

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK İÇ HASTALIKLARI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**DENEYSEL ENDOTOKSEMİLİ NEONATAL BUZAĞILARDA NİTRİK
OKSİT METABOLİZMASINDAKİ BAZI PARAMETRELERİN
ARAŞTIRILMASI**

ECE EYLÜL SÖNMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet GÜLTEKİN

Bu tez, TÜBİTAK tarafından 1200638 proje numarası ile desteklenen araştırmanın bir kısmından gerçekleştirilmiştir.

AYDIN-2025

KABUL VE ONAY

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ve Yüksek Lisans eğitim-öğrenim hayatımda yardım, ilgi ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, her konu ve durumda yanımda olan ve yoluma ışık tutan, tüm meslek ve hayat tecrübelerini benimle paylaşan, çok değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet GÜLTEKİN'e

Tez çalışmamın çıktısı olduğu “Neonatal Buzağılarda Sitrülin Uygulamalarının Farmakokinetiği ve Deneysel Endotoksemide Etkinliği” başlıklı proje ekibinde araştırmacı olarak bulunan çok kıymetli hocalarım Prof. Dr. Kerem URAL, Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA, Prof. Dr. Hasan ERDOĞAN ve Prof. Dr. Murat BOYACIOĞLU'na

Yüksek Lisans Eğitimim süresince mesleki ve hayat tecrübeleriyle bana destek olan Prof. Dr. Serdar PAŞA ve Doç. Dr. Songül ERDOĞAN'a

Laboratuvar analizlerinin gerçekleştirilmesinde katkılarını sunan Dr. Gamze GÜLTEKİN ve Sıla DEMİR'e

Proje süresince ve yüksek lisans eğitimim süresince bana eşlik eden ve her zorlukta yanımda olan çok değer verdiğim ekip arkadaşlarımdan Dr. Gizem GÖNÜLVEREN ve Uzm. Vet. Hek. Onur YILMAZER'e

Yüksek lisans eğitim-öğrenim hayatım süresince beraber çalışma fırsatı bulduğum akademik ve mesleki gelişim sürecinde birbirimize destek ve arkadaş olduğumuz kıymetli meslektaşlarımdan Uzm. Vet. Hek. Tahir ÖZALP, Dr. Cansu BALIKÇI, Vet. Hek. İlayda TENDAR, Vet. Hek. Sevgi Aksoy, Vet. Hek. Gizem AKBULUT, Vet. Hek. Doğa ALTUNSOY ve tüm Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi meslektaşlarıma

Ve son olarak hayatım boyunca her daim yanımda olan, kararlarımı hoşgörü ve sabırla destekleyen, beni tek başına hayatla mücadele ederek büyüten, bana baba yokluğu aratmayan canım annem Yonca ÖZBİLEN'e, sevgili anneannem Fatma Sevil ÖZBİLEN'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sepsis	3
2.2. Sepsis ve Endotoksemi	7
2.3. Sepsis ve Endotoksemi Patogenezi	9
2.3.1. Nötrofiller ve Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları	10
2.3.2. Kompleman Sistemi	11
2.3.3. Pıhtılaşma ve Endotel Hücre Aktivasyonu	11
2.3.4. Sepsiste İmmüsupresyon	12
2.3.5. Sepsis ve Nitrik Oksit Metabolizması	14
2.3.5.1. Nitrik Oksit	14
2.3.5.2. Nitrik Oksit Sentaz Enzimi (NOS)	16
2.3.5.3. L-arjinin	17
2.3.5.3.1. Arjinin de novo Sentezi	17
2.3.5.3.2. Arjinin Taşıma Sistemi	18

2.3.5.3.3. Arjinin Katabolizması.....	19
2.3.5.3.3.1. Arjinaz Yolu (Arjinaz-I ve Arjinaz-II)	19
2.3.5.4. Sepsis ve İnflamasyonda Arjinin-NO Metabolizmasındaki Değişimler.....	20
2.3.5.4.1. Sepsis ve İnflamatuvar Durumlarda NO Etkileri	22
2.3.5.4.2. Arjinin ve Sitrülin Taşıma Sistemlerindeki Değişiklikler.....	23
2.3.5.4.3. Arjinin de novo Sentezinin Azalması	24
2.3.5.4.4. Arjinaz Aktivitesinin Artışı	24
2.3.5.4.5. iNOS İndüksiyonu	25
2.3.5.4.6. Arjinosüksinat Sentaz (ASS)	26
2.3.5.4.7. Asimetrik dimetilarjinin (ADMA).....	27
2.3.5.5. Amonyak.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Hayvan Materyali	30
3.2. Klinik Muayene	32
3.3. Endotoksemi Oluşturulması	33
3.4. Örnek Alımı ve Saklama	34
3.5. Analizlerin Gerçekleştirilmesi	35
3.5.1. İstatiksel Analizler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Nitrik Oksit (NO)	38
4.2. Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA).....	39
4.3. Amonyak.....	40
4.4. Arjinaz-I.....	41
4.5. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)	42
4.6. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS).....	43
5. TARTIŞMA	46

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR	54
EKLER	66
BİLİMSEL ETİK BEYANI	67
ÖZ GEÇMİŞ.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

ADC: Arjinin Dekarboksilaz

ADMA: Asimetrik Dimetilarjinin

ANP: Atrial Natriüretik faktör

APACHE II: Akut Fizyoloji ve Kronik Sağlık Değerlendirmesi

APC: Antijen Sunan Hücre

AS: Arjinosüksinat

ASL: Arjinosüksinat Liyaz

ASS: Arjinosüksinat Sentaz

BH4: Tetrahidrobiobterin

C°: Santigrat Derece

C5a, C4a, C3a: Anafilotoksin

C5aR: Anafilotoksin Reseptörü

Ca⁺²: Kalsiyum İyonu

CAT: Arjinin Taşıma Sistemi

cGMP: Siklik Guanizin Monofosfat

DAMP: Hasarla İlişkili Moleküler Patern

DDAH II: Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz

DIC: Dissemine İntravasküler Koagülasyon

dk: Dakika

dL: Desilitre

DNA: Deoksiribonükleik Asit

E.coli: *Escherichia coli*

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit

ELISA: Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi

eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz

ESICM: Avrupa Yoğun Bakım Derneği

FIO₂: İnspire Edilen Fraksiyonel Oksijen Miktarı

FVIIa, FXa: Pıhtılaşma Faktörü

GFR: Glomerüler Filtrasyon Hızı

HLA: Hücre Yüzeyindeki İnsan Lökosit Antijeni

IBM: Uluslararası İş Makineleri

ICAM: Hücre İçi Adhezyon Molekülü

IFN: İnterferon

IgM: İmmünglobulin M

IL: İnterlöykin

IV: İntravenöz

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

Kg: Kilogram

LPS: Lipopolisakkarit

MAP: Ortalama Arter Basıncı

MDSC: Miyeloid Baskılayıcı Hücreler

Mg: Miligram

mL: Mililitre

Mm³: Milimetre Küp

MmHg: Milimetre Cıva

mmoL: Milimol Litre

mRNA: Measajcı Ribonükleik Asit

NaCl: Sodyum Klorür

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NET's: Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları

NF-kB: Nükleer Faktör Kappa B

nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

OTC: Ornitin Transkarbamilaz

PaCO₂: Parsiyel Arteriyel Karbondioksit Basıncı

PAF: Trombosit Aktive Edici Faktör

PAMP: Patojenle İlişkili Moleküler Patern

PaO₂: Parsiyel Arteriyel Oksijen Basıncı

PAR: Proteazla Aktive Olan Reseptör

PD-1: Programlanmış Ölüm Proteini

PD1-R: Programlanmış Ölüm Proteini Reseptörü

PRR: Patojen Tanıma Reseptörü

qSOFA: Hızlı Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi

RNA: Ribonükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türeleri

rpm: Dakikadaki Devir Sayısı

SCCM: Kritik Bakım Derneği

SIRS: Sistemik Yangısal Yanıt Sendromu

SOFA: Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi

SPSS: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi

TFPI: Doku Faktörü Yolu İnhibitörü

TGF: Dönüştürücü Büyüme Faktörü

Th: T Hücre

TLR: Toll Benzeri Reseptör

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

T reg: Düzenleyici T Hücreleri

VCAM: Vasküler Hücre Yapışma Proteini

VEGF: Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü

μL: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sepsis patogenezinde inflamatuvar ve antiinflamatuvar süreçle ilişkili bazı yollar ...	10
Şekil 2. Fizyolojik koşullarda arjinin-sitrülin-NO metabolizması	18
Şekil 3. Sepsis ve inflamatuvar durumlarda arjinin-NO metabolizmasındaki patofizyoloji.....	21
Şekil 4. Sepsis/endotoksemi sırasında iNOS'un indüksiyonu	26
Şekil 5. iNOS ve ADMA tarafından NO üretiminin ve sepsis patofizyolojisinin potansiyel ilişkisi	27
Şekil 6. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama NO değerinin zamana göre değişimi	39
Şekil 7. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama ADMA değerinin zamana göre değişimi	40
Şekil 8. LPS infüzyonu sonrasındaki ortalama amonyak düzeyinin zamana göre değişimi	41
Şekil 9. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama arjinaz-I değerinin zamana göre değişimi	42
Şekil 10. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama eNOS değerinin zamana göre değişimi	43
Şekil 11. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama iNOS değerinin zamana göre değişimi	44

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Buzağuların klinik muayenesi	31
Resim 2. Çalışmada kullanılan sağlıklı buzağular	31
Resim 3. Mindray uMEC12 Vet hasta başı monitörizasyonu	32
Resim 4. Klinik muayene formu	33
Resim 5. Ticari saflaştırılmış toz formda standart referans LPS (<i>E.coli</i> O11:B4; sigma)	34
Resim 6. ELISA analizlerinin gerçekleştirilmesi	35
Resim 7. İnkübasyon aşamasında kullanılan inkübatör	36
Resim 8. ELISA plakalarının okuma aşamasında kullanılan okuyucu	36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Sepsis 1 (1991) tanımları	4
Tablo 2. Sepsis 2 (2001) tanımları	5
Tablo 3. Sepsis 3 (2016) tanımları	6
Tablo 4. Buzağılarda deneysel endotoksemiye indüklemek adına verilen <i>E. coli</i> serotipi, uygulama dozu, buzağı yaşı ve sayısı.....	8
Tablo 5. NO'nun fizyolojik Etkileri	15
Tablo 6. cNOS ve iNOS enzimlerinin özellikleri.	17
Tablo 7. Endotoksemi oluşturulan buzağılarda nitrik oksit metabolizmasında zamana göre meydana gelen değişimler	45

ÖZET

DENEYSEL ENDOTOKSEMİLİ NEONATAL BUZAĞILARDA NİTRİK OKSİT METABOLİZMASINDAKİ BAZI PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI

Sönmez, E. E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik İç Hastalıkları Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2025.

Amaç: Bu çalışmada, deneysel endotoksemili neonatal buzağılarda nitrik oksit metabolizmasına ilişkin plazma nitrik oksit (NO), asimetrik dimetilarjinin (ADMA), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), arjinaz-I ve kan amonyak düzeylerinin zamana bağlı değişimlerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada, 1–4 haftalık yaşta altı sağlıklı erkek Holstein buzağı kullanılmıştır. Buzağılara O111:B4 serotipli *Escherichia coli* kökenli lipopolisakkarit (LPS) 1 µg/kg dozunda intravenöz olarak uygulanarak endotoksemi modeli oluşturulmuştur. Kan örneklemeleri, LPS uygulaması öncesinde (0. saat) ve uygulama sonrasındaki 0,5., 1., 2., 4., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde, toplam dokuz farklı zamanda yapıldı. Nitrik oksit metabolizmasına ilişkin parametreler uygun biyokimyasal yöntemler kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: LPS uygulamasını takiben ortalama NO ve amonyak düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p < 0,05$). NO düzeyindeki artışlar özellikle 12. ve 24. saatlerde belirginleşirken, amonyak düzeylerinde 2., 4. ve 8. saatlerde anlamlı yükselmeler saptandı. ADMA ve iNOS düzeylerinde başlangıça göre artış izlenmiş; ancak bu artışlar zamana bağlı dalgalanma göstererek istatistiksel anlam taşımamıştır. Arjinaz-I ve eNOS düzeylerinde ise erken dönemde azalma, ilerleyen saatlerde toparlanma eğilimi saptanmış, ancak bu değişiklikler de anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç: Elde edilen bulgular, özellikle NO ve amonyak düzeylerindeki değişimlerin endotoksemi ve sepsis sürecinde önemli biyokimyasal yanıtları yansıttığını göstermektedir. Bu parametrelerin biyobelirteç potansiyelinin daha net şekilde ortaya konulabilmesi için, daha geniş örneklem grupları, farklı deneysel protokoller ve doku düzeyinde gerçekleştirilecek ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, Deneysel endotoksemi, Sepsis, Nitrik oksit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME PARAMETERS OF NITRIC OXIDE METABOLISM IN NEONATAL CALVES WITH EXPERIMENTAL ENDOTOXEMIA

Sönmez, E. E. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Veterinary Internal Medicine Program, Master's Thesis, Aydın, 2025.

Purpose: This study aimed to investigate the time-dependent changes in plasma nitric oxide (NO), asymmetric dimethylarginine (ADMA), inducible nitric oxide synthase (iNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), arginase-I, and blood ammonia levels related to nitric oxide metabolism in neonatal calves with experimental endotoxemia.

Materials and Methods: Six healthy male Holstein calves, aged 1–4 weeks, were used in the study. An endotoxemia model was created by intravenously administering 1 µg/kg of *Escherichia coli*-derived lipopolysaccharide (LPS) of the O111:B4 serotype to calves. Blood samples were taken before LPS administration (hour 0) and at nine different times, at hours 0, 5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, and 48. Nitric oxide metabolism parameters were measured using appropriate biochemical methods.

Findings: Statistically significant increases were observed in mean NO and ammonia levels following LPS administration ($p < 0.05$). Increases in NO levels were particularly pronounced at hours 12 and 24, while significant increases in ammonia levels were observed at hours 2, 4, and 8. ADMA and iNOS levels increased compared to baseline; however, these increases fluctuated over time and did not reach statistical significance. Arginase-I and eNOS levels showed a decrease in the early period and a tendency to recover later in the day, but these changes were not found to be significant.

Conclusion: The findings indicate that changes in NO and ammonia levels, in particular, reflect important biochemical responses during endotoxemia and sepsis. Further studies with larger sample sizes, different experimental protocols, and at the tissue level are needed to more clearly demonstrate the biomarker potential of these parameters.

Keywords: Calf, Experimental endotoxemia, Sepsis, Nitric oxide

1. GİRİŞ

Sepsis enfeksiyona karşı organizmanın göstermiş olduğu düzensiz immün yanıt ve beraberinde akut organ disfonksiyonu ve/veya sıralı organ yetmezliğinin geliştiği, mortalitenin yüksek olduğu sendrom olarak ifade edilebilmektedir (Cecconi ve diğerleri, 2018). Sepsis dünya çapında tüm insan ve evcil/yabani hayvanda oldukça yaygın bir durumdur. Sepsis tanımı yıllardır güncellenip, değiştirilerek yeni tanımlamalar oluşturulmaktadır. Ağır sepsis, sepsis tanımına ek olarak organ disfonksiyonu ve beraberinde hipotansiyonun, hipoperfüzyonun eşlik etmesi olarak ifade edilebilirken, septik şok ise sepsisle indüklenen, yeterli sıvı replasmanının uygulanmasına rağmen hipoperfüzyonun (sistolik kan basıncı <90 mmHg) ve hipotansiyonun eşlik ettiği ve bunun sürdürüldüğü inotropik ya da vazopressör ajanlara ihtiyaç duyulan, diğer şok bulgularının olmadığı şok türüdür (Bone ve diğerleri, 1992). Sepsisin patogeneğinde Gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*), Gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* mantarlar (*Candida*), parazitler ve virüsler rol oynayabilmektedir (Chousterman ve diğerleri, 2017).

Endotoksemi, dolaşımda endotoksin varlığını ifade etmektedir. Endotoksemi Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin komponentleri tarafından şekillenebilirken özellikle Gram negatif bakterilerin hücre duvarı bileşenlerinin (LPS) dolaşıma salınması ile klinik olarak çok daha şiddetli tablo oluşturduğu bilinmektedir (Lohuis ve diğerleri, 1988). Saflaştırılmış standart LPS (lipopolisakkarit)'nin intravenöz uygulanması, Gram negatif sepsise benzer akut sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna (SIRS) neden olabilir. Endotoksemi, tavşan, kobay, rat, köpek, kedi, at, inek gibi pek çok hayvan modelinde uygulanmıştır. Özellikle buzağılar LPS ile oluşturulan endotoksemiye oldukça duyarlıdır (Michaels ve Banks, 1988). Bu bağlamda endotoksemi oluşturmak adına en çok intravenöz *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS'si kullanılmaktadır. *E. coli*'nin endotoksemide kullanılan O55:B5, O11:B4 gibi pek çok farklı suşu ve farklı uygulama dozu bulunmaktadır (Plessers ve diğerleri, 2015).

Sepsis ve inflamatuvar durumlarda proinflamatuvar mediyatörlerin salınımı ve birtakım bağışıklık hücrelerinin indüksiyonuyla kan sirkülasyonunda meydana gelen düzensizlikler, özellikle mikro sirkülasyon düzeyinde düşük periferik vasküler dirençle gelişen hipotansiyon sonucu hayati organların yeterince kanlanamaması ile organ disfonksiyonu hatta organ

yetmezlikleri meydana gelebilmektedir. Sepsisin başlangıcında patojeni yok etmek, vasküler tonusu sağlamak ve süperoksit gibi serbest radikallerin sentezini önlemek amaçlı immün savunmanın parçası olarak başta makrofaj, endotel hücreleri olmak üzere, kalp kası, böbrek hücresi, bağırsak enterositleri gibi doku ve hücrelerde indüklenebilir nitrik oksit sentaz aracılığıyla (iNOS) yüksek oranda nitrik oksit (NO) sentezi gerçekleşir. Sepsisin ilerleyen zamanlarında ise arjinin ve sitrülün aminoasitlerinin bulunabilirliği azaldığından sitrülünün arjinine dönüştürüldüğü arjinin de novo sentezi de azalarak beraberinde NO sentezinde de bir azalış görülür. Bununla beraber arjinaz-I enzim aktivitesinde artış şekillenerek, arjinaz-I enzimi arjinin substratı için iNOS'la rekabet ederek denklemin sitrülün, NO sentezi yerine ornitin ve üre sentezine kaymasına neden olmakta bu durumda NO sentezinin, sitrülün ve dolayısıyla arjinin bulunabilirliğinin azalmasına ve üre döngüsünün artmasıyla amonyak düzeyinde artışa sebep olmaktadır. Özellikle yoğun bakım hastalarında mortalite göstergesi olan ADMA, nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin endojen inhibitörüdür ve nitrik oksit sentezini düzenlemektedir (Morris ve diğerleri, 1994; Kirkebøen ve diğerleri, 1999; Vincent ve diğerleri, 2000).

Bu çalışmada, deneysel endotoksemili neonatal buzağılarda nitrik oksit metabolizmasına ilişkin plazma NO, ADMA, iNOS, eNOS, arjinaz-I ve kan amonyak düzeylerinin zamana bağlı değişimlerinin araştırılması amaçlandı. Bu sayede, parametrelerin sepsis sürecinde tanı ve hastalık seyri açısından potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabilirliğine ilişkin ön bilgi sağlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

Sepsis organizmaya giren enfekte edici patojenle, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar yanıtın aktive olduğu beraberinde organ disfonksiyonu ve sıralı organ yetmezliğinin şekillendiği, mortalitenin oldukça yüksek seyrettiği ve acil tıbbi müdahalenin gerektirdiği sendrom olarak tanımlanabilmektedir (Kurosawa ve diğerleri, 2011).

Sepsis terimi, Yunanca kökenli bir kelime olup "bozulma" veya "çürüme" anlamına gelen bir kelimeden türemiş ve Homeros, Hipokrat, Galen gibi ünlü filozofların edebi eserlerinde sepsis teriminin kullanıldığına dair izler bulunmuştur (Funk ve diğerleri, 2009).

1800’lerde ise sepsisin zararlı mikroorganizmaların vücuda girişi ve beraberinde şekillenen yanıt ile ilişkili olduğu düşünülmüş, sepsis “Mikrop Teorisi” olarak tanımlanmıştır. 1914’te Hugo Schottmüller ilk bilimsel modern tanımlamayı yaparak, sepsisin patojenik bakterilerin sürekli veya periyodik olarak kan sirkülasyonuna girişi sonucu objektif ya da subjektif semptomlara yol açışı olarak ifade etmiştir (Gül ve diğerleri, 2017).

1991 yılında ise “American College of Chest Physicians” ve “Society of Critical Care Medicine” sepsisin ilk fikir birliği tanımını oluşturdular. Bu fikir birliğinde sepsis en az iki veya daha fazla sistemik yangısal yanıt sendromu (SIRS) kriterlerinin varlığında şekillenen bir enfeksiyon odağına karşı sistemik yanıt olarak tanımlanmış ve SIRS kriterlerinin ağır sepsis, septik şok ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Bone ve arkadaşları, 1992).

