612-1614
78. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/39303?lang=en®ion=TR>
79. Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo K, Aburada M, Hosoya E. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J Pharmacobiodyn* 1984; 7: pp 836-48.

80. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin's phenol reagent. J. Biol. Chem 1951; 193: pp 265-275.
81. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1979; 76: pp 4350-4354.
82. Mullis KB, Falloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction. Methods Enzymol 1987; 155: pp 335-350
83. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001; 29: pp 1303-1310.
84. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. Lancet 2005; 17: pp 63-78.
85. Van der Poll T, Levi M, Van Deventer S, et al. Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. Blood 1994; 83: pp 446-451.
86. Van der Poll T, Levi M, ten Cate H, et al. Effect of postponed treatment with an anti-tumour necrosis factor (TNF) F(ab')₂ fragment on endotoxin-induced cytokine and neutrophil responses in chimpanzees. Clin Exp Immunol 1995; 100: pp 21-25.
87. Panacek E, Kaul M. IL6 as a marker of excessive TNF- α activity in sepsis. Sepsis 1999; 3: pp 65-73.
88. Şeker Karatoprak G. Tedavide Kullanılan Güney Afrika Kaynaklı *Pelargonium Sidoides* Dc. Yerine Kullanılabilecek Bir Bitki: *Pelargonium Endlicherianum* Fenzl., Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015
89. Sohn Y, Han NY, Lee MJ, Cho HJ, Jung HS. [6]-Shogaol inhibits the production of proinflammatory cytokines via regulation of NF- κ B and phosphorylation of JNK in HMC-1 cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 2013; 35: pp 462-470.

90. Shim S, Kim S, Choi DS, Kwon YB, Kwon J, Anti-inflammatory effects of [6]-shogaol: Potential roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49: pp 2734–2740
91. Levy AS, Simon OR. Six-shogaol inhibits production of tumour necrosis factor alpha, interleukin-1 beta and nitric oxide from lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *West Indian Med J* 2009; 58: pp 295-300.
92. Ahmad N, Chen LC, Gordon MA, Laskin JD, Laskin DL. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 2002; 71: pp 1005-1011.
93. Demirpolat E. Potansiyel mPGES-1 İnhibitörlerinin Antikanserojen Etkilerinin A549 Hücrelerinde Araştırılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014
94. Pan MH, Hsieh MC, Hsu PC, Ho SY, Lai CS, Wu H, Sang S, Ho CT. 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages. *Mol. Nutr. Food Res* 2008; 52: pp 1467-1477.
95. Arslantaş M.K, Cinel İ, Günerli A. Sepsis ve Ekstrakorporeal Membran Oksijenizasyonu. *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi* 2013; 11: ss 86-92
96. Küper C, Bartels H, Beck F, Neuhofer W. Cyclooxygenase-2-dependent phosphorylation of the pro-apoptotic protein Bad inhibits tonicity-induced apoptosis in renal medullary cells. *Kidney Int* 2011; 80: pp 938-945.
97. Aoudjit L, Potapov A, Takano T. Prostaglandin E2 promotes cell survival of glomerular epithelial cells via the EP4 receptor. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 2006; 290: pp 1534–1542.

EKLER



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



10.01.2013

Sayı : 01
Konu : Etik Kurul Başvurusu Hakkında

Doç. Dr. M. Betül AYCAN

Erc. Üniv. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, " 6-SHOGAOL VE 6-GINGEROL'UN LPS İLE İNDÜKLENMİŞ ENDOTOKSEMİDE COX-2 ÜZERİNDEN ETKİLERİ " konulu projenizi 09.01.2013 tarihinde görüşülmüş ve aşağıda belirtilen öneri ya da öneriler doğrultusunda projenizi düzelterek kurul sekreterliğine teslim etmeniz hususuna oybirliği ile karar vermiştir. Gereğini bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. Abdullah İNCİ
HADYEK Başkan Vekili

Öneriler:

- 1) İstatistik uzmanının önerileri doğrultusunda grupların 14'lü olması yararlı olacaktır.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 09.01.2013

Toplantı Sayısı: 01

Karar No: 13/07

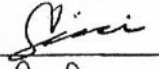
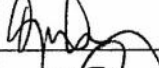
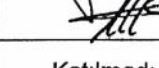
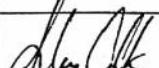
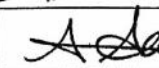
Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

09.01.2013

tarihinde

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	Katılmadı
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Coşkun Tez	Prof. Dr	Fen Fakültesi	
Fusun F. Erdoğan	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet Öztürk	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül Aycan.	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	Katılmadı
Gökçen Y. Çelik	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Aydın ALAN	Yrd. Doç. Dr.	DEKAM	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesinden **Doç. Dr. M. Betül AYCAN** tarafından sunulan "**6-SHOGAOL VE 6-GINGEROL'UN LPS İLE İNDÜKLENMİŞ ENDOTOKSEMİDE COX-2 ÜZERİNDEN ETKİLERİ**" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi.

Tarih : 09.01.2013

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Abdullah İNCİ

İmzası




Prof. Dr. Harun ÜLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Bilge Cumaoğlu

Uyruğu: Türkiye(TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 10/10/1987- Sarıoğlu

Medeni Durumu: Evli

Telefon Numarası: 0545 687 45 06

e-Mail Adresi : ecz.bilgeodabasi@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD 38039

Talas/KAYSERİ

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2010
Lise	Kocasinan Fevzi Çakmak Lisesi, Kayseri	2004

MESLEKİ DENEYİM

Yıl	Kurum	Görev
2014-Halen	Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Eczacı
2013-2014	Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Başeczacı
2012-2013	Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Eczacı
2010-2012	Gemerek İlçe Devlet Hastanesi	Eczacı

YABANCI DİLLER

İngilizce