2001’de mevcut olan sepsis tanımı revize edilmiştir (Levy ve diğerleri, 2003). Sepsis ve septik şok tanımlarının geliştirilmesi ve güncellenmesi, 2001 yılında tanımlanan kısıtlamaların gözden geçirilmesiyle önem kazanmıştır. Bu süreçte, 31 dernek tarafından Delphi yöntemiyle yeni diagnostik kriterlerin belirlenmesi için çalışılmış, elektronik sağlık kayıtları ve uluslararası mesleki toplulukların katılımıyla değerlendirme yapılmıştır. Önceki tanımların eleştirileri arasında inflamasyona odaklanma, SIRS kriterlerinin yetersiz spesifikite ve duyarlılık seviyeleri ile sepsis, ağır sepsis ve septik şokun tanımlanmasında karşılaşılan zorluklar bulunmaktadır. SIRS kriterleri, hayati tehlike oluşturan durumları her zaman tespit etmekte yetersiz kalabilir ve bazı hastalarda enfeksiyon olmamasına rağmen semptomlar görülebilir (Singer ve diğerleri,

2016). Özellikle ileri yaşı, beta-blokör ilaç kullanan veya bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda (SIRS negatif) doğru tanı koymak zor olabilir. Sepsis tanısının doğruluğu için genetik, hücresel ve biyolojik parametrelerin daha hassas bir şekilde değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bu ihtiyaç, sepsisin gerçek insidansının ve mortalitesinin daha kesin bir şekilde belirlenebilmesi için yeni tanımlamalara olan gereksinimi ortaya koymaktadır (Vincent ve diğerleri, 2013). Bu bağlamda Avrupa Yoğun Bakım Derneği (ESICM) ve Kritik Bakım Derneği (SCCM), 2014 yılında, uzmanlardan oluşan bir grup kurarak, sepsis ile ilişkili organ fonksiyonları, hücre biyolojisi, biyokimya, immünoloji ve dolaşımdaki değişikliklere dayalı güncel bir uzlaşma süreci yürütmüş ve klinik alanda uygulanabilir, güncel, tanı ve ölçütler üzerinde çalışmıştır. Bunun üzerine 2016 yılında sepsis 3.0 olarak adlandırılan tanımlamada, sepsis enfeksiyona karşı şekillenen düzensiz konakçı yanıtı ve organ disfonksiyonu olarak kabul edilmiştir. Sepsis 3.0 tanımında, sepsis, septik şok ve organ işlev bozukluğu gibi nedenlerle ortaya çıkan klinik tablonun insidans ve mortalite tahminlerinde tutarsızlıklara yol açabileceği düşünüldüğünden ağır sepsis teriminin gereksiz olduğu sonucuna varılmıştır (Singer ve diğerleri, 2016). Organ disfonksiyonun şiddeti, klinik ve laboratuvar bulguları veya tedaviye yanıt gibi çeşitli ölçütlerle belirlenen Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi (SOFA) (Sepsis ile ilgili Organ Yetmezliği Değerlendirmesi) esas alınarak belirlenmektedir. SOFA skorunun yeterince geniş bir kitle tarafından kabul görmemesi ve tanınmaması, sepsisin tanı ve epidemiyolojik bağlamda izlenmesinde zorluklara neden olmaktadır (Mickiewicz ve diğerleri, 2015; Singer ve diğerleri, 2016). SOFA skorlamasında iki puan ve üstü, organ işlev bozukluğunun şiddetini göstermekte ve hastane içi mortalite riskinin %10'nun üzerinde olarak nitelendirilebilmektedir (Vincent ve diğerleri, 1998).

Tablo 1. Sepsis 1 (1991) tanımları (Bone ve diğerleri, 1992).

Terim	Tanım
Sistemik Yangısal Yanıt Sendromu (SIRS)	Sistemik çeşitli etkenlere karşı şekillenen sistemik inflamatuvar yanıt Ateş >38 C° ya da <36 C° Kalp frekansı >90 atım/dakika Solunum frekansı >20 nefes/dakika ya da PaCO₂ (parsiyel arteriyel karbondioksit basıncı) >32 mmHg Beyaz kan hücresi sayımı >12.000/mm³ ya da <4.000/mm³

Sepsis	Sepsis, enfeksiyona karşı sistemik bir yanıttır ve enfeksiyon sonucunda SIRS kriterlerinden en az ikisinin gözlenmesiyle belirlenir
Ağır Sepsis	Organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon veya hipotansiyon ile ilişkili sepsis; hipoperfüzyon ve perfüzyon anormallikleri, laktik asidoz, oligüri veya akut mental durum değişiklikleri gibi durumları içerebilir, ancak bunlarla sınırlı değildir
Septik Şok	Sepsis tarafından indüklenen, yeterli sıvı tedavisine rağmen hipotansiyon olan ve perfüzyon anormallikleri (örneğin laktik asidoz, oligüri, akut mental durum değişiklikleri) gözlenebilen durum; inotropik veya vazopressör ajanlar kullanan hastalar, perfüzyon anormallikleri sırasında hipotansiyon göstermeyebilir

Tablo 2. Sepsis 2 (2001) tanımları (Levy ve Fink, 2003).

Terim	Tanım
Enfeksiyon	Şüphelenilen ve belgelenen bazı parametrelerin varlığı;
	Genel parametreler - Ateş >38,3 C° ya da <36 C° - Kalp frekansı >90 atım/dakika veya yaşa göre normal değerin 2 standart sapma üzerinde olması - Solunum frekansı >30 nefes/dakika - Mental durumda bozulma - Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (>24 saat içinde 20 mL kg⁻¹'den fazla) - Diyabet olmayanlarda, hiperglisemi (plazma glukozu >110 Mg/dL veya 7.7 mmol/L)
	İnflamatuvar parametreler - Lökositoz (lökosit sayısı >12,000/μL) ya da lökopeni (lökosit sayısı <4000/μL) - Normal lökosit sayısı, %10'dan fazla olgunlaşmamış form - Plazma C-reaktif protein, yaşa göre normal değerin 2 standart sapma üzerinde - Plazma prokalsitonin, yaşa göre normal değerin 2 standart sapma üzerinde

	Hemodinamik parametreler Arteriyel hipotansiyon (sistolik kan basıncı <90 mmHg, MAP (ortalama arter basıncı) <70 mmHg veya yetişkinlerde sistolik kan basıncında >40 mmHg düşüş veya yaşa göre normalin 2 standart sapma altında, karışık venöz oksijen doygunluğu >%70, kardiyak indeks >3.5 L/dk/m²)
	Organ disfonksiyonu parametreleri - Arteriyel hipoksemi (PaO₂/FIO₂ (inspire edilen fraksiyonel oksijen miktarı) <300) - Akut oligüri (idrar çıkışı <0.5 mL/Kg/saat veya en az 2 saat boyunca 45 mmol/L) - Kreatinin artışı ≥0.5 Mg/dL - Koagülasyon anormallikleri (uluslararası normalleştirilmiş oran >1.5 veya aktive parsiyel tromboplastin zamanı >60 saniye) - Trombositopeni (trombosit sayısı <100,000/μL) - Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin >4 Mg/dL veya 70 μmol/L) - İleus
	Doku perfüzyonu parametreleri - Hiperlaktatemi (>3 mmol/L) - Azalmış kapiller dolum zamanı

Tablo 3. Sepsis 3 (2016) tanımları (Singer ve diğerleri, 2016).

Terim	Tanım
Sepsis	Konakçının enfeksiyona karşı düzensiz tepkisinden kaynaklanan, hayatı tehdit eden bir organ fonksiyon bozukluğudur
	Sepsis için klinik kriterler: Şüpheli veya belgelenmiş enfeksiyon ve ≥2 SOFA puanında akut bir artış
	Görev gücü, pozitif qSOFA'nın (hızlı SOFA) kriterleri, daha önce enfekte olduğu tespit edilmemiş hastalarda da olası enfeksiyonun göz önünde bulundurulmasını sağlamalıdır
	qSOFA kriterleri - Değişmiş mental durum (Glaskow Koma Skalası skoru <15) - Sistolik kan basıncı <100 mmHg

	• Solunum hızı >22 nefes/dakika
Septik Şok	Yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen MAP'yi ≥ 65 mmHg'ye yükseltmek için vazopressör tedavi gerektiren, süregelen hipotansiyonlu sepsis klinik tablosu ile belirlenebilir ve laktat seviyesi >2 mmol/L (18 mg/dL) olarak tanımlanabilir.

2.2. Sepsis ve Endotoksemi

Endotoksemi kanda endotoksin varlığıdır. Klinik anlamda endotoksemi terimini kullanabilmek için endotoksemiye ait klinik semptomların varlığı gerekmektedir (Mackay 1996). Endotoksin, Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısının parçasıdır ve canlı dokuya invaze olduktan sonra akut inflamasyonun indüklenmesinden sorumludur (Lohuis ve diğerleri, 1988). Gram negatif bakterilerin hücre duvarının yapısı, içte peptidoglikan tabaka, dışta lipopolisakkaridler, fosfolipitler ve proteinlerden meydana gelmektedir. Lipopolisakkarid tabakada endotoksin molekülü bulunmaktadır. Bu endotoksin hücre membranında bulunduğu esnada inaktiftir; ancak büyüme, bölünme ve yıkım gibi bir takım hücre olayları esnasında hücre membranındaki inaktif endotoksin molekülü açığa çıkarak, sepsis/endotoksemide akut inflamasyon sürecini başlatmaktadır (Fışgın, 2004). Bakteriler tarafından şekillenmiş sepsisin mortalite ve morbiditesi üzerinde endotoksinin rolü bulunmaktadır (Levi ve diğerleri, 1997; Levi ve diğerleri, 2000; Çöl ve Durgun, 2004; Constable, 2007).

Saflaştırılmış standart LPS (lipopolisakkarit)'nin intravenöz uygulanması, Gram negatif sepsise benzer akut SIRS'a neden olabilir. Bu bağlamda, sepsis ve septik şokun patofizyolojisini incelemek için uzun yıllardır deneysel endotoksemi modelleri kullanılmaktadır (Hoffman ve Natanson, 1993; Remick ve Ward, 2005; Andreassen ve diğerleri, 2008) Endotoksemi modelleri standardizasyon, tekrarlanabilirlik ve karşılaştırılabilirlik açısından avantajlar sunmaktadır. Endotoksemi modeli oluşturabilmek adına endotoksin (Chung ve diğerleri, 2001; Lindsey ve diğerleri, 1991; Pittet ve diğerleri, 2000; Taylor ve diğerleri, 2001; Traber ve diğerleri, 1998) veya LPS (Taylor, 2001; Lagoa ve diğerleri, 2004) çekal ligasyon veya perforasyon (Fink ve Heard, 1990), intravasküler infüzyon, peritonit, yumuşak doku enfeksiyonu (Durkot ve Wolfe, 1989), pnömoni (Murakami ve diğerleri, 2002) veya menenjit (Ribes ve diğerleri, 2003) modeli gibi çeşitli yollarla organizmaya verilmektedir. Bu bağlamda başta fare, sıçan, tavşan, kobay gibi laboratuvar hayvanlarının yanı sıra köpek, domuz, koyun, sığır gibi farklı hayvan türleri de kullanılmaktadır (Fink ve Heard, 1990). Bu türler arasında endotoksine karşı gösterilen

duyarlılık farklı seviyelerde olabilmektedir. Kemirgenler, kediler, köpekler endotoksine direnç gösterirken, tavşanlar koyunlar, buzağılar insanlar ise endotoksine oldukça duyarlıdır (piper ve diğerleri, 1996; Michie 1998; Fink ve Heard, 1990). Endotoksemi modeli oluşturabilmek adına farklı dozlarda endotoksin uygulanması söz konusudur. Özellikle LPS'ye duyarlı olan canlılarda daha düşük doz endotoksin kullanılırken, dirençli olanlarda ise endotoksin yüksek dozdan verilebilmektedir (Parker ve Watkins, 2001). Sığırların ve özellikle buzağının LPS'ye diğer hayvan türlerine göre çok daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Michaels ve Banks, 1988). Sığırlarda akut faz tepkisini incelemek için çeşitli deneysel modeller rapor edilmiştir. Genel olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS'si en sık uygulanan endotoksin türüdür. LPS'nin intravenöz yolla uygulanması ise en sık kullanılan metottur. Tablo 4, buzağılarda LPS tarafından endotokseminin oluşturulduğu bazı çalışmaları özetlenmektedir.

Tablo 4. Buzağılarda deneysel endotoksemiye indüklemek adına verilen *E. coli* serotipi, uygulama dozu, buzağı yaşı ve sayısı.

Serotip	Buzağı sayısı	Yaş (gün)	Uygulanan doz (uq/kg) ve infüzyon süresi	Kaynak
O55:B5	2	14-21	0,5	Peel Ve diğerleri, 1990
O55:B5	25	1	Bolus: 0,2, 2, 20 İnfüzyon (0.83 saat): 0,2; 2, 20	Gerros ve diğerleri, 1993
O55:B5	6	1	1,5 µg/kg/saat (0,5 saat) 1 µg/kg/saat (2,5 saat)	Semrad ve diğerleri, 1993
O111:B4	6	-	2 (1.67 saat)	Werling ve diğerleri, 1996
O111:B4	8	22	0,1	Bieniek ve diğerleri, 1998
O55:B5	12	120-150	0,2	Elasser ve diğerleri, 2005
O111:B4	8	10-60	0,1 (30 dk)	Şen ve Coşkun, 2008
O111:B4	18	-	1	Carrol ve diğerleri, 2009a
O111:B4	9	-	2,5	Carrol vd., 2009b
O111:B4	21	-	0,5	Carrol ve diğerleri, 2013
O55:B5	10	120	2	Yılmaz ve diğerleri, 2013

O111:B4	12	0-6	2 (30 dk)	Elmas ve diğeri, 2013
O111:B4	9	65-82	2,5	Hinds ve diğeri, 2014
O111:B4	24	5-15	1 (30 dk)	Coşkun ve diğeri, 2015
O111:B4	11	28	0,5	Plessers ve diğeri, 2015b

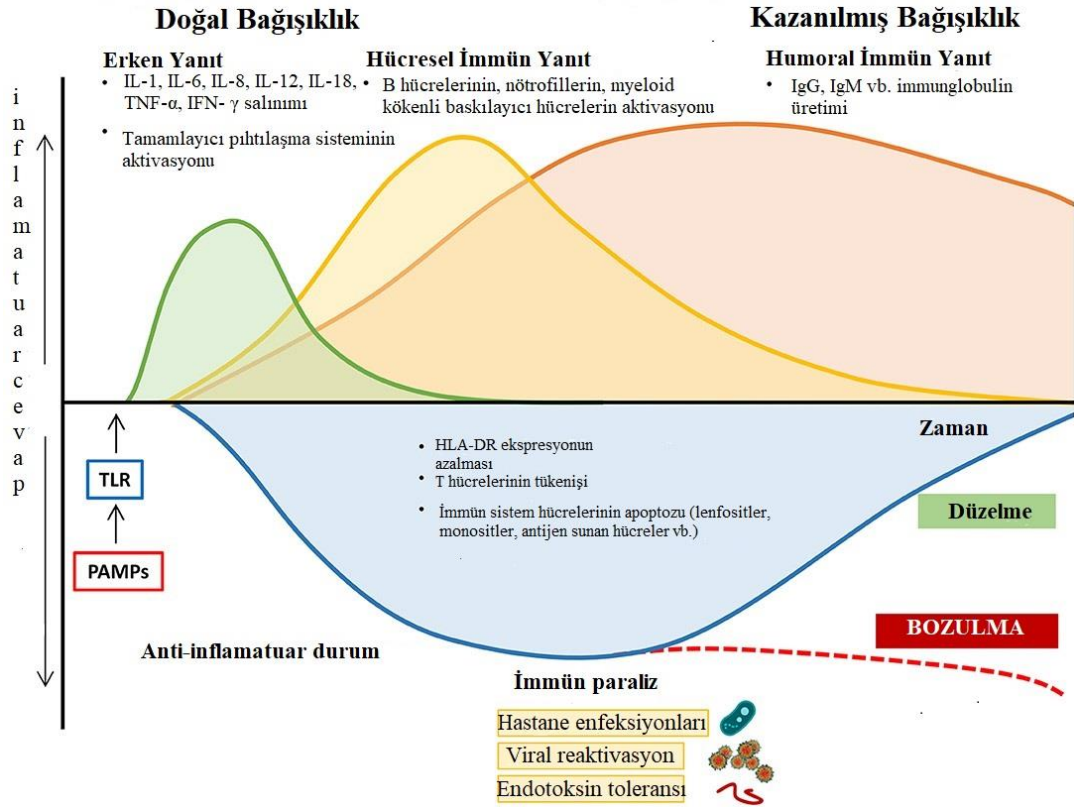
2.3. Sepsis ve Endotoksemi Patogenezi

Sepsis ve endotoksemi, inflamatuvar ve antiinflamatuvar dengenin bozulmasıdır. Sepsisin patogeneğinde rol oynayan mikroorganizmalar Gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*) ve Gram negatif bakteriler (*Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*), mantarlar (*Candida*), parazitler ve virüslerdir. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar yolların yukarı regülasyonu; sitokinlerin, mediyatörlerin, patojenle ilişkili moleküllerin (PAMP) organizmada dolaşıma salınımına sebep olarak koagülasyon sisteminin ve kaskadların devreye girmesi ile sonuçlanır (Chousterman ve diğeri, 2017).

Hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar yolların eşzamanlı olarak aktif hale gelmesi, inflamasyonun ilerlemesine ve sonunda çoklu organ yetmezliğine neden olabilecek doku hasarına yol açar. Hastalığın ileri evrelerinde, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunda azalma, artan hücre ölümü ve T hücresi tükenmesi nedeniyle immünosupresyon gelişir. Bu durum, "immünoparalizi" olarak adlandırılır ve etkilenen hastaların hastane enfeksiyonlarına, fırsatçı patojenlere ve viral reaktivasyonlara karşı daha hassas hale gelmesine neden olur (Tang ve diğeri, 2010; Tamayo ve diğeri, 2011).

Patojenle ilişkili moleküllerin (endotoksinler, ekzotoksinler, DNA (deoksiribonükleik asit) dizileri, lipidleri, PAMP), organizmaya girişi sonucu, hasarla ilişkili moleküller patenlerinin (DAMP) salınması ilk immünolojik cevabı şekillendirir. PAMP ve DAMP'lar antijen sunan hücreler (APC) üzerindeki patojen tanıma reseptörleri (R) ve monositlerdeki toll benzeri reseptörler (TLR) tarafından algılanarak B hücrelerinin nükleer faktör-kappa-hafif zincir güçlendiricisinin (NF-kB) aktive olmasıyla adaptif bağışıklık, hücre metabolizması, inflamasyonla ilişkili bazı interlökin (IL) ve mediyatörlerin transkripsiyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla hücre çekirdeğine taşınım gerçekleşir. Bu da IL-1, IL-12, IL-18,

tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar interlökinlerin ve interferonların (IFN) ekspresyonunu şekillendirir. Bu erken aktivasyon genlerinin ekspresyonu IFN- γ , IL-6, IL-8 gibi sekonder sitokinlerin salınımına, koagülasyon yollarının aktivasyonuna ve negatif geri bildirimin düzenlenmesinde kazanılmış bağışıklığın aşağı regülasyonuna yol açmaktadır (Hotchkiss ve diğerleri, 2016).



Şekil 1. Sepsis patogenezinde inflamatuvar ve antiinflamatuvar süreçle ilişkili bazı yollar (Jarczak ve diğerleri, 2021).

2.3.1. Nötrofiller ve Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları

Doğuştan immün sistemde büyük rolü olan nötrofiller, patojene yönelik ilk savunma hattını oluşturur. Granülosit uyarımı ile kemik iliğinden, olgun nötrofil ve genç nötrofiller (Band nötrofil) kana salınır. Olgunlaşmamış nötrofiller, PAMP'lar veya DAMP'lar tarafından aktive edildiğinde fagositozda azalma ve oksidatif hasar şekillenir. Bu hücrelerin yüksek seviyeleri nötrofil ekstraselüler tuzaklarının (NETs) kendiliğinden üretiminin ve salınımının artmasına sebep olur (Drifte ve diğerleri, 2013; Nierhaus ve diğerleri, 2013).

NETs'ler, çeşitli patojenleri inhibe edebilen yoğunlaştırılmış kromatin, membran ve membran proteinlerinden oluşan hücre dışı yapılardır. Bunlar arasında Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, virüsler, mayalar ve hatta büyük boyutları nedeniyle her zaman fagositozlanamayan protozoa ve parazitler bulunur (Simmons ve Pittet, 2015; Lu ve diğerleri, 2012). NETs'lerin salınımı kemokinler ve sitokinlerin yanı sıra trombosit agonistleri (trombin, kollajen, araşidonik asit, ADP) ve antikorlar tarafından indüklenmektedir (Zucoloto ve Jenne, 2019). NETs'lerin aşırı üretim, salınım ve yetersiz yıkımlanması beraberinde endotel hasarı ve hiperpıhtılaşmayla ilişkilendirilir (Cox ve diğerleri, 2020; Ortmann ve Kolaczowska, 2018; Camicia ve diğerleri, 2014).

2.3.2. Kompleman Sistemi

Sepsisin başlangıç evrelerinde C3a, C4a, C5a gibi birtakım kompleman sistem aktivasyon ürünleri artış gösterir (Ward ve Gao, 2009). C5a, C5a reseptörüne (C5aR) bağlanarak nötrofillerin yangılı bölgeye göçü ile patojen ve kalıntıların fagositozunu sağlar (Denk ve diğerleri, 2017). Burada, PAMP'lar ve DAMP'lar oksidatif hasar sırasında NETs'lerin, granül enzimlerin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınmasını indükleyerek pıhtılaşma dengesini protrombotik etki gösterecek ve fibrinolizi engelleyecek şekilde değiştirir. Sonuç olarak dissemine intravasküler koagülasyonun (DIC) özelliği olan pıhtılaşma faktörlerinin tüketimi ile ciddi mikrovasküler tromboz gelişir. C5a'nın şiddetli artışı sistemik inflamasyonun artmasına, ilerleyici lenfosit apoptozuna ve nötrofil fonksiyonlarında yetersizliğe, beraberinde klinik tabloda kötüleşmeye ve çoklu organ yetmezliklerine yol açar (Jarczак ve diğerleri, 2021).

2.3.3. Pıhtılaşma ve Endotel Hücre Aktivasyonu

Konakçı patojen etkileşiminde erken dönemde, pıhtılaşmanın aktivasyonu bağışıklık mekanizmalarını aktive eder ve son zamanlarda pıhtılaşma ve hastalık ilişkisini belirtmek için “immünotromboz” terimi türetilmiştir. Sepsiste koagülasyon sisteminin şiddetli aktivasyonu söz konusudur. Bu durum kanama ve mikrovasküler tromboz ile ilişkili olabilecek intravasküler pıhtılaşma ve pıhtılaşma faktörlerinin, trombositlerin tüketimiyle ilişkili tüketim koagülopatisinden (DIC) ileri gelmektedir (Engelmann ve Massberg, 2013).

Doku faktörlü sepsiste pıhtılaşma, sürecin ana faktörüdür. İnsan ve insan olmayan primatlarda yapılan deneysel endotoksemi çalışmalarında doku faktörünün inhibisyonuyla koagülasyon aktivasyonunun azaldığı saptanmıştır. Babunlarda yapılan benzer bir çalışmada ise yine doku faktörünün inhibisyonunun sepsiste çoklu organ yetmezliğini ve mortalite oranını azalttığı görülmüştür (Levi ve Poll, 2017).

Koagülasyon ve inflamasyon arasında bağlantılı ilişki bulunmaktadır. Doku faktörü, pıhtılaşma faktörleri FVIIa, FXa, trombin, fibrin, proteazla aktive olan reseptörlerle (PAR) etkileşime girerek proinflamatuvar hücre sinyallemesini aktive edebilir (Nieman, 2016).

Sepsiste tromboz oluşumuna eğilim üç antikoagülan yolun aktivitesinin artışından kaynaklanabilmektedir. Bunlar antitrombin, doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI), protein C sistemidir. Antikoagülan aktivitesine ek olarak aktifleştirilmiş protein C, PAR1 yoluyla endotel hücreleri üzerinde antiinflamatuvar, antiapoptotik ve anjiyoprotektif etkilere sahip olabilir (Levi ve Poll, 2017).

2.3.4. Sepsiste İmmüsupresyon

Erken inflamatuvar yanıt sepsisin ayırt edici özelliği olarak görülse de hastalığın erken ve geç evrelerinde ortaya çıkan immüsupresyon söz konusudur (Hotchkiss ve diğerleri, 2016).

Sepsisin ilk trimesterdeki döneminde APC ve stromal hücrelerin apoptozundaki artışın yanında B ve T lenfositlerde de tükeniş görülmektedir (Delano ve diğerleri, 2007). Sepsiste lenfopeni şekillenmesinin sebepleri arasında çevre dokuya yoğun lenfosit göçü, apoptotik sürecin artışı ve acil hematopoezde nötrofil ve monosit salınımının öncelikli oluşu dolayısıyla kemik iliğinden lenfosit üretiminin azalmasıdır (Park ve diğerleri, 2014). Sepsisin devam eden süreçlerinde lenfopeninin süregelen devamı, immünglobulin seviyelerinin azalışı, artmış mortalite oranları ile ilişkilidir (Drewry ve diğerleri, 2014). Sepsiste B lenfositlerin görevi immünglobulin ve antikor üretiminin yanı sıra sitokin üretimi ve APC olarak etki ederek doğuştan gelen bağışıklık yanıtını düzenlemektedir. Antijen sunan hücreler, T ve B lenfositlerle etkileşime girerek klonal genişleme indüklenmesi ve beraberinde spesifik antikorların sentezlenmesi sağlanmış olur. B lenfositler antikor salgılayan plazma hücrelerine dönüşerek konakçı savunmasında önemli katkıda bulunur (Durandy ve diğerleri, 2009).

Sepsis başlangıcında B lenfositler, PRR'ler aracılığıyla patojenler tarafından aktive edilerek ilk bağışıklık yanıtında bulunurlar (Rauch ve diğerleri, 2012). Septik şoklu hayatta kalmayan hastalarda B lenfositlerde fonksiyonel azalma ve beraberinde IgM üretiminde belirgin bir düşüş saptanmıştır (Krautz ve diğerleri, 2018). Sepsiste görülen lenfopeninin prognostik bir faktör olduğu düşünülmektedir. Sepsisten kurtulan hastaların kanındaki B hücresi sayısı, sepsisten ölen hastalara oranla daha yüksektir. Özellikle sepsisin başladığı 24 saatlik dilim içerisinde bu etkinin, Gram negatif bakterilere karşı savunmada etkili, doğal antikör olan IgM'nin salınımıyla ilişkilendirilebilir. Sepsisten kurtulan hastalarda IgM antikörlerinin sepsisten ölenlere oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir, bu da konakçı savunmasında B lenfositlerden salınan IgM antikörlerinin önemini kanıtlar düzeydedir (Rauch ve diğerleri, 2012).

Sepsis sırasında lenfopeniye ek olarak APC ve monositlerin apoptoz oranında artış şekillenmektedir ve bu proinflatuar sitokinlerin azalmasıyla ilişkilidir. Apoptoza uğramayan monosit ve dentritik hücre yüzeyindeki insan lökosit antijeni DR (HLA-DR) ekspresyonu da azalarak T lenfositlerin opsonizasyon yeteneğinin kaybolmasına neden olarak Th1 ve Th2 yanıtının bozulmasıyla sonuçlanır (Hotchkiss ve diğerleri, 2013). APC ve monositlerin azalmasıyla proinflatuar sitokinlerin üretiminin kaybına ek olarak granülopoezde artışla, miyeloid hücreler olgunlaşmadan periferik kana göç ederek aktif hale gelir. Bu miyeloid baskılayıcı hücreler (MDSC) immün baskılayıcı IL-10, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) salgılar (Cuenca ve diğerleri, 2011).

Sepsis sırasında programlanmış ölüm proteini 1 (PD-1) gibi moleküllerin ekspresyonu, T lenfositlerin, APC'lerin, periferik doku epitel hücrelerinin yüzeyinde artarak programlanmış ölüm proteini 1 reseptörüne (PD1-R) bağlanır. Böylelikle lökositler baskılanarak ve immün hücrelerin apoptozu şekillenerek APC fonksiyon bozukluğuna, düzenleyici T hücrelerinin (T reg) genişlemesine ve lenfopeninin şiddetlenmesine neden olur. Her ne kadar doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık hücrelerinin kontrollü apoptozu, başlangıçta konakçı için faydalı olsa da, sepsiste inflammatuar yanıtın eşlik eden yukarı regülasyonu, bağışıklık hücrelerinde önemli bir kayıpla ve konağın istilacı patojenlere karşı savunmayı sürdürememesiyle sonuçlanır (Monneret ve diğerleri, 2003).

2.3.5. Sepsis ve Nitrik Oksit Metabolizması

Nitrik oksit (NO) memeli hücreleri tarafından üretilip, vücutta birçok işlevi olan molekül konumundadır. NO ilk defa 1987 yılında hücre ürünü olarak keşfedilmiş ve daha sonrasında sepsis ve inflamasyonda NO metabolizmasındaki değişimler araştırma konusu olmuştur (Kelly ve diğerleri, 1995; Vincent ve diğerleri, 2000).

2.3.5.1. Nitrik Oksit

Memeli hücresinin en küçük sentetik ürünü olan NO, vücutta yararlı ve zararlı hücre sinyalizasyonu, bağışıklık aracılı sitotoksiste gibi işlevleri olan, özellikle homeostazın sürdürülmesinde önemi olan, kararsız serbest radikaldir. Nitrik oksitin memeli hücrelerinde ilk keşfi 1916 yılına dayanmaktadır. 1985 yılında da inflamatuvar uyaranlar tarafından indüklenen makrofajların aktive olarak NO saldığı bulunmuştur. Daha sonralarda ise NO sentezinde L-arjininin öncü molekül olduğu ve sepsis ya da inflamatuvar hastalıklarda NO sentezinin inhibisyonu amacıyla L-arjinin türevli hem analoglarının kullanılabilirliği araştırılmaya başlanmıştır (Kuyumcu ve diğerleri, 2004).

Nitrik oksit hücre zarını kolayca geçebilen sulu çözeltilerde yarı ömrü kısa olan ve dioksijenle reaksiyona girerek son ürün olarak nitrat ve nitrit bileşiklerini oluşturan renksiz ve stabil bir gazdır. NO, ağır metal protez gruplarını içeren enzimleri inhibe ya da aktive etmek suretiyle özellikle demir gibi ağır metallerle etkileşime girerek siklik guanizin fosfat üretimini arttırmaktadır. NO demir içeren sitokromları inhibe ederek hücresel solunumu engeller ve ribonükleotid redüktazı inhibe ederek hücresel proliferasyonu değiştirir ve bu etkileriyle NO sitotoksik/sitostatik etki gösterir. Bununla beraber NO süperoksit gibi serbest radikalleri bağlayarak sitoprotektif etki gösterir. Nitrik oksit, guanozin 3,5-siklik guanizin monofosfat (cGMP) sentezini düzenlemektedir. cGMP, böbrek ve beyinde atrial natriüretik faktör (ANP) hormonunun indüksiyonuyla, düz kaslarda gevşeme, retinal fototransdüksiyon ve enterotoksin varlığında ince bağırsağa sıvı salınımını etkilemektedir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla, L-arjinin kimyasal olarak eşdeğer guanidino azotlarının beş elektronlu oksidasyonu sonucu NO ve L-sitrülin üretilmektedir. Bu bağlamda NO üretimi için L-arjininin bulunabilirliği önemlilik arz etmektedir (Wijnands ve diğerleri, 2015).

Tablo 5. NO'nun fizyolojik Etkileri (Zaloga ve diğerkleri, 2004).

Vasküler	Vazadilatör
	Kan basıncını düzenleme
	Kan akışını düzenleme
	Anjiyogenezis (VEGF)
	Endotelin-1 salınımını azaltır
	Permeabiliteyi azaltır
	Endotelial apoptozisi azaltır
	Endotel fonksiyonu düzenleme
Kardiyak	Miyokardiyal hipertrofiyi engeller
	Miyokardiyal fonksiyonu düzenleme
İmmun	Patojenleri ve tümör hücrelerini yok etme
	Lökosit aktivasyonunu inhibe etme ve adhezyonu önleme (nötrofil, makrofaj vb.)
	Adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu önleme (VCAM-1 (vasküler hücre yapışma proteini), ICAM-1 (hücre içi adhezyon molekülü))
	NF κ B aktivasyonunu azaltma
	Lenfosit fonksiyonunu düzenleme
	IL-6, TNF, süperoksit, doku faktörü, metalloproteinaz, monosit kemotaktik peptitler vb. faktörlerin ekspresyonunu engelleme
Hematolojik	Trombosit agregasyonunu ve adhezyonunu önleme
	Hiperpıhtılaşmayı engelleme
Nörolojik	Nörotransmitter
Pulmoner	Pulmoner vasküler rezistans
	Süperoksit radikal temizleyici
	Antioksidan
	Allogreft reddini azaltır

Diğer	Yara iyileşmesini sağlar
	Kollajen sentezini artırır
	GFR düzenler
	Tümör indüksiyonunu ve büyümesini azaltır

2.3.5.2. Nitrik Oksit Sentaz Enzimi (NOS)

Nitrik oksit sentaz enzimleri aracılığıyla L-arjinin, L-sitrülin ve nitrik oksit üretimi gerçekleşmektedir. Oluşan toplam NO konsantrasyonu NOS enzimlerinin aktivitesine göre değişmektedir. NOS'un üç farklı enzim formu bulunmaktadır bunlar; nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS). nNOS ve eNOS beraber cNOS olarak ifade edilmektedir. cNOS farklı hücre tiplerinde az miktarda ifade edilen ve sonuç olarak düşük seviyelerde NO üretimi sağlayan kalsiyum (Ca^{+2})-kalmodulin bağımlı enzimlerdir. cNOS hücrelerde sürekli ifade edilmektedir. iNOS ise Ca^{+2} -kalmodulin bağımlı değildir ve yalnızca proinflatuar mediyatörlerin varlığında, esas olarak makrofaj ve dokularda üretilmektedir (Wijnands ve diğerleri, 2015).

nNOS'un üretildiği doku ve hücreler; böbrek, adrenal bezler, epitel hücreleri, düz kas hücreleri, pankreas, merkezi ve periferik dokulardır. nNOS kan basıncının düzenlenmesi, düz kaslarda hipokontraktilitenin sağlanması ve sinirsel iletim aracılığıyla vazodilatasyon gibi farklı fizyolojik görevlerden sorumludur (Wijnands ve diğerleri, 2015).

eNOS özellikle endotel hücrelerinde bulunmaktadır ve başlıca fonksiyonları; vasküler tonu ayarlama, vazokonstriksiyon, lökositlerin damar duvarına adhezyonunu ve trombosit agregasyonunu önlemedir. Bu bağlamda eNOS vazoprotektif etki göstermektedir. eNOS endotel hücrelerde arjinosüksinat sentetaz (ASS) ve arjinosüksinat liyaz (ASL) ile beraber bulunmakta ve bu enzimlerle beraber endotel kaynaklı NO üretimi düzenlenmektedir. (Wijnands ve diğerleri, 2015).

NO üretimi esnasında NOS enzimlerinin farklı kofaktörleri bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi tetrahidrobiopterin (BH4)'dir. BH4, NOS enzim yapısını stabilize ederek L-arjininin NOS'a bağlanma kapasitesini arttırmaktadır. BH4'ün azalan bulunabilirliği, NOS enzim yapısının ayrışmasına ve süperoksit üretimine sebep olmaktadır (Wijnands ve diğerleri, 2015).

Tablo 6. cNOS ve iNOS enzimlerinin özellikleri (Davis ve Anstey, 2011; Kirkebøen ve diğerleri, 1999; Luiking ve diğerleri, 2009; Tadié ve diğerleri, 2013; Wijnands ve diğerleri, 2012a).

	cNOS	iNOS
İndüklendiği yapılar	Endotel hücre, trombosit, nöron	Lökosit, makrofaj, kupffer hücresi, mezengial hücre, endoteliyal hücre, düz kas hücresi
Aktivasyon	Sürekli	Proinflamatuvar uyarım; sitokinler, endotoksin
Ca²⁺ bağımlılığı	Bağımlı	Bağımsız
Hücre membranından geçiş	Geçer	Geçemez
Yarılanma ömrü ve salınım	Kısa-hızlı	Uzun-gecikmeli
İndüklendiği durumlar	Fizyolojik	Patofizyolojik
İnhibitörler	L-arjinin analogları	L-arjinin analogları, glikokortikoidler

2.3.5.3. L-arjinin

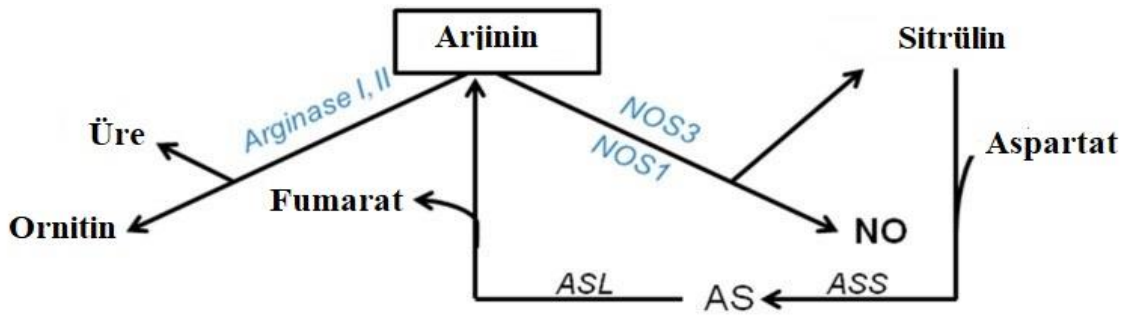
Arjinin, dışarıdan alınan besinlerle, sitrülün aminoasidinden de novo senteziyle (toplam arjinin üretiminin %10-15'i) ve proteinlerin katabolizasyonu ile (%80) üretilen, özellikle sepsis ve inflamatuvar koşullarda az bulunabilirliği sebebiyle yarı esansiyel olan bir aminoasittir. Arjinin özellikle ince bağırsakta jejunumdan emilip, karaciğerde depolanır. Arjinin üretimi %60 oranında L-sitrülinden de novo senteziyle gerçekleşmekte ancak plazma arjininin %5-15'ini oluşturmaktadır. Plazmadaki arjininin çoğu gıda alımı ile sağlanmaktadır (Kelly ve diğerleri, 1995; Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.3.1. Arjinin de novo Sentezi

Arjinosüksinat sentetaz (ASS) ve arjinosüksinat liyaz (ASL) adlı sitozolik enzim kompleksi aracılığıyla, sitrülün aminoasidinden arjinin türetilmesi “arjinin de novo sentezi” olarak adlandırılmaktadır. Dışarıdan gıda ile alınan sitrülinden, arjinin üretim miktarı çok azdır.

Sitrülinin %60-80'i proksimal ince bağırsak enterositlerinde glutaminden üretilmekte ve daha sonra kan dolaşımına salınarak, böbrek proksimal tübüler hücrelerde arjinin de novo sentezi gerçekleşmektedir. Arjinin üretiminde böbrek bağırsak arasındaki bu ilişki bağırsak-böbrek eksenini olarak nitelendirilebilmektedir. Bağırsak-böbrek ekseninde bu denge, plazma sitrülin konsantrasyonunun belirleyicisidir. Bununla beraber enterositlerde ve hepatositlerde ornitin transkarbamilaz enzimi aracılığıyla ornitin, sitrüline dönüştürülebilmekte ve arjinin öncüsü olarak portal dolaşıma salınmaktadır (Kelly ve diğerleri, 1995; Wijnands ve diğerleri, 2015).

Arjinin de novo sentezinin büyük çoğunluğu böbreklerde olmakla beraber makrofajlar, aort düz kas hücreleri, endotel ve sinir hücreleri gibi farklı hücre tiplerinde de arjinin de novo sentezi gerçekleşmektedir. Endotel hücrelerinde arjinin de novo sentezinden sorumlu ASS ve ASL enzimleri eNOS kompleksinin parçasıdır ve bu enzimlerin aktiviteleri üretilen nitrik oksit konsantrasyonu açısından önemlidir (Kelly ve diğerleri, 1995; Wijnands ve diğerleri, 2015)



Şekil 2. Fizyolojik koşullarda arjinin-sitrülin-NO metabolizması (Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.3.2. Arjinin Taşıma Sistemi

Arjinin bağırsak ve böbreklerde üretildikten sonra belirli arjinin taşıma sistemleri aracılığıyla hücre içine taşınmaktadır. CAT-1, CAT-2 (CAT-2a ve CAT-2b), CAT-3, CAT-4 olmak üzere dört farklı katyonik aminoasit taşıyıcısı (CAT) bulunmaktadır. Sitrülin taşıyıcısı olarak CAT-2a, CAT-3 ve CAT-4'ün affinitesi CAT-2b ve CAT-1'e göre çok düşüktür (Wijnands ve diğerleri, 2015).

Epitel ve endotel hücrelerde bulunan CAT-1, özellikle endotel hücrelerde eNOS ile beraber bulunarak, endotelial nitrik oksit üretiminin sağlanması açısından arjininin hücre içine taşınımını kolaylaştırmaktadır. Bu özellikle eNOS için yeterli arjinin mevcudiyetini sağlamak amaçlı hücre içi havuzda arjinin karışımını engellemektedir (Wijnands ve diğerleri, 2015).

Yalnızca sitokin ve LPS indüksiyonu sonucu inflamatuvar hücrelerde üretilen CAT-2b, iNOS ekspresyonu ile ilişkilidir (Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.3.3. Arjinin Katabolizması

Arjinin beş farklı enzim aracılığıyla yıkıma uğramaktadır. Bunlar; üre döngüsünde rol alan arjinaz enzim grubu (arjinaz-I ve arjinaz-II), nitrik oksit metabolizmasında nitrik oksit sentazlar, arjinin dekarboksilaz (ADC) ve son olarak arjinin:glisin amidinotranseferaz. Bu beş farklı enzimin aracılık ettiği beş farklı katabolik yollarla arjinin, ornitin, üre, poliaminler, sitrülün, NO, agmatin, glutamat, proteinler, kreatin üretilir (Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.3.3.1. Arjinaz Yolu (Arjinaz-I ve Arjinaz-II)

Arjinaz enzimleri aracılığıyla arjinini, üre ve ornitine hidrolize etmektedir. Arjinaz yolu ile arjininin %15-20'si üre döngüsüne girmektedir. Arjinazlar; arjinaz-I ve arjinaz-II olmak üzere iki izoform enzimden oluşmaktadır. Arjinaz-I; sitozolik enzimdir ve yüksek oranda karaciğer ve bununla beraber makrofaj ve endotel hücrelerinde de ifade edilmektedir. Arjinaz-I, üre döngüsünde amonyağın detoksifikasyonundan sorumlu son enzimdir. Arjinaz-II; mitokondriyal enzimdir, beyin, böbrek, ince bağırsak, meme bezi, makrofajlar gibi dokularda ifade edilir ve arjininin, ornitin, glutamat ve proline dönüşümünde rol oynar (Wijnands ve diğerleri, 2015).

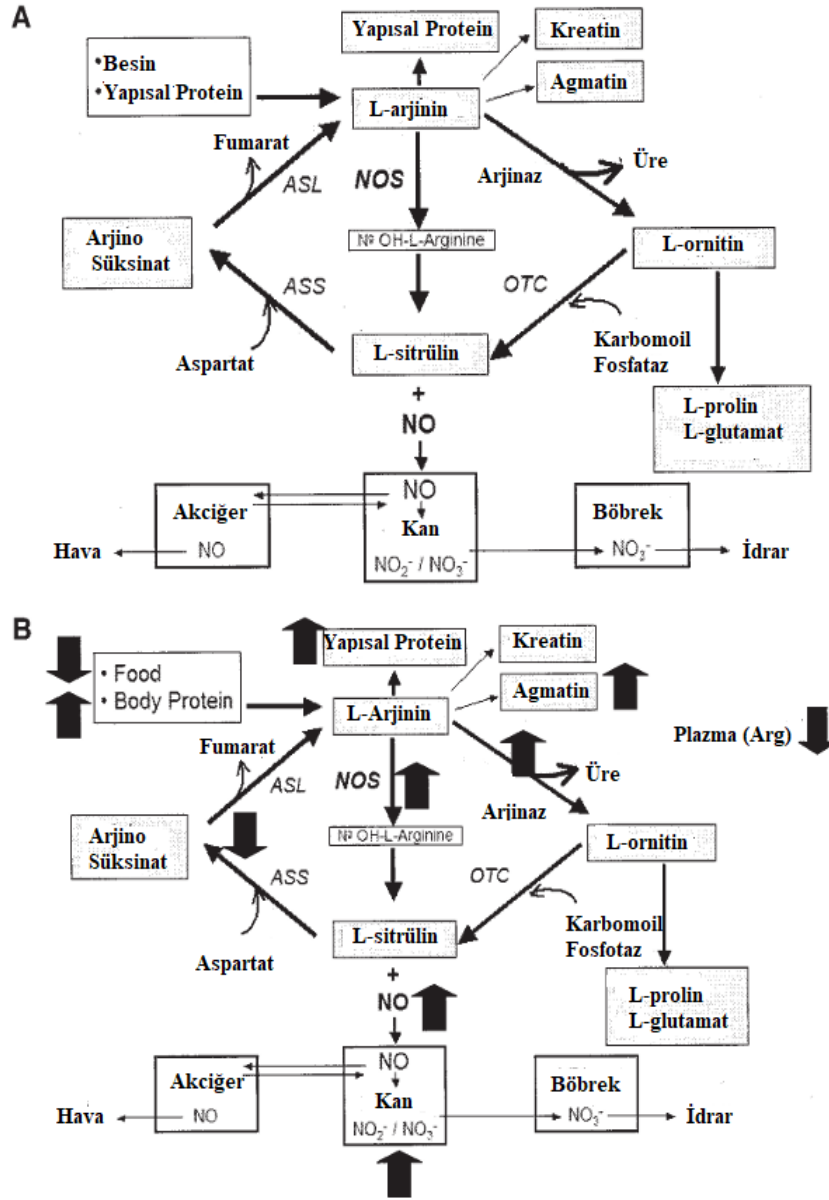
Sonuç olarak arjinaz enzimleri NO üretimini düzenleyerek, ornitin aminotransferaz indüksiyonu ile de glutamat ve prolin sentezine aracılık ederek hücresel poliaminlerin seviyelerinde artış sağlar (Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.4. Sepsis ve İnflamasyonda Arjinin-NO Metabolizmasındaki Değişimler

Sepsis ve inflamatuvar koşullarda, arjininin diyet alımının azalması, arjinin de novo sentezinin bozulması, bağırsak yetmezliği sonucu protein alımının azalması, böbrek yetmezliği ile sitrülinden, arjinin dönüşümünün gerçekleşmemesi ve bozulmuş glutamin-sitrülin dönüşümü gibi arjinin tüketimine yol açan durumlar arjinin bulunabilirliğini azaltmakta ve sepsiste arjinin, yarı esansiyel aminoasit haline gelmektedir. Hatta bazı çalışmalarda arjinin eksikliğini sepsisin kaynağı olarak görmektedir (Davis ve Anstey, 2011; Luiking ve diğerleri, 2009; Tadié ve diğerleri, 2013; Wijnands ve diğerleri, 2012a)

Sepsiste arjinin bulunabilirliği, arjinaz ve iNOS enzimlerinin aktivitesi ya da protein sentezi arttıkça azalabilmektedir. Sepsisin başlangıç evrelerinde interlöykin (IL)-1, IL-6, IL-8, tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interferon (IFN)- γ inflamatuvar sitokinler, trombosit aktive edici faktör (PAF), makrofajlar, uyarımla beraber aktifleşerek iNOS'un indüksiyonunu sağlar. Bununla beraber iNOS indüksiyonu yanında endotoksin ve sitokinler arjinin spesifik y1 kanallarının açılmasını, CAT ekspresyonuyla da arjinin bulunabilirliğini ve BH4 konsantrasyonunun artışı sağlayarak NO salınımı artırılır (Vincent ve diğerleri, 2000). Aktifleşmemiş makrofajlar iNOS ve arjinaz enzimlerini ifade etmez ve minimum arjinin kullanımı sergiler. Makrofajlar, M1 ve M2 makrofajları olarak iki çeşittir. M1 makrofajları proinflamatuvar, patojenleri öldürücü etki gösterirken, M2 makrofajları ise antiinflamatuvar, dokuyu onaran etki gösterir. Sepsis ve inflamatuvar durumlarda M1 ve M2 makrofajları immün yanıt olarak T-lenfositleri indükleyerek Th1 ve Th2 sitokin üretir. M1 makrofajları hücre dışında bulunan arjinini hücre içine alarak iNOS aracılığıyla NO ve sitrülin üretimi gerçekleşir. Bu bağlamda sepsis varlığında makrofaj gibi immün hücrelerin aktif olması ve beraberinde yaşanan proinflamatuvar sitokin sentezi, ekstraselüler arjininin intraselüler alana taşınımının artmasıyla sepsisin başlangıç evresinde, sitoprotektif etkili NO üretimi artar. Sepsis sırasında arjinin bulunabilirliğini iNOS aracılığıyla NO üretiminin azalmasına ve aşırı adaptif immün yanıtın engellenebilir. Antiinflamatuvar etkili M2 makrofajlarında bulunan arjinaz enzimi iNOS ile arjinine karşı rekabet ederek, M1 makrofajları için bulunabilir arjinin miktarını azaltmaya katkı da bulunup dolayısıyla üretilen NO konsantrasyonunda azalma ve beraberinde sepsiste bozulmuş endotel disfonksiyonu gelişir. Normal immün yanıtta, M1 makrofajları hücre içi arjinin de novo sentez kapasitesi ile iNOS aracılı NO sentezinin devamlılığını sağlamaktadır.

Arjinaz kaynaklı arjinin tükenmesi T hücrelerinin indüksiyon, çoğalma, farklılaşma gibi hücre fonksiyonlarını bozarak immün sistemi baskılar (Wijnands ve diğerleri, 2015).



Şekil 3. Sepsis ve inflamatuvar durumlarda arjinin-NO metabolizmasındaki patofizyoloji (Kirkebøen ve diğerleri, 1999).

2.3.5.4.1. Sepsis ve İnflamatuvar Durumlarda NO Etkileri

NO protein ve membran fosfolipid yapılarının değişimi, nükleer hasar, mitekondriyal solunumun inhibisyonu gibi çeşitli toksik etkilerle hücreye zarar vermektedir. NO'nun hücreler üzerindeki invivo toksik etkileri, NO'nun süperoksit ile reaksiyona girmesiyle oluşan peroksinitritin oluşumuyla artmaktadır. Bu bağlamda sepsiste çoklu organ disfonksiyonu oluşmasının altındaki mekanizma NO veya peroksinitritin hücresel etkilerinden kaynaklanıyor olabilir. NO bu zararlı etkilerinin yanında serbest oksijen radikallerinin sentezini önleyerek sitoprotektif etki de göstermektedir (Vincent ve diğerleri, 2000).

NO endotel fonksiyonu, trombosit fonksiyonu, miyokardiyal fonksiyon, hepato-splanik renal vaskularizasyon üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Sepsis esnasında NO'nun endotel fonksiyonu üzerindeki etkilerine bakılacak olunursa, endotoksin, TNF indüksiyonunuyla ve eNOS'un aktivasyonu yoluyla vazodilatasyon ve vazokonstriktörlere karşı vasküler hiporeaktiviteyi sağlar. Böylelikle hem hayati organlara giden kan akımını arttırmış olur hem de hipertansiyonun zararlı etkilerinden korunmuş olunur. NO salınımının farmakolojik inhibisyonu ya da iNOS gen eksikliğinin olması vazodilatasyonu engeller (Vincent ve diğerleri, 2000).

NO'nun miyokardiyal fonksiyon üzerindeki etkileri direkt ya da indirekt yoldan olabilmektedir. Sepsis esnasında endotoksin veya sitokinlerin indüksiyonuyla miyokardiyal iNOS aktive olur ve NO üretilir. NO'nun miyokard fonksiyonu üzerinde negatif inotropik etkisi bulunmaktadır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda NO'nun miyokard fonksiyonu üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda NOS inhibitörlerinin miyokardiyum üzerinde bir etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Bu durumu muhtemelen endotoksemi modeli olarak seçilen hayvan türü, NOS inhibitörünün uygulama dozu, endotokseminin uygulanma dozu ve yolu, tedaviye başlama zamanı gibi faktörler etkilemektedir (Decking ve diğerleri, 1995; Toth ve diğerleri, 1997). Birçok çalışmalarda ise tam tersi düşük ya da orta dozda uygulanan NOS inhibitörlerinin miyokardiyal kontraktileti sağladığı; ancak yüksek dozlarda uygulandığında ise miyokardiyal kontraktileti bozduğu düşünülmektedir (Panas ve diğerleri, 1998).

Endotoksin, karaciğer ve ince bağırsak hücrelerinde iNOS'u indükleyerek bağırsak epitel geçirgenliğini artırır. Bakteriyel translokasyon, karaciğer enzimlerinde artışa ve hepato-splanik kan akışında bozulmaya neden olur. Endotoksemi sırasında az miktarda üretilen NO vazokonstriksiyonu, mast hücre aktivasyonunu, nötrofil ve trombosit adhezyonunu, kılcak

damarlarda hiperpermeabiliteyi engelleyerek gastrointestinal sistemi olumlu etkiler. Ancak yüksek miktarlarda üretilen NO seviyeleri gastrointestinal sistemde zararlı etkiler yaratır (Vincent ve diğerleri, 2000).

NO renal kan dolaşımıyla doğrudan ilişkilidir. iNOS endotoksemiye yanıt olarak böbrek mezenjiyal hücreleri tarafından üretilir. Yapılan bazı çalışmalarda NO renal dolaşımı ve böbrek fonksiyonunu bozduğu gösterilmişken bazı çalışmalarda ise atriyal natriüretik peptit artışında kreatin klirensinin ve glomerüler filtrasyon hızının (GFR) iyileştiği gösterilmiştir (Toth ve diğerleri, 1997).

Sepsiste sitokinler cNOS ve iNOS'u aktive ederek trombosit disfonksiyonuna neden olabilmekte; ancak sepsis dışında endotelden salınan NO trombosit adhezyonunu ve kümelenmesini engellemektedir (Vincent ve diğerleri, 2000).

Sepsis dışında akciğerlerde cNOS tarafından düşük seviyelerde NO üretimi pulmoner vasküleritenin korunmasını sağlarken sepsiste vazodilatör etkili NO ile vazokonstriktif etkili endotelin ve tromboksan üretimindeki dengesizlik, pulmoner vazokonstriksiyon ve sonucunda pulmoner hipertansiyona neden olabilir. Sistemik NO antogonisti kullanımı, pulmoner hipertansiyonu daha da kötüleştirebilmektedir (Vincent ve diğerleri, 2000).

NO'nun diyaframa olan etkileri karmaşıktır. Bazı çalışmalar endotoksemi ile aktive olan iNOS'un, bozulmuş diyafram fonksiyonuna yol açtığını desteklerken bazı çalışmalarda ise diyafram kontraksiyonuna olumlu etkileri olduğu düşünülmektedir (Boczkowski ve diğerleri, 1996; Comtois ve diğerleri, 1999).

NO'nun immün savunma üzerine çok çeşitli ve olumlu etkisi bulunmaktadır. Hücre içi bakteriler de dahil, bakterilere karşı mikrobisidal, bakteriyel komponentlere yanıt olarak sitokin üretimi, endotoksin varlığında nötrofillerde TNF- α salınımı etkileri vardır. Sepsis esnasında endotel aktivasyonunu, lökosit adhezyonunu sağlayarak ve mikrovasküler geçirgenliği sınırlayarak antiinflamatuvar etki gösterir (Vincent ve diğerleri, 2000).

2.3.5.4.2. Arjinin ve Sitrülin Taşıma Sistemlerindeki Değişiklikler

Sepsiste, immün savunma sisteminin bir parçası olarak artan sitokin fırtınasına karşılık ve LPS'ye yönelik CAT-1 taşıyıcısı aşağı, CAT-2 taşıyıcıları ise yukarı düzenlenir. CAT-2 taşıyıcısı makrofajlara, arjinin taşınmasını sağlamakta ve iNOS aracılı NO üretimini sağlamak

amaçlı, ekstraselüller arjinin ihtiva etmektedir. Sepsis esnasında makrofajlarda CAT-2, iNOS ile beraber indüklenir böylelikle NO üretimi için gerekli arjinin bulunabilirliği eNOS yerine iNOS'un indüklenmesi ile sağlanmış olur, bu da patojenleri yok etmek için artan NO üretimiyle sonuçlanır (Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.4.3. Arjinin de NOVO Sentezinin Azalması

Sepsis, endotoksemi ve inflamatuvar durumlarda azalan arjinin bulunabilirliği yanında sitrülün bulunabilirliği ve biyoyararlanımı da azalmaktadır. Sitrülünün azalmış bulunabilirliği de novo sentezinin azalmasının bir nedenidir. Azalmış sitrülün düzeyleri NO üretiminde de azalmayla sonuçlanır. Sepsis esnasında azalan sitrülün düzeyleri yüksek mortalite ile ilişkilendirilebilir. Yapılan çalışmalara bakıldığında endotoksemi esnasında sitrülün takviyesinin yapılması dokularda NO üretiminin artışına yol açmıştır (Wijnands ve diğerleri, 2012b)

Sepsis esnasında, sitrülün konsantrasyonlarındaki azalmanın sebepleri; düşük diyet alımı, bağırsak yetmezliğiyle beraber enterositlerde glutamin sentezinin azalması, bağırsak villuslarında kan sirkülasyonunun bozulması sonucunda sitrülün, arjinin, glutamin emiliminin bozulması, glutaminden sitrülün türetilmesinin bozulması gibi durumları içermektedir. Buna karşın protein alımının azaldığı ve protein katabolizmasının yoğun olduğu sepsiste azalan sitrülün düzeylerini gidermeye yönelik ornitin transkarbamilaz (OTC) ornitini sitrülüne dönüştürür ve böbreklerde arjinin de novo sentezinde substrat olarak kullanılması adına karaciğerde serbest bırakılır. OTC enziminin yanında protein sentezi ve üreagenesinin azaltılması, sitrülün-arjinin metabolizmasının sürdürülmesinde rol oynar (Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.4.4. Arjinaz Aktivitesinin Artışı

Sepsiste belirli sitokinler, makrofaj ve nötrofilleri indükleyerek bu savunma hücrelerinde arjinaz-I ve arjinaz-II enzim aktivitesinin artışı şekillenir. Arjinaz-I aktivitesi, yardımcı T-II hücreleri tarafından IL-4, IL-10, IL-13 sitokinlerin üretilmesi ile indüklenir (Wijnands ve diğerleri, 2015).

Sepsis ve endotoksemide arjinaz-I'in aktivasyonu farklı zamanlarda gerçekleşir. LPS indüklenen farelerde, LPS enjeksiyonu öncesinde düşük konsantrasyonlarda bulunan arjinaz-I, LPS enjeksiyonundan 12 saat sonra aktive edilen peritoneal makrofajlardaki arjinaz-I'in konsantrasyonlarında yükselme görülmüş ve 36 saat sonrasında pik yapmıştır. Bunun aksine arjinaz-II ise LPS stimülasyonundan 3 saat sonrasında konsantrasyonda artış görülmüş ve 6 saat sonrasında ise pik noktaya ulaşarak sonrasında azalma meydana gelmiştir (Salimuddin ve diğerleri, 1999)

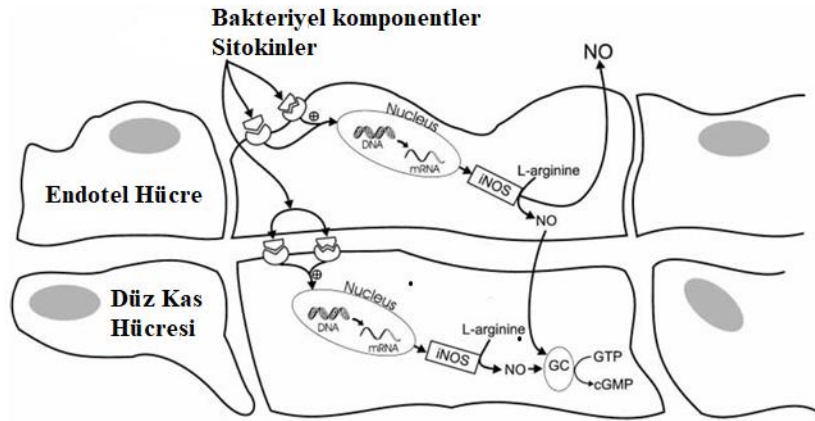
Sepsiste arjinaz-I aktivitesi geç başlayabilmektedir, ve arjinaz-I, iNOS ile arjinin için rekabet ederek iNOS kaynaklı aşırı NO üretimi engellenir. Salimuddin ve diğerleri, (1999)'nin yaptığı çalışmaya da bakılacak olunursa iNOS ve arjinaz-I'in konsantrasyonlarının pik yaptığı zaman noktaları birbirinden farklıdır, iNOS aktivasyonu LPS indüksiyonundan 20 dakika, 4-6 saat ve 12 saat sonra, arjinaz-I aktivasyonu ise 12-36 saat sonrasında gerçekleşmiştir. Sepsiste apoptoz ve fagositoz durumunda arjinaz içeren nötrofiller hücre dışına arjinaz salarak, NO sentezi için gerekli olan arjinin bulunabilirliği azalmaktadır.

Endotel hücrelerinde arjinaz-I ve arjinaz-II beraber bulunmaktadır. İnflamatuvar durumlarda iNOS ile arjinine karşı rekabet ederek iNOS kaynaklı NO üretiminin azalmasına ve dolayısıyla endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır (Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.4.5. iNOS İndüksiyonu

Sepsis ya da endotokseminin başlangıç periyotlarında NO sentezinde ciddi bir artış görülür. LPS, IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- γ , IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinler iNOS'u indükleyerek NO sentezini arttırırken, antiinflamatuvar etkili IL-4, IL-8, IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β -1, TGF- β -2, TGF- β -3 sitokinleri iNOS indüksiyonunu azaltabilir. Sepsis varlığında iNOS hemen hemen her hücrede indüklenebilir. Özellikle başta makrofajlar olmak üzere aort düz kas hücresi, vasküler düz kas hücresi, hepatositler, paneth hücreleri, enterositler gibi farklı doku ve hücre tiplerinde sitokin aracılığıyla indüklenebilir.(Kirkebøen ve diğerleri, 1999; Wijnands ve diğerleri, 2015)

iNOS'un aktivasyonu için belirli zamana ihtiyaç duyulur. IFN- γ ve LPS'nin makrofajları aktivasyona geçirmesinden 2 saat sonra makrofajlarda iNOS haberci ribonükleik asit (mRNA) ve iNOS proteini bulunur ve birkaç gün boyunca makrofajlarda varlığını korurlar.(Kirkebøen ve diğerleri, 1999; Wijnands ve diğerleri, 2015)



Şekil 4. Sepsis/endotoksemi sırasında iNOS'un indüksiyonu (Kirkeb en ve diğerleri, 1999).

2.3.5.4.6. Arjinosüksinat Sentaz (ASS)

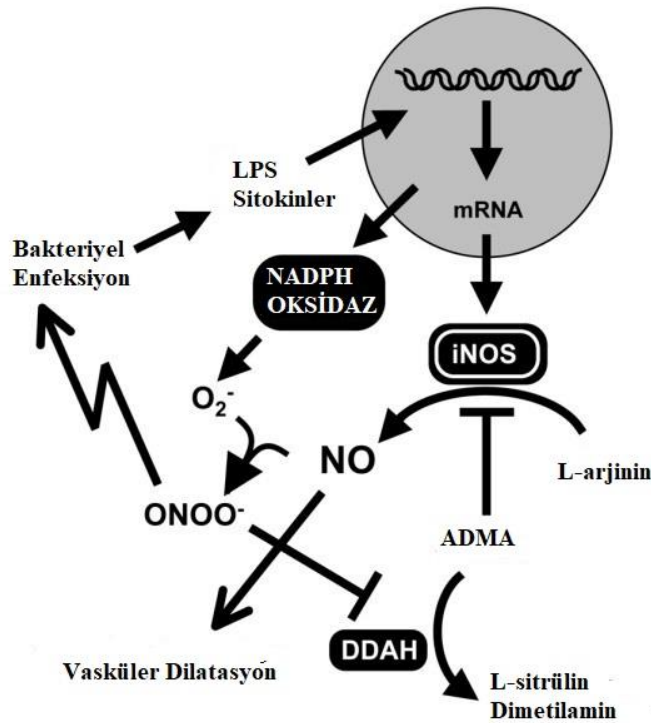
Sepsis esnasında makrofajlarda ve endotelial hücrelerde ASS ekspresyonunda artış meydana gelir. Bu bağlamda iNOS kaynaklı NO sentezi için arjinin de novo sentezinin modüle olur. Sepsisin başlangıç döneminde hücre dışı arjinin miktarı yeterliyken, makrofajlar üretilen sitr lini hücre dışına, plazmaya salarlar ve böylelikle sitr linin hücre içi rejenarasyonu yalnızca arjinin bulunabilirliği azalmışken önemli hale gelir. Sepsis ya da endotoksemide olduğu gibi arjinin bulunabilirliği azaldığı noktada makrofajlardaki iNOS aracılı NO sentezinin devamlılığı açısından sitrülin alımı gerçekleşir. Makrofajlarda hücre içi sitrülin birikimi arttığında arjinin de novo sentezi de beraberinde artış göstererek aşırı NO sentezi ile sonuçlanacaktır. Bu yüzden sitr linin plazmaya ihraç edilmesi, makrofajlarda sentezlenen NO miktarını düzenlemektedir (Wijnands ve diğerleri, 2015)

ASS'nin, arjinin de novo sentezindeki etkisinin dışında doğuştan gelen ba ışıklıkta da önemli etkileri bulunmaktadır. ASS, LPS'nin aktif kısmına yani lipid A'ya ba lanarak LPS'nin inaktive olmasını sağlamaktadır. Bununla beraber karaciğerden dolaşıma salınan ASS, hücre dışı LPS kaynaklı sitotoksiteyi nötralize etmektedir (Wijnands ve diğerleri, 2015).

2.3.5.4.7. Asimetrik dimetilarjinin (ADMA)

Sepsis ve endotoksemide konak savunmasını sağlama ve vasküler tonusu düzenlemek amaçlı iNOS aracılığıyla yüksek miktarda NO üretildiğinden bahsedilmiştir. NO'nun yukarı düzenlenmesi patojeni yok ederken, aşırı vazodilatasyonla beraber vasküler direnci düşürerek hipotansiyona yol açabilmektedir. Asimetrik dimetilarjinin (ADMA), NO sentezinin düzenlenmesi ve dolayısıyla vasküler tonusu sağlamak amacıyla NO sentaza karşı endojen inhibitördür. ADMA özellikle sepsisten muzdarip yoğun bakım hastalarında mortalite göstergesi ve kardiyovasküler risk faktörü olarak tanımlanmıştır. ADMA, NO'nun düzenleyicisi olarak hipotansiyonu engellerken aynı zamanda NO'nun sağladığı konak savunmasını da bozabilmektedir. Yapılan çalışmalarda N G- monometil-L-arjinin'nin seçici olmayan NO sentaz inhibitörü olmasından kaynaklı ve birçok ölümün görülmesiyle ilişkili, N G- monometil-L-arjinin ve L-arjinin yapısal anaoloğu olan ADMA'nın, NO sentaz inhibitörü olarak değerlendirilmesinin daha doğru olacağı belirlenmiştir (Care, 2006).

iNOS'un yukarı regülasyonu sonucu oluşan NO, peroksinitrit oluşturarak ve proteinleri nitrolize ederek dokulara zarar vermektedir. DDAH II'nın S-nitrozilasyonunun iNOS aktivitesini aşağı regüle ederek ADMA birikimine yol açar (Care, 2006).



Şekil 5. iNOS ve ADMA tarafından NO üretiminin ve sepsis patofizyolojisinin potansiyel ilişkisi (Care, 2006).

2.3.5.5. Amonyak

Sepsis, enfeksiyonlara karşı ortaya çıkan sistematik ve düzensiz bir inflamatuvar yanıt ile karakterize olup, birden fazla organın işlev bozukluğuna yol açan, hayati tehlike içeren bir klinik durumdur. Bu süreçte meydana gelen yaygın inflamasyon, kan akışı sorunları, dokuya yeterli kan ulaşamaması ve mikrosirkülasyon problemleri gibi birçok fizyolojik sistemi etkileyerek metabolik bozulmayı hızlandırmaktadır. Özellikle karaciğer fonksiyonlarındaki bozulmalar ve azot metabolizmasındaki değişiklikler nedeniyle amonyak metabolizması üzerinde önemli etkiler meydana gelir (Dalsania ve diğerleri, 2021).

Sepsiste L-arjinin metabolizması ve nitrik oksit (NO) sentezi önemli bir işlev üstlenir. L-arjinin, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri yardımıyla NO ve sitrulinin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Bu enzimlerden özellikle iNOS, sepsis sürecinde proinflamatuvar sitokinler tarafından tetiklenerek fazla NO üretimine neden olur. Hayır, başlangıçta kan damarlarını genişleten etkisiyle mikrosirkülasyonun düzenlenmesine yardımcı olsa da, aşırı üretimi mitokondriyal işlevleri olumsuz etkileyebilir, hücre solunumu bozabilir ve ürede amonyak dönüşümünü engelleyebilir. Bu durum, kan dolaşımındaki amonyak miktarlarının yükselmesine yol açar. Bununla birlikte, L-arjinin arjinaz enzimi sayesinde ornitin ve üreye dönüştürülmektedir. Bu yol etkinleştğinde hem NO üretimi azalır hem de üre üretimi artar; bu durum, sistemik amonyak yükünü artırma potansiyeline sahiptir (Wang ve diğerleri, 2023).

Sepsise bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer işlev bozukluğu, amonyak temizleme yeteneğinin azalmasında önemli bir etki gösterir. Sepsiste, karaciğerde meydana gelen düşük kan akışı, hepatik mitokondriyal işlev bozukluğu ve sitokin kaynaklı hücre zarar, periportal hepatositlerdeki üre döngüsünü olumsuz etkiler. Normal koşullar altında, portal sistemden gelen amonyak, üre haline dönüştürülerek vücuttan atılmaktadır; ancak bu mekanizma yeterince etkin çalışmadığında amonyak, perivenöz hepatositlerde glutamin sentetaz enzimi aracılığıyla glutamine dönüştürülerek alternatif bir detoksifikasyon yoluna girer. Fakat bu işlem, glutamin düzeylerini artırarak beyin dokusunda ikincil toksisiteye neden olabilmektedir (Dalsania ve diğerleri, 2021).

Sepsis sürecinde meydana gelen katabolik artış ve sindirim sistemi bariyerinin bozulması, dış kaynaklı amonyak üretimini yükseltmektedir. Bağırsak mikrobiyotasındaki üreaz aktivitesi yüksek olan bakterilerin etkisiyle azotlu bileşiklerden amonyak oluşur ve bu durum sistemik

yükü daha da artırır. Ayrıca sepsiste bağırsak mukozasında yaşanan geçirgenlik artışı nedeniyle bu toksinler sistemik dolaşıma daha hızlı geçiş yapabilir (Dalsania ve diğerleri, 2021).

Hiperamonyeminin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri, sepsisle ilgili ensefalopati (SAE) oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Amonyak, kan-beyin bariyerini pasif difüzyon veya taşıyıcı proteinler yoluyla aşabilir ve nöronlarda nörotransmitter üretimini engelleyerek sinaptik iletişimi olumsuz yönde etkiler. Astrositler, beyinde amonyak toksinlerini temizleyen temel hücrelerdir; glutamin sentetaz enzimi yardımıyla amonyağı glutamin haline getirirler. Ancak aşırı amonyak birikimi durumunda bu süreç hastalıklı bir duruma dönüşür. Artan glutamin, mitokondrideki glutaminin parçalanması yoluyla amonyak ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini stimüle eder. ROS, mitokondrinin işlev bozukluğunun artmasına, iltihaplanma tepkisinin yükselmesine ve hücresel zararın daha da kötüleşmesine yol açar. Bununla birlikte, glutaminin osmotik etkileri, astrositlerde su birikmesine sebep olarak hücrelerin şişmesine, beyin ödeme ve serebral otonöregülasyonun bozulmasına yol açmaktadır. Bu durum; beyin dokusunda laktat birikimi, apoptoz, sitokin salınımı ve bilinç düzeyinde değişiklikler gibi ensefalopati belirtilerinin ortaya çıkmasını sağlar (Dalsania ve diğerleri, 2021).

Sepsiste ortaya çıkan yaygın iltihap, karaciğer işlev bozuklukları, mikrosirkülasyon sorunları ve mitokondriyal eksiklikler, amonyak metabolizmasını önemli ölçüde etkiler. Hiperamonyemi, sadece siroz gibi uzun süreli karaciğer hastalıklarıyla sınırlı bir durum değildir; ayrıca sepsis gibi ani ve yaygın hastalıklarda da ortaya çıkabilmektedir (Dalsania ve diğerleri, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Bu deneysel araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.08.2023 tarih ve 64583101/2023/121 sayılı izniyle yapılmıştır. Ayrıca, TÜBİTAK tarafından 1200638 proje numarası ile desteklenen projenin bir bölümü kapsamında gerçekleştirildi.

Çalışmada hayvan materyalini, altı adet 1–4 haftalık yaşta Holstein ırkı buzağı oluşturmıştır. Hayvanlar, Aydın ilinde hastalıktan arı işletme belgesi bulunan bir çiftlikten temin edildi. Buzağılar, çalışmaya alınmadan önce klinik muayeneden geçirilmiş ve hematolojik, biyokimyasal ve hızlı test kitleri ile dışkı analizleri yapıldı. Yalnızca sağlıklı olduğu belirlenen buzağılar araştırmaya dahil edildi.

Buzağılar, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde, hastane bölümünden ayrı olarak, çalışmaya özel hazırlanan bir odada hospitalize edildi. Her biri en fazla iki hayvan olacak şekilde bireysel kulübelerde barındırıldı. Altlık olarak saman kullanıldı, altlıklar gün aşırı değiştirildi ve yeni hayvanlarla çalışılacağı zaman odanın dezenfeksiyonu sağlandı. Çalışma öncesinde, sırasında ve sonrasında, buzağılara sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliğindeki sağlıklı ineklerden sağlanan süt (her öğünde iki litre, buzağı biberonlarıyla) verildi. Ayrıca, su, kuru ot ve buzağı ikame yemi ad libitum olarak sunuldu.

Araştırmaya başlamadan önce, buzağılar beş gün boyunca ortama uyum sağlamaları amacıyla gözlemlendi, her gün klinik ve hematolojik muayeneleri yapıldı. Muayeneler sonucunda sağlıklı olduğu tespit edilen buzağılar çalışmaya dahil edildi.



Resim 1. Buzağların klinik muayenesi.



Resim 2. Çalışmada kullanılan sağlıklı buzağlar.

3.2. Klinik Muayene

Klinik muayene araştırma öncesinde ve sonrasında günde iki defa olacak şekilde, araştırma süresince ise yeni bir örnekleme yapıldığında tekrarlandı. Klinik Muayene kapsamında solunum frekansı (nefes/dakika), kalp frekansı (atım/dakika), kapiller dolum zamanı, vücut sıcaklığı, mukoz membranların rengi, göz küresinin orbita çukurluğundaki konumu, ayağa kalkabilme durumu, vücudun tutuluşu, mental refleks, emme refleksi, dışkı karakteri değerlendirilerek klinik skorlama gerçekleştirildi. Kan basıncı, oksijen satürasyonu, solunum ve kalp frekansı Mindray Umec12 Vet (Shenzen, Çin) hasta başı monitörüyle takibi yapıldı.



Resim 3. Mindray uMEC12 Vet hasta başı monitörizasyonu.



NEONATAL BUZAĞILARDA İNTRAVENÖZ VE ORAL SİTRULİN UYGULAMALARININ
FARMAKOKİNETİĞİ VE DENEYSEL ENDOTOKSEMİDE ETKİNLİĞİ

Klinik Muayene Formu

Tarih:
Grup:
Buzağı:
Örnek alınan saat:

T:	P:	R:	KDZ:
----	----	----	------

Klinik Skorlama

Klinik skor	Solunum	Mukoz membranlar	İştah-emme refleksi	Mental refleksi	Ayağa kalkabilme durumu	Dışkı karakteri
5	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Hızlı	Hiperemik	Hafif iştahlı	Hafif refleks kaybı	Ayakta, hafif sallantılı	Saatte 2-3 defa dışkılama
3	Abdominal	Kirli hiperemik	İştah yok	Belirgin refleks kaybı	Ayakta güç durabilme	Hafif yumuşak
2	Şiddetli abdominal	Siyanotik	Zayıf emme refleksi	Hafif bilinç kaybı	Ayağa kalkamıyor	Hafif ishal
1	Dispne	Şiddetli, siyanoz, kuru	Emme refleksi yok	Bilinç kaybı	Baş önde veya yanda	İshal, pis kokulu dışkı
0	Asfeksi, ölüm	Şok, ölüm	İlgisiz	Şok, ölüm	Şok-ölüm	Şiddetli ishal

Koagülasyon Profili

Protombin Zamanı (PT)	Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (APTT)	Fibrinojen

Kan Basıncı

Sistolik	Diastolik

Amonyak konsantrasyonu

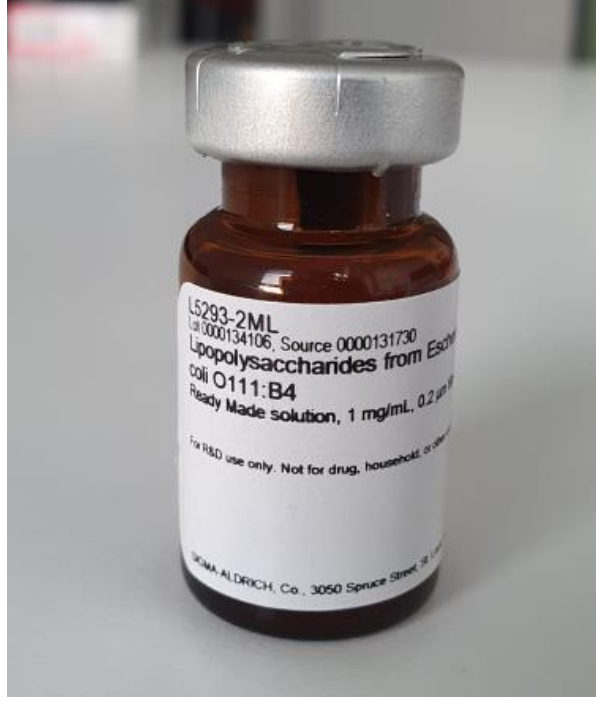
NOTLAR:

Resim 4. Klinik muayene formu.

3.3. Endotoksemi Oluşturulması

Deneysel endotoksemiye indüklemek amacıyla ticari saflaştırılmış toz formda referans LPS (*E. coli* 0111:B4; L5293 2ml, Sigma) intravenöz kullanıma uygun olarak hazır çözelti halinde temin edildi. Ticari saflaştırılmış toz formda referans LPS, 1 µg/kg dozda, 100 ml %0,9

NaCl izotonik solüsyonda çözelti oluşturulacak şekilde hazırlanarak 5 dakika süresince yavaş intravenöz infüzyon olarak tek uygulama şeklinde verildi. Endotoksinin uygulama yolu ve süresi (Yılmaz ve diğerleri, 2013), dozu (Carroll ve diğerleri, 2009), suşu (Plessers ve diğerleri, 2015) daha önce buzağılarda yapılan deneysel endotoksemi çalışmaları dikkate alınarak gerçekleştirildi.



Resim 5. Ticari saflaştırılmış toz formda standart referans LPS (*E.coli* O11:B4; sigma).

3.4. Örnek Alımı ve Saklama

Kan örnekleri vena jugularisten, serum ve antikoagülanlı (EDTA (Etilendiamintetraasetik Asit), Heparin) tüplere totalde 10 ml olacak şekilde alındı. Örnekler hiç bekletilmeden 3000 rpm’de 10 dakika Hettich, Universal 16A (Kirchlengern, Almanya) santrifüj cihazıyla santrifüj edilerek serum ve plazma kısımları ayrıldı ve 0,5 µL olacak şekilde eppendorflara alınarak analizi yapılacağı güne kadar (en fazla 6 ay) -40 °C Bosch derin dondurucuda saklandı.

Amonyak analizleri, örnek alımından 30 dakika içerisinde değerlendirildi.

Kan örnekleri buzağılardan LPS uygulama öncesi 0, saat ve LPS sonrasındaki 0.5., 1., 2., 4., 8., 12., 24., 48., saatlerde alındı.

3.5. Analizlerin Gerçekleştirilmesi

Amonyak analizi kolorimetrik temele dayalı mikro difüzyon yöntemi ile EDTA'lı kan örneklerinden hasta başı monitörizasyon cihazında (Pocketchem BA, Arkray, Japonya) gerçekleştirildi (Gultekin ve diğerleri, 2019).

Nitrik oksit sentez kapasitesi ile yakından ilişkili asimetrik dimetilarjinin (ADMA) düzeyi ve arjinaz-I, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktiviteleri sığır spesifik ticari test kitleri (Bioassay Technology Laboratory, Shangai, Çin) kullanılarak ELISA yöntemiyle plazma örneklerinden ölçüldü.



Resim 6. ELISA analizlerinin gerçekleştirilmesi.



Resim 7. İnkübasyon aşamasında kullanılan inkübatör.



Resim 8. ELISA plakalarının okuma aşamasında kullanılan okuyucu.

3.5.1. İstatiksel Analizler

Araştırma başlangıcındaki kontrol (0. Saat) verileri ve LPS infüzyonu uygulamasını takiben sekiz farklı zaman diliminde (0.5., 1., 2., 4., 8., 12., 24., 48.) elde edilen verilerin istatistiksel analizi için IBM SPSS 22.0 (New York, Amerika Birleşik Devletleri) programından yararlanıldı. Elde edilen verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilerek verilerin normal dağılmadığı belirlendi. Normal dağılım göstermediği belirlenen verilerin karşılaştırılması nonparametrik test metotlarından olan Friedman's Two-Way Anova testi ile gerçekleştirildi. Analizlerin tamamında $p < 0.05$ değeri istatistiksel bağlamda anlamlı kabul edildi. Elde edilen verilerin ortalama değer $\pm$ standart hata ve minimum-maksimum değerleri tablo olarak verildi. Veriler Microsoft 365 Excel (Washington, Amerika Birleşik Devletleri) programından yararlanılarak grafik halinde sunuldu.

4. BULGULAR

Endotoksemi oluşturulan neonatal buzağılarda, klinik değerlendirme formuna dayalı olarak gerçekleştirilen izlem sonuçlarında, LPS uygulamasını takiben klinik bulgularda zaman içinde değişiklikler saptandı. Uygulama öncesinde, tüm buzağılarda solunum, mukoz membran rengi, emme refleksi, zihinsel durum, ayakta durabilme yeteneği ve dışkı özellikleri gibi parametreler normal sınırlar içinde bulundu ve toplam klinik skorlar maksimum değere (5) yakın olarak kaydedildi.

LPS uygulamasından sonra özellikle ilk 1–4 saat içinde klinik skorların azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi. Bu süreçte bazı buzağılarda hızlı ve abdominal solunum, hiperemik veya kirli-hiperemik mukoz membranlar, iştahsızlık ve zayıf emme refleksi, hafif bilinç kaybı, ayakta durmada güçlük ve yumuşak dışkı gibi belirtiler gözlemlendi. Bu bulgular doğrultusunda klinik skorlar 3 ile 4 arasında değişiklik gösterdi ve sistemik inflamasyonun klinik belirtileri gözlemlendi.

LPS uygulaması sonrasındaki 8. saatten itibaren klinik tablonun şiddetinde hafifleme, 48. saatte ise başlangıçtaki (0. saat) benzer klinik tablo gözlemlendi.

Buzağılardan 0. (sağlıklı) ve LPS uygulaması sonrasındaki 0,5., 1., 2., 4., 8., 12., 24., 48. zaman dilimlerinde alınan kan örnekleri ile gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilmiş olan NO, ADMA, amonyak, arjinaz-I, eNOS, iNOS ortalama değerleri başlıklar halinde sunuldu.

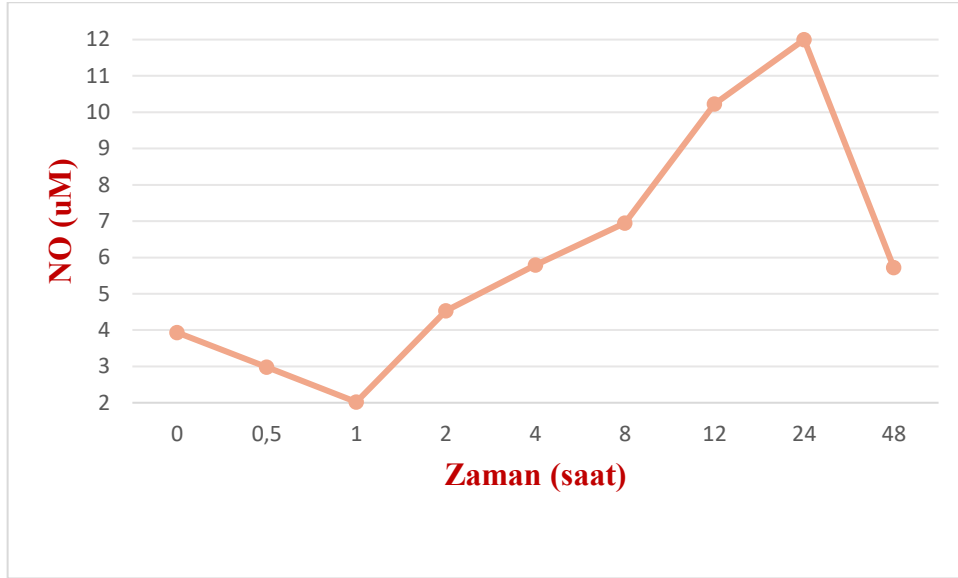
4.1. Nitrik Oksit (NO)

Ortalama NO değerine ait çizgi grafiği Şekil 6 ‘da sunulurken; aynı zamanda ortalama NO değerinin saatlere göre değişimi Tablo 7’de sunuldu.

Buzağıkların ortalama NO değeri başlangıca göre (0. saat), 12. ve 24. saatlerde anlamlı olarak arttığı görüldü (Tablo 7).

LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama NO düzeyinde başlangıç değerine (0. saat) göre 30. dakikadan itibaren başlayan azalış 1. saatte en düşük seviyeye ulaştı ve ardından

artışa geçerek 24. saatte en yüksek seviyeye ulaşarak devam etti, sonrasında kademeli bir azalış eğilimi göstererek 48. saatte dahi başlangıç değerine kıyasla yüksek kaldığı tespit edildi (Şekil 6).

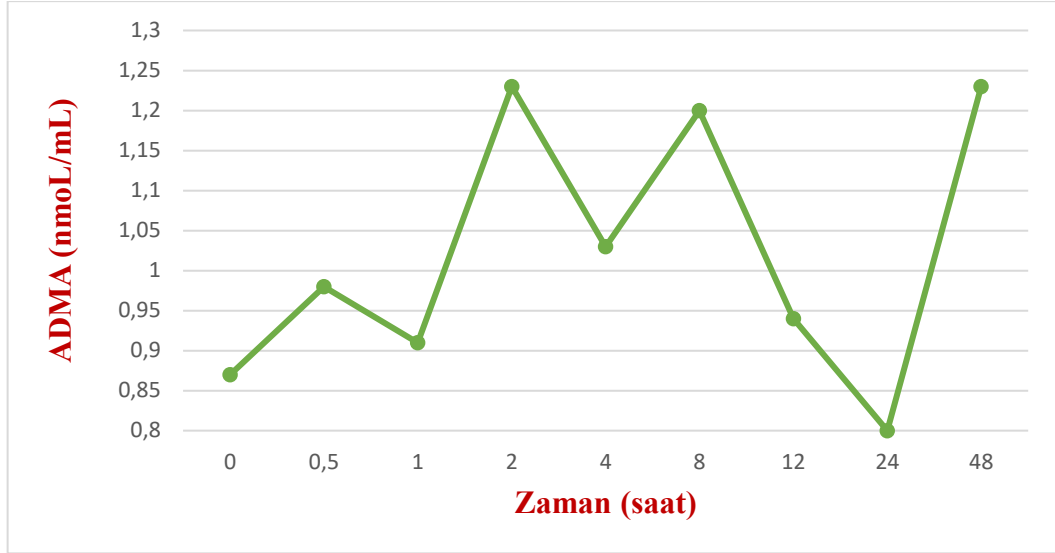


Şekil 6. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama NO değerinin zamana göre değişimi.

4.2. Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA)

Ortalama ADMA değerine ait çizgi grafiği Şekil 7 'de sunulurken; aynı zamanda ortalama ADMA değerinin saatlere göre değişimi Tablo 7'de sunuldu.

LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama ADMA düzeyinde başlangıç değerine (0. saat) göre belirgin artış görülmekle beraber bu artış dalgalı bir seyir izleyerek 8. saate kadar devam etti, 8-24. saatlerde azalışa geçti ve 24. saatten sonra ardından 48. saate kadar doğrusal artış tespit edildi. Ortalama ADMA düzeyi 2. ve 48. saatte aynı iki seviyede pik yaptı.



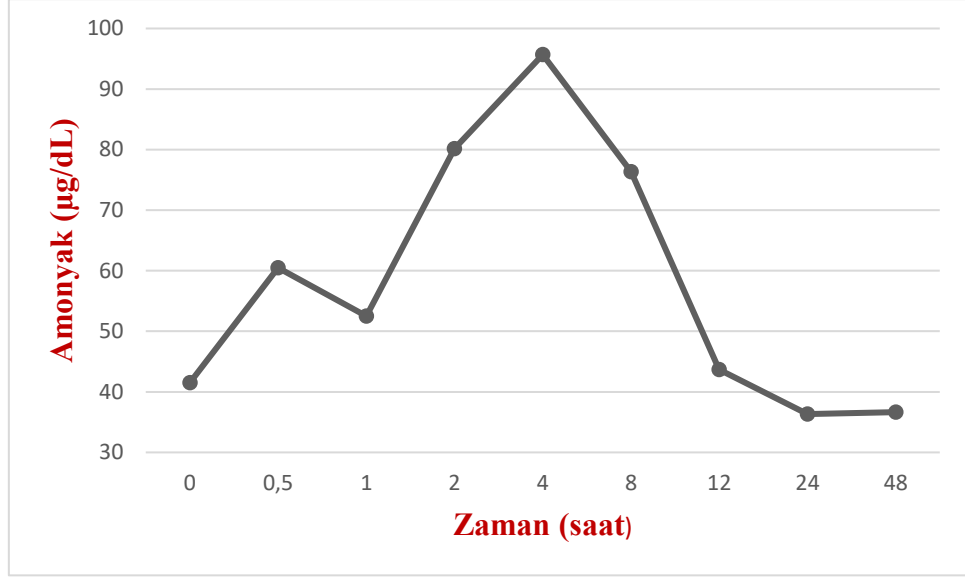
Şekil 7. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama ADMA değerinin zamana göre değişimi.

4.3. Amonyak

Ortalama amonyak değerine ait çizgi grafiği Şekil 8 'de sunulurken; aynı zamanda ortalama amonyak değerinin saatlere göre değişimi Tablo 7'de sunuldu.

Buzağların ortalama amonyak değeri başlangıca göre (0. saat), 2., 4. ve 8. saatlerde anlamlı olarak arttığı görüldü (Tablo 7).

LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama amonyak düzeyinde başlangıç değerine (0. saat) göre başlayan belirgin artış dalgalı bir seyir izleyerek 1.-4. saatler arasında artışla beraber 4. saatte en yüksek değere ulaştı, 4. saatten itibaren başlayan azalış 12. saate kadar devam etti ve 48. saatte çok hafif bir artışla beraber, başlangıç değerine göre düşük seviyelerde olduğu tespit edildi.

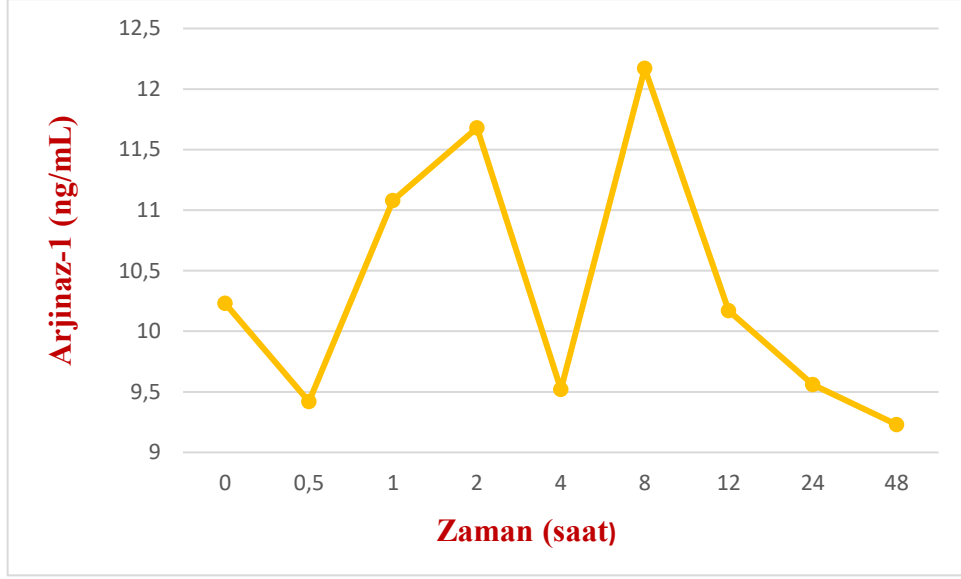


Şekil 8. LPS infüzyonu sonrasındaki ortalama amonyak düzeyinin zamana göre değişimi.

4.4. Arjinaz-I

Ortalama arjinaz-I değerine ait çizgi grafiği Şekil 9 ‘da sunulurken; aynı zamanda ortalama arjinaz-I değerinin saatlere göre değişimi Tablo 7’de sunuldu.

LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama arjinaz-I düzeyinde başlangıç değerine (0. saat) göre 30. dakikaya kadar doğrusal bir azalma eğilimi sonrası 30. dakika ve 8. saat arasında dalgalı bir artış görüldü ve 8. saatte en yüksek değere ulaştıktan sonra 48. saate kadar azalış göstermekle beraber 48. saatte başlangıç değerine göre düşük seviyelerde tespit edildi.

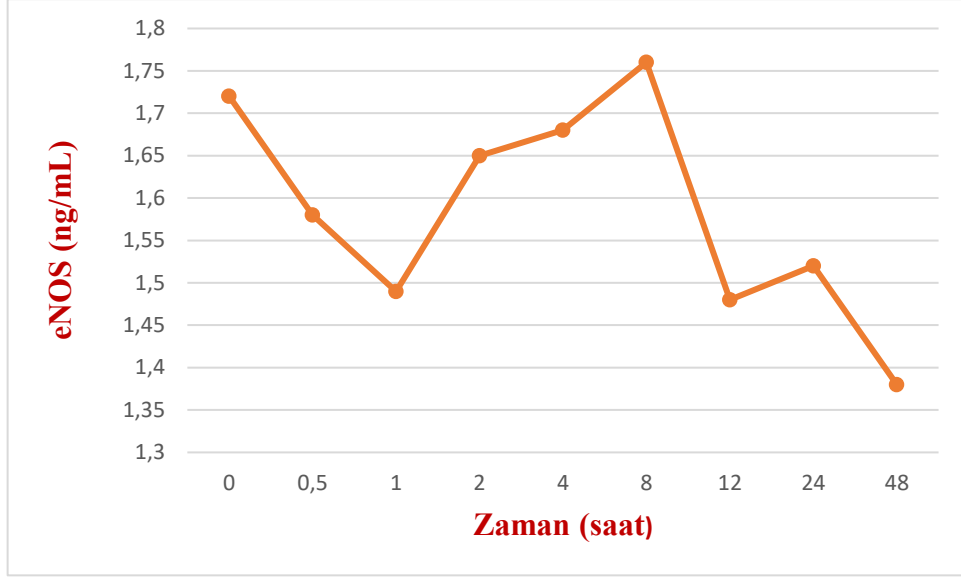


Şekil 9. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama arjinaz-I değerinin zamana göre değişimi.

4.5. Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)

Ortalama eNOS değerine ait çizgi grafiği Şekil 9 ‘da sunulurken; aynı zamanda ortalama eNOS değerinin saatlere göre değişimi Tablo 7’de sunuldu.

LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama eNOS düzeyinde başlangıç değerine (0. saat) göre özellikle 1. saate kadar belirgin azalma eğilimi görüldü, 1. saatten sonra artışa geçerek 8. saatte en yüksek değere ulaştı ve ardından belirgin azalmayla devam edip, 8-24. saatlerde dalgalanma göstermekle beraber 48. saatte başlangıç değerine göre oldukça düşük seviyede tespit edildi.

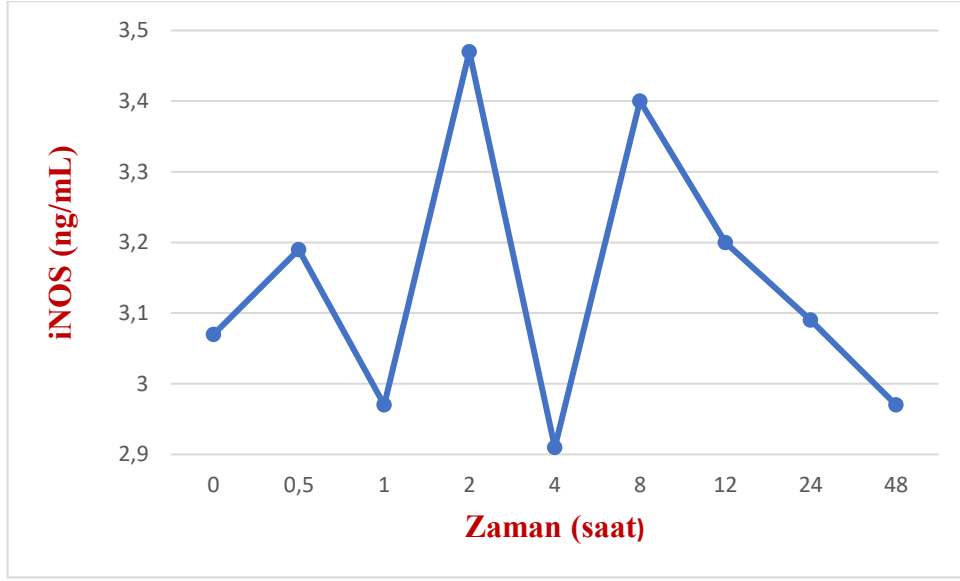


Şekil 10. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama eNOS değerinin zamana göre değişimi.

4.6. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

Ortalama iNOS değerine ait çizgi grafiği Şekil 10 'da sunulurken; aynı zamanda ortalama iNOS değerinin saatlere göre değişimi Tablo 7'de sunuldu.

LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama iNOS düzeyinde başlangıç değerine (0.saat) göre başlayan artış dalgalanma göstererek devam etti ve 2. saatte en yüksek değere ulaştıktan sonra azalışa geçti, 4. saat itibariyle tekrar bir artış göstererek, 8. saatten itibaren azalma eğilimi gösterdi ve 48. saatte başlangıç değerine göre oldukça düşük seviyede tespit edildi.



Şekil 11. LPS infüzyonu uygulama sonrasındaki ortalama iNOS değerinin zamana göre değişimi.

Tablo 7. Endotoksemi oluşturulan buzağların nitrik oksit metabolizmasında zamana göre meydana gelen değişimler.

Parametre	Zaman (saat)								
	0	0,5	1	2	4	8	12	24	48
Nitrik oksit (µM)	3,93±0,77	2,98±0,87	2,02±0,36	4,53±1,65	5,79±3,13	6,95±2,69	10,23±2,82*	12,00±4,33*	5,72±2,21
Amonyak (µg/dL)	41,50±6,0	60,50±15	52,50±11	80,17±15*	95,67±14*	76,33±11*	43,67±5	36,33±4	36,67±5
ADMA (nmol/mL)	0,87±0,05	0,98±0,11	0,91±0,11	1,23±0,16	1,03±0,1	1,20±0,21	0,94±0,11	0,80±0,1	1,23±0,17
Arjinaz-1 (ng/mL)	10,23±0,97	9,42±1,44	11,08±1,85	11,68±1,85	9,52±1,42	12,17±2,28	10,17±1,81	9,56±2,05	9,23±2,42
eNOS (ng/mL)	1,72±0,14	1,58±0,12	1,49±0,15	1,65±0,17	1,68±0,21	1,76±0,21	1,48±0,13	1,52±0,16	1,38±0,3
iNOS (ng/mL)	3,07±0,3	3,19±0,48	2,97±0,38	3,47±0,47	2,91±0,25	3,40±0,58	3,20±0,55	3,09±0,32	2,97±0,23

Her bir parametre özelinde aynı satırda 0. saate göre farklılıklar “*” ile gösterilmiştir (p<0,05).

5. TARTIŞMA

Sepsis, enfeksiyona karşı organizmanın oluşturduğu düzensiz immün yanıt sonucunda akut organ disfonksiyonu ve sıralı organ yetmezliklerinin geliştiği, yüksek mortalite ile seyreden sistemik bir sendromdur (Cecconi ve diğerleri, 2018). İnsanlarda olduğu gibi evcil hayvanlarda da yaygın görülen bu klinik tablo, özellikle neonatal dönemde immün sistemin olgunlaşmamış olması nedeniyle daha şiddetli seyretmektedir. Sepsisin patogeneğinde Gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*), Gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*), mantarlar, parazitler ve virüsler rol oynamaktadır (Chousterman ve diğerleri, 2017). Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS molekülü, dolaşıma geçtikten sonra güçlü bir inflamatuvar yanıt oluşturarak SIRS'ı tetikler ve bu da sıklıkla sepsis, septik şok ve çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanabilir (Lohuis ve diğerleri, 1988). Sepsis fizyopatolojisinin anlaşılması amacıyla, kontrollü koşullarda oluşturulan deneysel endotoksemi modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla intravenöz yolla uygulanan standartlaştırılmış *E. coli* kökenli LPS preparatları, Gram negatif sepsisi taklit eden sistemik bir inflamatuvar yanıt oluşturmakta ve bu sayede akut faz yanıtı, immün modülasyon ve dolaşım bozuklukları gibi sepsise özgü fizyopatolojik süreçler modellenmektedir (Hoffman ve Natanson, 1993; Remick and Ward, 2005; Andreassen ve diğerleri, 2008). Literatürde, özellikle sığırlarda ve neonatal buzağılarda LPS'ye karşı artmış duyarlılık gösterildiği bildirilmiştir (Michaels ve Banks, 1988). Bu tez çalışmasında, 1–4 haftalık yaştaki neonatal Holstein buzağılara intravenöz olarak uygulanan *E. coli* kaynaklı LPS ile deneysel endotoksemi modeli oluşturulmuş ve sepsis sürecinde nitrik oksit metabolizmasına ilişkin bazı parametrelerin zamana bağlı değişimleri değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda, LPS uygulamasını takiben plazma NO düzeylerinde 12. ve 24. saatlerde, amonyak düzeylerinde ise 2., 4. ve 8. saatlerde anlamlı artışlar saptanmıştır. ADMA, iNOS, eNOS ve arjinaz-I düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan dalgalanmalar gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, özellikle NO ve amonyak düzeylerinin sepsis fizyopatolojisinin anlaşılması ve potansiyel biyobelirteçlerin tanımlanması açısından önemli ipuçları sunmaktadır.

NO, vasküler tonusun düzenlenmesi, endotel fonksiyonu, immün yanıtın modülasyonu ve oksijen taşınması gibi homeostatik süreçlerde çok yönlü ve kritik bir rol üstlenmektedir (Moncada ve Higgs, 1993; Kleinbongard ve diğerleri, 2006; Förstermann ve Sessa, 2012). NO,

L-arjininin, NOS enzim ailesi tarafından oksidasyonu ile sentezlenir. Üç ana NOS izoformu tanımlanmıştır: eNOS, nNOS ve iNOS (Förstermann ve Sessa, 2012). eNOS fizyolojik koşullarda damar tonusunun düzenlenmesinde temel rol oynarken, iNOS daha çok inflamatuvar süreçlerde ve özellikle sepsis sırasında immün hücrelerde (makrofajlar, nötrofiller) aktive olur ve büyük miktarda NO üretimi sağlar (Akaike ve Maeda, 2000; Chousterman ve diğerleri, 2017). Sepsis ve endotoksemi süreçlerinde, proinflamatuvar uyaranlar (LPS, TNF- α , IL-1 β gibi) iNOS ekspresyonunu belirgin şekilde artırır. Bu süreçte, NO başlangıçta sitoprotektif ve antimikrobiyal etkiler sağlarken, dolaşımda aşırı artışı durumunda ise patolojik vazodilatasyon, hipotansiyon, mikrosirkülasyon bozukluğu ve nihayetinde organ disfonksiyonuna yol açabilir (Moncada ve Higgs, 1993; Cecconi ve diğerleri, 2018; Chousterman ve diğerleri, 2017). Ayrıca, reaktif nitrojen türlerinin üretimi yoluyla mitokondriyal disfonksiyon ve doku hasarına da katkı sağlayabilmektedir (Vanhoutte ve diğerleri, 2017).

Çalışmamızda, endotoksin uygulamasını takiben plazma NO düzeylerinde 2. saatten itibaren yükselme gözlenmiş; özellikle 12. ve 24. saatlerde bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sepsisin erken evresinde gözlenen bu artış, mevcut literatürle de uyumludur. Brovkovich ve diğerleri (2001) sıçanlarda LPS uygulaması sonrası plazma NO düzeylerinde 2.-5. saatler arasında anlamlı bir yükselme rapor etmişlerdir. Shi ve diğerleri (1993), sepsisli yenidoğan bebeklerde kan NO konsantrasyonlarının sağlıklı kontrollere göre belirgin şekilde yüksek olduğunu bildirmiştir. Benzer olarak Gültekin ve diğerleri (2019), akut ishallerli neonatal buzağılarda plazma NO seviyelerinin sağlıklı buzağılara göre anlamlı olarak arttığını göstermiştir. Abdominal sepsisli hastalarda da kan NO düzeyleri, sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Barthlen ve diğerleri, 1994). Klinik bir çalışmada, sepsis tanısı alan erişkinlerde plazma NO düzeylerinin 1. ve 3. günlerde sepsissiz hastalara göre anlamlı şekilde arttığı ve bu değişikliğin prognoz ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Yu ve diğerleri, 2018). Çalışmamızda, deneysel endotokseminin sonlarına doğru plazma NO düzeyinde gözlenen düşüş, literatürde de vurgulandığı gibi arjinin substrat bulunabilirliğinin azalmasına ve NO üretiminin sınırlandırılmasına bağlı olabilir (Förstermann ve Sessa, 2012). Genel olarak, elde edilen veriler sepsis ve endotoksemi süreçlerinde NO düzeylerinin yükseldiğini ve bu artışın patofizyolojide hem tanı hem de hastalık seyri açısından önemli olabileceğini ortaya koymaktadır.

Gerçekleştirilen çalışmada, vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli bir rolü bulunan eNOS düzeylerinde endotoksin uygulamasını takiben erken dönemde düşüş, ilerleyen saatlerde ise toparlanma eğilimi gözlenmiştir. Ancak, bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. Sepsisin akut evresinde, proinflatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β) ve reaktif oksijen türlerinin etkisiyle eNOS aktivitesinin baskılanabileceği, ilerleyen dönemlerde ise endotel hücrelerinin adaptasyonu sonucu eNOS düzeylerinde toparlanma olabileceği çeşitli kaynaklarda ifade edilmektedir (Förstermann ve Sessa, 2012; Chousterman ve diğerleri, 2017). Hu ve diğerleri (2021) tarafından sepsisli fare modellerinde yapılan çalışmada da, eNOS fosforilasyonunda zaman içinde değişiklikler ve buna bağlı olarak vasküler tonus ve hipotansiyon üzerinde etkiler bildirilmiştir. Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, eNOS düzeylerinde izlenen bu zamana bağlı dalgalanmaların, sepsis sürecinin dinamik doğası ve immün-endotelial etkileşimler ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Sepsis ve diğer inflammatuar durumlarda, patojenlere veya LPS'ye karşı doğal bağışıklık hücrelerinin (özellikle makrofaj ve nötrofillerin) uyarılması ile iNOS ekspresyonu artmaktadır (Akaike ve Maeda, 2000; Förstermann ve Sessa, 2012). iNOS'un yukarı regülasyonu, fagositik hücrelerin antimikrobiyal etkinliğini güçlendirirken; aşırı iNOS aktivitesi, yüksek miktarda NO üretimiyle birlikte patolojik vazodilatasyon ve hipotansiyona yol açabilmektedir (Chousterman ve diğerleri, 2017; Cecconi ve diğerleri, 2018). Jonkam ve diğerleri (2009), sepsisli koyunlarda akciğer iNOS seviyelerinin, plazma NO ve eNOS düzeyleriyle birlikte arttığını bildirmiştir. Benzer şekilde, Tsukahara ve diğerleri (2001) LPS ve TNF- α ile uyarılmış nötrofillerde iNOS mRNA düzeylerinin ve buna bağlı NO üretiminin yükseldiğini göstermiştir. Klinik çalışmalarda da, sepsis sırasında iNOS artışına bağlı NO yükselmeleriyle şiddetli vazodilatasyon ve ölümcül hipotansiyonun ortaya çıkabileceği rapor edilmiştir (Barthlen ve diğerleri, 1994; Yu ve diğerleri, 2018). Diğer yandan, iNOS'un tamamen baskılandığı genetik modellerde sepsis mortalitesinin arttığı da gösterilmiştir (Cobb ve diğerleri, 1999); bu bulgu, iNOS'un bağışıklık yanıtında çok yönlü bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışmada, plazma iNOS düzeylerinde erken dönemde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış ve zamana bağlı dalgalanmalar gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, önceki bulgularla tam olarak örtüşmemektedir. Bunun muhtemel nedenleri arasında deneysel çalışma modelimizin sınırlı örneklem büyüklüğü, uygulanan endotoksin dozunun nispeten düşük tutulması, infüzyon süresinin kısa olması, iNOS ekspresyonunun sistemik dolaşımdan çok karaciğer, akciğer ve böbrek gibi organlarda gerçekleşmesi ve ayrıca IL-10 gibi antiinflammatuar sitokinler veya glukokortikoidlerin iNOS üzerindeki baskılayıcı etkileri yer alabilir (Akaike ve Maeda, 2000; Förstermann ve Sessa, 2012; Chousterman ve diğerleri, 2017).

Asimetrik dimetilarjinin, eNOS'u inhibe ederek endojen bir NOS inhibitörü olarak görev yapar ve bu yolla NO üretimini azaltır. Sepsis ve endotoksemi sırasında ADMA

düzeylerinde gözlenen artış veya azalışlar, NO metabolizması ve vasküler fonksiyonlar üzerinde önemli etkilere sahip olabilir (Lambden ve diğerleri, 2015). Endotokseminin erken döneminde sistemik inflamasyonun ve endotel disfonksiyonunun tetiklediği vasküler homeostaz bozuklukları, ADMA düzeylerinde de değişikliklere yol açabilmektedir. İmmün hücrelerin aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin artışı, oksidatif stresin indüklenmesiyle birlikte, DDAH (dimetilaminohidrolaz) aktivitesinin baskılanmasına ve sonuç olarak ADMA katabolizmasının azalmasına neden olabilmektedir (Lambden ve diğerleri, 2015). Ayrıca, endotoksemi sırasında protein metilasyonundaki artış da ADMA birikimini destekleyen bir diğer mekanizma olarak gösterilmiştir (Nandi ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda, endotokseminin erken evrelerinde NO ve eNOS düzeylerinde düşüş saptanan bazı zaman noktalarında, ADMA seviyelerinde de artış gözlenmiştir. Bu durum, ADMA'nın eNOS üzerinden NO üretimini inhibe etmesi yoluyla hipoperfüzyon, vazokonstriksiyon ve organ fonksiyon bozukluklarına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle neonatal buzağlarda immün sistemin ve endotel fonksiyonlarının tam olarak gelişmemiş olması, ADMA'nın vasküler etkilerini daha belirgin hale getirebilir. Ayrıca, ADMA'nın NOS enzimlerini inhibe etmesi, oksidatif stres yoluyla süperoksit üretimini artırabilir ve bu durum endotelyal disfonksiyonun derinleşmesine yol açabilir (Cepinskas ve diğerleri, 2008).

Aydemir ve diğerleri (2015), sepsis tanısı konulan 31 yenidoğan ve 20 sağlıklı kontrolü içeren prospektif bir çalışmada, sepsis tanısından sonraki ilk 24 saat içinde ölçülen serum ADMA düzeylerinin, sepsisli olgularda ve özellikle septik şok gelişenlerde, kontrollere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ancak, sağ kalanlar ile mortal seyreden olgular arasında serum ADMA düzeylerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır. Benzer şekilde, Winkler ve diğerleri (2018), yoğun bakımda yatan 120 sepsisli hastada ADMA düzeylerinin sağ kalım ve hastalık şiddetiyle ilişkisini incelemiş ve ölen hastalarda medyan plazma ADMA seviyesinin (0,93 $\mu\text{mol/L}$) sağ kalanlara (0,73 $\mu\text{mol/L}$) göre daha yüksek olduğunu, ayrıca ADMA'daki artışın SOFA skoru ve mortaliteyle anlamlı bir ilişki gösterdiğini rapor etmiştir. Bununla birlikte, van Wijk ve diğerleri (2021) tarafından yapılan başka bir çalışmada, sepsissiz enfeksiyon, sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok olmak üzere dört grupta serum ADMA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış; bu nedenle ADMA'nın sepsis tanısında spesifik bir biyobelirteç olarak kullanılamayabileceği, ancak kısa dönem mortalite riskinin değerlendirilmesinde faydalı olabileceği öne sürülmüştür. Zoccali ve diğerleri (2007) ise, akut inflamasyonlu ve sağlıklı bireylerde plazma ADMA düzeyleri arasında anlamlı fark elde edememiş ve ADMA'nın plazma düzeyinin, hücresel düzeydeki inhibitör potansiyelini her

zaman yansıtmayabileceğini belirtmiştir. Çeşitli çalışmalarda elde edilen bu farklılıkların, örneklem büyüklüğü ve kontrol grubu seçimi gibi metodolojik farklılıklardan kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir.

Arjinaz-I, L-arjininin metabolizasyonunda görev alarak üre ve ornitin sentezini katalizler. Bu enzim, L-arjininin nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından kullanılmasında rekabetçi bir rol oynar; yani NOS ve arjinaz-I, aynı substratı paylaşarak birbirlerinin biyolojik etkilerini dolaylı olarak sınırlar. Bu nedenle, endotoksemi ve sepsis gibi durumlarda, proinflatuar sitokinlerin (ör. TNF- α , IL-6) uyarısıyla arjinaz-I ekspresyonunda artış görülebilir. Böyle bir durumda, L-arjininin öncelikli olarak arjinaz-I yolu ile üre ve ornitine metabolize edilmesi, NO sentezinin azalmasına ve dolayısıyla endotel disfonksiyonuna katkı sağlayabilir. Öte yandan, artan üre ve ornitin sentezi, fibroproliferasyon ve doku iyileşmesi süreçlerinde rol oynayabilir (Heuser ve diğerleri, 2024). Arjinaz-I ekspresyonu, endotokseminin farklı evrelerinde farklılık gösterebilmektedir. Salimuddin ve diğerleri (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, farelerde endotoksemi sonrası peritoneal makrofajlarda arjinaz-I düzeylerinin 12. saatten itibaren anlamlı şekilde arttığı ve 36. saatte en yüksek seviyeye ulaştığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Dai ve diğerleri (2022), sepsisli hastalarda nötrofil gen ekspresyonu düzeyinde arjinaz-I artışını bildirmiştir. Bununla birlikte, bizim çalışmamızda endotoksemi uygulamasını takiben plazma arjinaz-I düzeylerinde belirgin bir artış ya da azalma eğiliminden ziyade, zaman içinde dalgalanan bir seyir gözlenmiştir. Arjinaz-I düzeylerinde saptanan bu dalgalanmanın, endotoksin kaynaklı inflammatuar yanıtın dinamik doğasıyla ve neonatal buzağılarda immün sistemin ve endotel fonksiyonlarının tam olarak gelişmemiş olmasıyla ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir. Ayrıca, L-arjininin hem arjinaz-I hem de NOS enzimlerinin ortak substratı olması, arjinaz-I ve NOS arasındaki metabolik rekabetin seyrini zamana ve hücrel duruma bağlı olarak değiştirebilir. Bu bağlamda, sepsis ve endotoksemi süreçlerinde NO biyoyararlanımını hedefleyen olası tedavi yaklaşımlarında zamanlama ve substrat bulunabilirliği gibi faktörlerin göz önünde bulundurulmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Amonyak, proteinlerin yıkımı sonucu oluşan son üründür ve esas olarak karaciğerde üre döngüsü kapsamında detoksifiye edilir. Normal koşullarda karaciğer, amonyağı üreye çevirerek zararsız hale getirir. Ancak sepsis ve inflammatuar süreçlerde, karaciğer fonksiyonunda meydana gelen bozulmalar ve periferik dokularda proteolizin artması sonucu kan amonyak düzeylerinde belirgin artışlar gözlenebilir (Gültekin ve diğerleri, 2019; Wang ve diğerleri, 2023; Gao ve diğerleri, 2020). Çalışmamızda, endotoksemi uygulamasının ardından özellikle 2., 4. ve 8. saatlerde kan amonyak düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar saptanmıştır. Takip eden

saatlerde (12., 24. ve 48. saatler) ise, amonyak seviyelerinde dalgalanma ile birlikte başlangıç değerlerine kıyasla azalma eğilimi görülmüştür. Bu dinamik değişim, endotoksemi süresince amonyak sentez ve eliminasyonu arasındaki dengenin sürekli olarak değişmesinden kaynaklanabilir. Sepsisin erken fazında karaciğer disfonksiyonu nedeniyle üre döngüsünün baskılanması, amonyak klirensini azaltarak sirkülasyonda birikimine neden olur. Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerin etkisiyle NOS enzimlerinin indüksiyonu sonucu artan NO düzeyleri, nitro-oksidatif stres ve hepatik mitokondriyal disfonksiyon oluşturabilir; bu da üre döngüsünü daha da bozarak amonyak seviyelerinin yükselmesine katkı sağlar. Karbamoil fosfat sentetaz-I enzim aktivitesinin NO tarafından inhibe edilmesi de amonyak birikimine yol açan bir diğer mekanizma olarak bildirilmektedir (Cepinskas ve diğerleri, 2008). Arjinaz-I enzimi de, hem L-arjinin substratını NOS ile paylaşarak NO sentezini dolaylı olarak etkiler, hem de üre döngüsünün ilk basamağında yer alarak üre ve ornitin üretimini artırabilir. Çalışmamızda arjinaz-I konsantrasyonundaki dalgalanmalar, endotokseminin farklı evrelerinde immün yanıtta ve substrat rekabetinde meydana gelen değişikliklerle ilişkili olabilir. Özellikle arjinaz-I aktivitesinin düşük olduğu zaman dilimlerinde, üre üretiminde azalma ve buna bağlı olarak amonyak birikimi artmış olabilir.

Gültekin ve diğerleri (2019), akut diyareli 60 ve sağlıklı 10 yenidoğan buzağıda kan amonyak düzeylerini karşılaştırmış ve diyareli buzağılarda kan amonyak seviyelerinin sağlıklı yenidoğanlara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğunu bildirmiştir (28,7 [26,1-36,9] $\mu\text{mol/L}$ 'ye karşı 59,8 [34,6-99,5] $\mu\text{mol/L}$; $p<0,001$). İnsanlarda sepsiste karaciğer dışı hiperamonyemiye odaklanan büyük ölçekli bir retrospektif çalışmada ise, 720 kritik derecede hasta sepsisli erişkin bireyde serum amonyak düzeylerinin ve SOFA skorlarının incelendiği ve ≥ 45 $\mu\text{mol/L}$ 'lik amonyak düzeyinin septik ensefalopatili hastalarda bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (OR: 3,508; %95 GA: 2,336-5,269; $p<0,001$). Aynı çalışmada, serum amonyak düzeylerinin SOFA skorları ve mortaliteyle de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2023). Benzer şekilde, Zhao ve diğerleri (2023) septik ensefalopatili hastalarda yapılan bir analizde, serum amonyak düzeylerinin prognoz açısından değerli olduğunu ve daha yüksek amonyak düzeylerinin daha yüksek SOFA skorları ve mortalite ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Gao ve diğerleri (2020) tarafından yürütülen bir prospektif çalışmada ise, yoğun bakımda izlenen sepsisli ve septik şoklu hastalarda, serum amonyak düzeylerinin hem kontrol grubuna göre hem de sepsisin şiddetine ve sağ kalıma göre anlamlı şekilde yüksek olduğu, ayrıca amonyağın APACHE II skoru ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular, çalışmamızda endotoksemili neonatal buzağılarda elde edilen amonyak düzeylerindeki

artışlarla uyum göstermektedir. Literatürde bildirilen artmış amonyak düzeyleriyle birlikte, bu biyobelirtecın sepsis ve endotoksemi süreçlerinde organ disfonksiyonu ve prognoz değerlendirmesi açısından önemli bir parametre olabileceğı düşünölmektedir.

Bu çalışmada, deneysel endotoksemi modeliyle sepsis oluşturulan neonatal buzağılarda nitrik oksit metabolizmasına ait çeşitli parametrelerde zamana bağılı değışiklikler değeriendirilmiştir. Bulgularımız, plazma NO ve kan amonyak düzeylerinde erken ve orta evrede anlamlı artışlar saptanırken, ADMA, iNOS, eNOS ve arjinaz-I düzeylerinde ise zamana bağılı dalgalanmaların göröldüğünü ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, özellikle NO ve amonyak parametrelerinin sepsis fizyopatolojisinde öne çıkan biyobelirteçler olabileceğine işaret etmektedir. Ancak, elde edilen bulguların yorumlanmasında bazı sınırlılıklar dikkate alınmalıdır. Öncelikle, çalışma örneklem sayısının sınırlı olması, uygulanan endotoksin dozunun ve süresinin düşük tutulması ile tek merkezli bir modelin kullanılması, sonuçların genellenebilirliğini kısıtlamaktadır. Ayrıca, parametrelerin yalnızca kan/plazma düzeylerinde ölçölmesi, dokulardaki lokal değışimleri değeriendirmeyi engellemiştir. Bu nedenle, elde edilen verilerin daha geniş örneklem grupları, farklı doz ve sürelerde uygulama ve doku düzeyinde ek analizlerle desteklenmesi, sepsis fizyopatolojisinin ve biyobelirteç potansiyelinin daha kapsamlı şekilde anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, 1–4 haftalık yaştaki neonatal Holstein buzağılara intravenöz olarak uygulanan *E. coli* kaynaklı LPS ile deneysel endotoksemi modeli oluşturulmuş ve sepsis sürecinde nitrik oksit metabolizmasına ilişkin bazı parametrelerin zamana bağlı değişimleri değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda, LPS uygulamasını takiben plazma NO düzeylerinde 12. ve 24. saatlerde, kan amonyak düzeylerinde ise 2., 4. ve 8. saatlerde anlamlı artışlar saptanmıştır. Arjinaz-1 seviyelerinde zaman içinde istatistiksel anlamlı olmayan dalgalanmalar gözlemlenmiş, özellikle 2. ve 8. saatlerde yükseliş dikkat çekmiştir. ADMA ve eNOS düzeylerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. iNOS seviyelerinde ise erken saatlerde artış eğilimi izlenmiş ancak genel olarak sabit bir seyir göstermiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, başta nitrik oksit ve amonyak olmak üzere bazı parametrelerdeki değişimlerin endotoksemi sürecinde önemli biyokimyasal yanıtları yansıttığı görülmektedir. Elde edilen bulgular, özellikle plazma NO ve kan amonyak düzeylerindeki değişimlerin sepsis/endotoksemi fizyopatolojisinin anlaşılmasına katkı sağlayabileceğini ve bu parametrelerin erken tanı ve prognozun belirlenmesinde biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği potansiyelini göstermektedir. Bu potansiyelin daha güçlü kanıtlarla desteklenebilmesi için daha geniş örneklem grupları, farklı doz ve sürelerde endotoksin uygulaması ve doku düzeyinde ek analizler ile gerçekleştirilecek yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akaike, T., & Maeda, H. (2000). Nitric oxide and virus infection. *Immunology*, 101(3), 300-308.
- Andreasen, A. S., Krabbe, K. S., Krogh-Madsen, R., Taudorf, S., Pedersen, B. K., & Moller, K. (2008). Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 15(17), 1697-1705.
- Aydemir, O., Ozcan, B., Yucel, H., Yagmur Bas, A., & Demirel, N. (2015). Asymmetric dimethylarginine and L-arginine levels in neonatal sepsis and septic shock. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 28(8), 977-982.
- Barthlen, W., Stadler, J., Lehn, N. L., Miethke, T., Bartels, H., & Siewert, J. R. (1994). Serum levels of end products of nitric oxide synthesis correlate positively with tumor necrosis factor α and negatively with body temperature in patients with postoperative abdominal sepsis. *Shock*, 2(6), 398-401.
- Bieniek, K., Szuster-Ciesielska, A., Kamińska, T., Kondracki, M., Witek, M., & Kandefer-Szerszeń, M. (1998). Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after repeated injection of low doses of lipopolysaccharide. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 62(4), 297-307.
- Boczkowski, J., Lanone, S., Ungureanu-Longrois, D., Danialou, G., Fournier, T., & Aubier, M. (1996). Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(7), 1550-1559.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101(6), 1644-1655.
- Böger, R. H. (2006). Live and let die: asymmetric dimethylarginine and septic shock. *Critical Care*, 10(6), 169.

- Brovkovich, V., Dobrucki, L. W., Brovkovich, S., Dobrucki, I., Kalinowski, L., Kiechle, F., & Malinski, T. (2001). Nitric oxide measurements during endotoxemia. *Clinical Chemistry*, 47(6), 1068-1074.
- Camicia, G., Pozner, R., & de Larrañaga, G. (2014). Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*, 42(4), 286-294.
- Carroll, J. A., Reuter, R. R., Chase Jr, C. C., Coleman, S. W., Riley, D. G., Spiers, D. E., & Galyean, M. L. (2009). Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. *Innate Immunity*, 15(2), 81-89.
- Carroll, J. A., Sanchez, N. B., Chaffin, R., Chase Jr, C. C., Coleman, S. W., & Spiers, D. E. (2013). Heat-tolerant versus heat-sensitive Bos taurus cattle: influence of air temperature and breed on the acute phase response to a provocative immune challenge. *Domestic Animal Endocrinology*, 45(3), 163-169.
- Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., & Rhodes, A. (2018). Sepsis and septic shock. *The Lancet*, 392(10141), 75-87.
- Cepinskas, G., & Wilson, J. X. (2008). Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42(3), 175-184.
- Chousterman, B. G., Swirski, F. K., & Weber, G. F. (2017, July). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars In Immunopathology* (Vol. 39, pp. 517-528). Springer Berlin Heidelberg.
- Chung, C. S., Wang, W., Chaudry, I. H., & Ayala, A. (2001). Increased apoptosis in lamina propria B cells during polymicrobial sepsis is FasL but not endotoxin mediated. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), G812-G818.
- Cobb, J. P., Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Chang, K., Qiu, Y., Laubach, V. E., & Buchman, T. G. (1999). iNOS gene deficiency decreases thymocyte apoptosis in septic mice. *Shock*, 11(6), 44.
- Comtois, A. S., El-Dwairi, Q., Laubach, V. E., & Hussain, S. N. (1999). Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159(6), 1975-1980.

- Constable P.D., (2007). General Medicine, Veterinary Medicine Ed Radostits OM, 10th ed. Salinders, USA, 51-58.
- Cox, L. E., Walstein, K., Völlger, L., Reuner, F., Bick, A., Dötsch, A., & Schäfer, S. T. (2020). Neutrophil extracellular trap formation and nuclease activity in septic patients. *BMC Anesthesiology*, 20, 1-9.
- Cuenca, A. G., Delano, M. J., Kelly-Scumpia, K. M., Moreno, C., Scumpia, P. O., LaFace, D. M., & Moldawer, L. L. (2011). A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Molecular Medicine*, 17, 281-292.
- Çöl, R., & Durgun, Z. (2004). Tavşanlarda endotoksin ile oluşturulan dissemine intravasküler koagülasyon üzerine vitamin E ve prednisolonun etkileri. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 20(1), 29-38.
- Dai, X. K., Ding, Z. X., Tan, Y. Y., Bao, H. R., Wang, D. Y., & Zhang, H. (2022). Neutrophils inhibit CD8⁺ T cells immune response by arginase-1 signaling in patients with sepsis. *World Journal of Emergency Medicine*, 13(4), 266.
- Dalsania, N., Kundu, S., Patti, R. K., Somal, N., & Kupfer, Y. (2022). Nonhepatic hyperammonemia with septic shock: case and review of literature. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 10, 23247096221101855.
- Davis, J. S., & Anstey, N. M. (2011). Is plasma arginine concentration decreased in patients with sepsis? A systematic review and meta-analysis. *Critical Care Medicine*, 39(2), 380-385.
- Decking, U. K., Flesche, C. W., Godecke, A. X. E. L., & Schrader, J. U. R. G. E. N. (1995). Endotoxin-induced contractile dysfunction in guinea pig hearts is not mediated by nitric oxide. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 268(6), H2460-H2465.
- Delano, M. J., Scumpia, P. O., Weinstein, J. S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K. M., & Moldawer, L. L. (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1⁺ CD11b⁺ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1463-1474.
- Denk, S., Taylor, R. P., Wiegner, R., Cook, E. M., Lindorfer, M. A., Pfeiffer, K., & Huber-Lang, M. S. (2017). Complement C5a-induced changes in neutrophil morphology during inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 86(3), 143-155.

- Drewry, A. M., Samra, N., Skrupky, L. P., Fuller, B. M., Compton, S. M., & Hotchkiss, R. S. (2014). Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock*, 42(5), 383-391.
- Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissi res, P., & Pugin, J. (2013). Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care Medicine*, 41(3), 820-832.
- Durandy, A., Kaveri, S. V., Kuijpers, T. W., Basta, M., Miescher, S., Ravetch, J. V., & Rieben, R. (2009). Intravenous immunoglobulins—understanding properties and mechanisms. *Clinical & Experimental Immunology*, 158(Supplement_1), 2-13.
- Durkot, M. J., & Wolfe, R. R. (1989). Hyper and hypodynamic models of sepsis in guinea pigs. *Journal of Surgical Research*, 46(2), 118-122.
- Elsasser, T. H., Blum, J. W., & Kahl, S. (2005). Characterization of calves exhibiting a novel inheritable TNF- α hyperresponsiveness to endotoxin: Associations with increased pathophysiological complications. *Journal of Applied Physiology*, 98(6), 2045-2055.
- Engelmann, B., & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(1), 34-45.
- Fı şg n, N. T. (2004). Sepsis. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 21(2).
- Fink, M. P., & Heard, S. O. (1990). Laboratory models of sepsis and septic shock. *Journal of Surgical Research*, 49(2), 186-196.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829-837.
- Funk, D. J., Parrillo, J. E., & Kumar, A. (2009). Sepsis and septic shock: a history. *Critical Care Clinics*, 25(1), 83-101.
- Gao, C., Wang, D., Li, W., Guo, X., Ma, J., & Xie, Y. (2020). Value of blood ammonia on predicting the severity and prognosis of patients with sepsis: a prospective observation study. *Zhonghua wei Zhong Bing ji jiu yi xue*, 32(11), 1315-1319.
- Gerros, T. C., Semrad, S. D., Proctor, R. A., & LaBorde, A. (1993). Effect of dose and method of administration of endotoxin on cell mediator release in neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, 54(12), 2121-2127.

- Gultekin, M., Voyvoda, H., Ural, K., Erdogan, H., Balikci, C., & Gultekin, G. (2019). Plasma citrulline, arginine, nitric oxide, and blood ammonia levels in neonatal calves with acute diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 987-998.
- Gül, F., Arslantaş, M. K., Cinel, İ., & Kumar, A. (2017). Changing definitions of sepsis. *Turkish Journal of Anaesthesiology and Reanimation*, 45(3), 129.
- Heuser, S. K., Li, J., Pudewell, S., LoBue, A., Li, Z., & Cortese-Krott, M. M. (2024). Biochemistry, pharmacology and in vivo function of arginases. *Pharmacological Reviews*, 100015.
- Hinds, C. A., Niehaus, A. J., Premanandan, C., Rajala-Schultz, P. J., Rings, D. M., & Lakritz, J. (2014). Characterization of the contributions of Hp-MMP 9 to the serum acute phase protein response of lipopolysaccharide challenged calves. *BMC Veterinary Research*, 10, 1-9.
- Hoffman, W. D., & Natanson, C. (1993). Endotoxin in septic shock. *Anesthesia & Analgesia*, 77(3), 613-624.
- Hotchkiss, R. S., Levy, J. H., & Levi, M. (2013). Sepsis-induced disseminated intravascular coagulation, symmetrical peripheral gangrene, and amputations. *Critical Care Medicine*, 41(10), e290-e291.
- Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J. L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1-21.
- Hu, S., Pi, Q., Xu, X., Yan, J., Guo, Y., Tan, W., & Xia, Y. (2021). Disrupted eNOS activity and expression account for vasodilator dysfunction in different stage of sepsis. *Life Sciences*, 264, 118606.
- Jarczak, D., Kluge, S., & Nierhaus, A. (2021). Sepsis—pathophysiology and therapeutic concepts. *Frontiers in Medicine*, 8, 628302.
- Jonkam, C. C., Bansal, K., Traber, D. L., Hamahata, A., Maybauer, M. O., Maybauer, D. M., & Enkhbaatar, P. (2009). Pulmonary vascular permeability changes in an ovine model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sepsis. *Critical Care*, 13, 1-9.
- Kelly, E., Morris JR, S. M., & Billiar, T. R. (1995). Nitric oxide, sepsis, and arginine metabolism. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 19(3), 234-238.

- Kirkeboen, K. A., & Strand, Ø. A. (1999). The role of nitric oxide in sepsis—an overview. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 43(3), 275-288.
- Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Jax, T., Kerber, S., Gharini, P., & Kelm, M. (2006). Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(2), 295-302.
- Krautz, C., Maier, S. L., Brunner, M., Langheinrich, M., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Gogos, C., & Weber, G. F. (2018). Reduced circulating B cells and plasma IgM levels are associated with decreased survival in sepsis-A meta-analysis. *Journal of Critical Care*, 45, 71-75.
- Kuyumcu, A., Düzgün, A. P., Özmen, M. M., & Besler, H. T. (2004). Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, 10(3), 149-159.
- Lagoa, C. E., de Figueiredo, L. F., Cruz, R. J., Silva, E., & Rocha e Silva, M. (2004). Effects of volume resuscitation on splanchnic perfusion in canine model of severe sepsis induced by live *Escherichia coli* infusion. *Critical Care Medicine*, 8, 1-8.
- Lambden, S., Kelly, P., Ahmetaj-Shala, B., Wang, Z., Lee, B., Nandi, M., & Leiper, J. (2015). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 regulates nitric oxide synthesis and hemodynamics and determines outcome in polymicrobial sepsis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(6), 1382-1392.
- Levi M, de Jonge E, Van der Poll T, Ten CH. (2000). Novel approaches to the management of disseminated intravascular coagulation. *Critical Care Medicine*, 28, 20-24.
- Levi, M., Van der Poll, T., Ten Cate, H., & Van Deventer, S. J. H. (1997). The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *European journal of Clinical Investigation*, 27(1), 3-9.
- Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., & Ramsay, G. (2003). 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Critical Care Medicine*, 31(4), 1250-1256.
- Lindsey, D. C., Emerson Jr, T. E., Thompson, T. E., John, A. E., Duerr, M. L., Valdez, C. M., & Canivel, D. (1991). Characterization of an endotoxemic baboon model of metabolic and organ dysfunction. *Circulatory Shock*, 34(3), 298-310.

- Lohuis, J. A. C., Verheijden, J. H. M., Burvenich, C., & Van Miert, A. S. J. P. A. M. (1988). Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants: 2. Metabolic aspects. *Veterinary Quarterly*, 10(2), 117-125.
- Lu, T., Kobayashi, S. D., Quinn, M. T., & DeLeo, F. R. (2012). A NET Outcome. *Frontiers in Immunology*, 3, 365.
- Luiking, Y. C., Poeze, M., Ramsay, G., & Deutz, N. E. (2009). Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(1), 142-152.
- Mackay R.J., (1996). Endotoxemia, *Large Animal Internal Medicine*, Ed: Thomson B., Mosby, Miisouri, 733,741.
- Michaels, F. H., & Banks, K. L. (1988). Contribution of various host factors to resistance to experimentally induced bacterial endotoxemia in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 49(4), 557-562.
- Michie, H. R. (1998). The value of animal models in the development of new drugs for the treatment of the sepsis syndrome. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41(suppl_1), 47-49.
- Mickiewicz, B., Thompson, G. C., Blackwood, J., Jenne, C. N., Winston, B. W., Vogel, H. J., & Alberta Sepsis Network. (2015). Development of metabolic and inflammatory mediator biomarker phenotyping for early diagnosis and triage of pediatric sepsis. *Critical Care*, 19, 1-13.
- Monneret, G., Debard, A. L., Venet, F., Bohe, J., Hequet, O., Bienvenu, J., & Lepape, A. (2003). Marked elevation of human circulating CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Critical Care Medicine*, 31(7), 2068-2071.
- Morris Jr, S. M., & Billiar, T. R. (1994). New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 266(6), E829-E839.
- Murakami, K., Bjertnaes, L. J., Schmalstieg, F. C., McGuire, R., Cox, R. A., Hawkins, H. K., & Traber, D. L. (2002). A novel animal model of sepsis after acute lung injury in sheep. *Critical Care Medicine*, 30(9), 2083-2090.
- Nandi, M., Kelly, P., Torondel, B., Wang, Z., Starr, A., Ma, Y., & Leiper, J. (2012). Genetic and pharmacological inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 is protective

- in endotoxic shock. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(11), 2589-2597.
- Nieman, A. E., Savelkoul, P. H. M., Beishuizen, A., Henrich, B., Lamik, B., MacKenzie, C. R., & Schade, R. P. (2016). A prospective multicenter evaluation of direct molecular detection of blood stream infection from a clinical perspective. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 314.
- Nierhaus, A., Klatte, S., Linssen, J., Eismann, N. M., Wichmann, D., Hedke, J., & Kluge, S. (2013). Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis-a prospective, observational study. *BMC Immunology*, 14, 1-8.
- Ortmann, W., & Kolaczowska, E. (2018). Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. *Cell and Tissue Research*, 371, 473-488.
- Panas, D., Khadour, F. H., Szabó, C., & Schulz, R. (1998). Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 275(3), H1016-H1023.
- Park, S. H., Park, B. G., Park, C. J., Kim, S., Kim, D. H., Jang, S., & Chi, H. S. (2014). An extended leukocyte differential count (16 types of circulating leukocytes) using the CytoDiff flow cytometric system can provide information for the discrimination of sepsis severity and prediction of outcome in sepsis patients. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 86(4), 244-256.
- Parker, S. J., & Watkins, P. E. (2001). Experimental models of Gram-negative sepsis. *British Journal of Surgery*, 88(1), 22-30.
- Peel, J. E., Voirol, M. J., Kolly, C., Gobet, D., & Martinod, S. (1990). Induction of circulating tumor necrosis factor cannot be demonstrated during septicemic salmonellosis in calves. *Infection and Immunity*, 58(2), 439-442.
- Piper, R. D., Cook, D. J., Bone, R. C., & Sibbald, W. J. (1996). Introducing critical appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. *Critical Care Medicine*, 24(12), 2059-2070.

- Pittet, J. F., Pastor, C. M., & Morel, D. R. (2000). Spontaneous high systemic oxygen delivery increases survival rate in awake sheep during sustained endotoxemia. *Critical Care Medicine*, 28(2), 496-503.
- Plessers, E., Wyns, H., Watteyn, A., Pardon, B., De Backer, P., & Croubels, S. (2015). Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163(1-2), 46-56.
- Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Robbins, C. S., Weber, G. F., Etzrodt, M., Hilgendorf, I., & Swirski, F. K. (2012). Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science*, 335(6068), 597-601.
- Remick, D. G., & Ward, P. A. (2005). Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*, 24, 7-11.
- Ribes, S., Doménech, A., Cabellos, C., Tubau, F., Liñares, J., Viladrich, P. F., & Gudiol, F. (2003). Experimental meningitis due to a high level cephalosporin resistant strain of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(7), 329-333.
- Salimuddin, Nagasaki, A., Gotoh, T., Isobe, H., & Mori, M. (1999). Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 277(1), E110-E117.
- Semrad, S. D., Rose, M. L., & Adams, J. L. (1993). Effect of tirilazad mesylate (U74006F) on eicosanoid and tumor necrosis factor generation in healthy and endotoxemic neonatal calves. *Circulatory Shock*, 40(4), 235-242.
- Shi, Y., Li, H. Q., Shen, C. K., Wang, J. H., Qin, S. W., Liu, R., & Pan, J. (1993). Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis. *The Journal of Pediatrics*, 123(3), 435-438.
- Simmons, J., & Pittet, J. F. (2015). The coagulopathy of acute sepsis. *Current Opinion in Anesthesiology*, 28(2), 227-236.
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Journal of the American Medical Association*, 315(8), 801-810.

- Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., Kurosawa, S., & Remick, D. G. (2011). The pathogenesis of sepsis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 19-48.
- Tadié, J. M., Cynober, L., Peigne, V., Caumont-Prim, A., Neveux, N., Gey, A., & Delclaux, C. (2013). Arginine administration to critically ill patients with a low nitric oxide fraction in the airways: a pilot study. *Intensive Care Medicine*, 39(9), 1663-1665.
- Tamayo, E., Fernández, A., Almansa, R., Carrasco, E., Heredia, M., Lajo, C., & Bermejo-Martin, J. F. (2011). Pro-and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *European Cytokine Network*, 22(2), 82-7.
- Tang, B. M., Huang, S. J., & McLean, A. S. (2010). Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Critical Care*, 14(6), R237.
- Taylor Jr, F. B. (2001). Staging of the pathophysiologic responses of the primate microvasculature to *Escherichia coli* and endotoxin: examination of the elements of the compensated response and their links to the corresponding uncompensated lethal variants. *Critical Care Medicine*, 29(7), S78-S89.
- Toth, I., & Heard, S. O. (1997). Nitric oxide does not mediate lipopolysaccharide-induced myocardial depression in guinea pigs. *Critical Care Medicine*, 25(4), 684-688.
- Traber, D. L., Redl, Heinz, Schlag, Guenther, Herndon, D. N., Kimura, Ryozo, Prien, Thomas, & Traber, L. D. (1988). Cardiopulmonary responses to continuous administration of endotoxin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 254(5), H833-H839.
- Tsukahara, Y., Morisaki, T., Kojima, M., Uchiyama, A., & Tanaka, M. (2001). iNOS expression by activated neutrophils from patients with sepsis. *ANZ Journal of Surgery*, 71(1), 15-20.
- van Wijk, X. M., Yun, C., & Lynch, K. L. (2021). Evaluation of biomarkers in sepsis: high dimethylarginine (ADMA and SDMA) concentrations are associated with mortality. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 6(3), 592-605.
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. C. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease—a 30th anniversary update. *Acta physiologica*, 219(1), 22-96.,

- Vincent, J. L., De Mendonça, A., Cantraine, F., Moreno, R., Takala, J., Suter, P. M., & Blecher, S. (1998). Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. *Critical Care Medicine*, 26(11), 1793-1800.
- Vincent, J. L., Opal, S. M., Marshall, J. C., & Tracey, K. J. (2013). Sepsis definitions: time for change. *The Lancet*, 381(9868), 774-775
- Vincent, J. L., Zhang, H., Szabo, C., & Preiser, J. C. (2000). Effects of nitric oxide in septic shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(6), 1781-1785.
- Wang, P., Yan, J., Shi, Q., Yang, F., Li, X., Shen, Y., & Zhao, L. (2023). Relationship between nonhepatic serum ammonia levels and sepsis-associated encephalopathy: a retrospective cohort study. *Emergency Medicine International*, 2023(1), 6676033.
- Ward, P. A., & Gao, H. (2009). Sepsis, complement and the dysregulated inflammatory response. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(10), 4154-4160.
- Werling, D., Sutter, F., Arnold, M., Kun, G., Tooten, P. C. J., Gruys, E., & Langhans, W. (1996). Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Research in Veterinary Science*, 61(3), 252-257.
- Wijnands, K. A., Castermans, T. M., Hommen, M. P., Meesters, D. M., & Poeze, M. (2015). Arginine and citrulline and the immune response in sepsis. *Nutrients*, 7(3), 1426-1463.
- Wijnands, K. A., Vink, H., Briedé, J. J., Van Faassen, E. E., Lamers, W. H., Buurman, W. A., & Poeze, M. (2012). Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PloS one*, 7(5), e37439.
- Winkler, M. S., Nierhaus, A., Rösler, G., Lezius, S., Harlandt, O., Schwedhelm, E., & Kluge, S. (2018). Symmetrical (SDMA) and asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in sepsis: high plasma levels as combined risk markers for sepsis survival. *Critical Care*, 22, 1-10.
- Yilmaz, Z., Cansev, M., Baykal, A.T., Haçarız, O., Hatipoğlu, İ., Eralp, O., Kocatürk, M., Ulus, İ.H. 2013. “Buzağı Endotoksemisinin Tanı ve Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar: Proteomik İnceleme ve İntravenöz Kolin Etkisi”, *Tübitak Proje Sonuç Raporu*. Proje no: 111O026

- Yu, M. H., Chen, M. H., Han, F., Li, Q., Sun, R. H., & Tu, Y. X. (2018). Prognostic value of the biomarkers serum amyloid A and nitric oxide in patients with sepsis. *International Immunopharmacology*, 62, 287-292.
- Zaloga, G. P., Siddiqui, R., Terry, C., & Marik, P. E. (2004). Arginine: mediator or modulator of sepsis?. *Nutrition in Clinical Practice*, 19(3), 201-215.
- Zhao, L., Hou, S., Na, R., Liu, B., Wang, Z., Li, Y., & Xie, K. (2023). Prognostic role of serum ammonia in patients with sepsis-associated encephalopathy without hepatic failure. *Frontiers in Public Health*, 10, 1016931.
- Zoccali, C., Maas, R., Cutrupi, S., Pizzini, P., Finocchiaro, P., Cambareri, F., & Boger, R. (2007). Asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) response to inflammation in acute infections. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(3), 801-806.
- Zucoloto, A. Z., & Jenne, C. N. (2019). Platelet-neutrophil interplay: insights into neutrophil extracellular trap (NET)-driven coagulation in infection. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 85.

EKLER

Ek 1



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



22/05/2025

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2025 Yılı V. Oturum
Sayı : 64583101/2025/076
Proje Başlığı : Deneysel Endotoksemili Neonatal Buzagılarda Nitrik Oksit Metabolizmasındaki Bazı Parametrelerin Araştırılması.
Proje Yürütücüsü : Mehmet GÜLTEKİN
Proje Ekibi : Ece Eylül SÖNMEZ
Hayvan Çalışması : Bu çalışmanın hiçbir bölümünde
İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması
İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. Turhan DOST
Başkan

Prof. Dr. Cengiz ÜNSAL
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Mehmet Dindir
BİLGİN
Üye

Prof. Dr. Yücel BAŞIMOĞLU KOCA
Üye

Doç. Dr. Mehmet GÜLER
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin
ŞEKER
Üye

Öğr. Gör. Vet. Hek. Asude Gülce
ÖRYAŞIN
Üye

Öğr. Gör. Vet. Hek. Meltem
ÖZTÜRK AYDIN
Üye

Dr. Vet. Hekim/Birgün ÜNAL
Üye

Filiz ÇELEBİOĞLU
Üye

*Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Deneyisel Endotoksemili Neonatal Buzağılarda Nitrik Oksit Metabolizmasındaki Bazı Parametrelerin Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Ece Eylül SÖNMEZ

... / ... / ...

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : SÖNMEZ, Ece Eylül
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Bursa / 05.06.1999
Telefon : 0 531 698 73 77
E-posta : sonmezeylul1@gmail.com
Yabancı dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi / Veteriner Fakültesi	2022

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2020	Dr. Dollittle Veteriner Kliniği	Stajyer Veteriner Hekim
2021-2023	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve	Stajyer Veteriner Hekim

Uygulama Hastanesi

2022-2023	Canine Visceral Leishmaniasis ile Doğal Enfekte Köpeklerde Resveratrolün Sağaltım Etkinliğinin Araştırılması – 1210192 nolu TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi	Bursiyer
2022-2023	Neonatal Buzağılarda İntravenöz ve Oral Sitrulin Uygulamalarının Farmakokinetiği ve Deneysel Endotoksemide Etkinliği – 1200638 nolu TÜBİTAK 1001 Projesi	Bursiyer

AKADEMİK YAYINLAR

1. SEMİNERLER

Temmuz 2022- Köpeklerde Babesiosis

DANIŞMAN: Prof. Dr. Mehmet GÜLTEKİN

Veteriner Hekim Ece Eylül SÖNMEZ