

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FAREDE LİPOPOLİSAKKARİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL SEPSİS
MODELİNDE ALFA-7 NİKOTİNİK RESEPTÖR AGONİSTİ PNU-282987'NİN
MEZENTER-PORTAL PERFÜZYON VE ORGAN HASARINA ETKİLERİ**

Dr. Mukaddes İSPİRLİ ALTINIŞIK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**FAREDE LİPOPOLİSAKKARİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL SEPSİS
MODELİNDE ALFA-7 NİKOTİNİK RESEPTÖR AGONİSTİ PNU-282987’NİN
MEZENTER-PORTAL PERFÜZYON VE ORGAN HASARINA ETKİLERİ**

Dr. Mukaddes İSPİRLİ ALTINIŞIK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Alper Bektaş İSKİT

ANKARA

2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve zorlu tez sürecimin her aşamasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimimde büyük emekleri olan, bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim, Anabilim Dalı Başkanımız ve danışmanım Prof. Dr. Alper B. İSKİT'e,

Akademik gelişimimde katkıları olan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Yıldırım SARA, Prof. Dr. Melih Ö. BABAOĞLU, Doç. Dr. Güray SOYDAN ve Doç. Dr. A. Mert ERTUNÇ'a,

Asistanlık sürecim boyunca birlikte çalıştığım, deneyimlerini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve çalışanlarına,

Tez çalışmam sırasında deneylerde bana yardımcı olan Prof. Dr. A. Yeşim GÖÇMEN ve Arş. Gör. Dr. Esin ÖZÇELEBİ'ye,

Histopatolojik değerlendirmede değerli katkıları ve yardımları için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Pergin ATILLA'ya ve Arş. Gör. Dr. Merve AYAN'a,

Varlıklarından güç aldığım ve koşulsuz sevgilerini her zaman hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime,

Anlayışı ve desteği ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Yaşar Can ALTINIŞIK'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım....

Dr. Mukaddes İSPİRLİ ALTINIŞIK

ÖZET

İspirli, Mukaddes. Farede Lipopolisakkarit ile Oluşturulan Deneysel Sepsis Modelinde Alfa-7 Nikotinik Reseptör Agonisti PNU-282987'nin, Mezenter-Portal Perfüzyon ve Organ Hasarına Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022. Sepsis enfeksiyona karşı düzensiz konak yanıtının neden olduğu yaşamı tehdit eden organ disfonksiyonudur. Dünya genelinde yoğun bakım ünitelerine en sık başvuru nedenleri arasındadır. Sepsis sistemik inflamasyon, hipoperfüzyon, karaciğer ve dalakta olmak üzere yaygın organ hasarı ile karakterizedir. Vasküler sistemin tonusu ve fizyolojik işlevi, sepsis ilişkili yanıt düzensizliği sebebiyle heterojen şekilde hasarlanır. Hipoperfüzyon sonucunda organ hasarı ve disfonksiyonu gözlenir. Kolinergik antiinflamatuvar yolak, vagus sinir stimülasyonu ve alfa-7 nikotinik asetilkolin reseptörü ($\alpha 7nAChR$) aracılığıyla inflamatuvar yanıtları azaltır. Bu çalışmada, farede LPS (O111:B4) ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde $\alpha 7nAChR$ agonisti PNU-282987'nin mezenter arter ve portal ven kan akım hızı ile karaciğer ve dalak hasarına etkisi incelendi. PNU-282987 (i.p.) aynı dozda, LPS (i.p.) enjeksiyonundan 1 saat önce (LPS+PNU-pre) ve 1 saat sonra (LPS+PNU-post) farklı gruplara uygulanarak tedavideki etkileri karşılaştırıldı. LPS enjeksiyonundan 4 saat sonra anestezi altında kan akım hızı ölçümleri yapıldı. Histopatolojik değerlendirme ve ELISA analizleri için karaciğer ve dalak doku örnekleri toplandı. Oksidatif ve inflamatuvar yanıtlar için TNF- α , IL-1 β , TAS ve TOS düzeyleri ölçüldü. Mezenter arter kan akım hızı LPS uygulanan hayvanlarda, salin grubuna göre anlamlı olarak azaldı. LPS+PNU-pre ve LPS+PNU-post gruplarında ise LPS grubuna göre anlamlı olarak arttı. Portal ven kan akım hızı LPS+PNU-post grubunda LPS ve LPS+PNU-pre gruplarına göre anlamlı olarak arttı. Karaciğer ve dalak örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde, LPS gruplarında oluşan doku hasarının LPS+PNU-post grubunda LPS+PNU-pre grubuna göre daha fazla azaldığı gözlemlendi. TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Karaciğer TAS düzeyi LPS+PNU-pre ve LPS+PNU-post gruplarında LPS grubuna göre anlamlı olarak arttı. Dalak TOS düzeyi LPS grubunda salin grubuna göre anlamlı olarak artarken, LPS+PNU-pre grubunda LPS grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Sonuçlarımız $\alpha 7nAChR$ agonisti PNU-282987'nin deneysel sepsis modeli oluşturulmuş farelerde, azalmış kan akım hızını artırdığını, karaciğer ve dalak dokusundaki hasarı düzeltici yönde etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, Alfa 7 Nikotinik Asetilkolin Reseptörü, İnflamasyon, Mezenter Hipoperfüzyon, Portal Hipoperfüzyon, PNU-282987.

ABSTRACT

İspirli, Mukaddes. Effects of Alpha-7 Nicotinic Receptor Agonist PNU-282987 on Mesenteric-Portal Perfusion and Organ Damage in an Experimental Model of Sepsis Induced by Lipopolysaccharide in Mice, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Thesis for Specialty in Medical Pharmacology, Ankara, 2022. Sepsis is life-threatening organ dysfunction caused by dysregulated host response to infection. It is among the most common reasons for admission to intensive care units in worldwide. Sepsis is characterized by systemic inflammation and hypoperfusion; it also causes extensive organ damage, including liver and spleen. Tonus and physiological function of the vascular system are heterogeneously impaired by sepsis related response dysregulation. As a result of hypoperfusion, organ damage and dysfunction occur. The cholinergic anti-inflammatory pathway reduces inflammatory responses through vagus nerve stimulation and alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$). In this study, the effects of $\alpha 7nAChR$ agonist PNU-282987 on mesenteric artery and portal vein blood flow velocity and liver and spleen damage were investigated in an experimental sepsis model induced by LPS (O111:B4) in mice. PNU-282987 (i.p.) was administered to different groups at the same dose 1 hour before (LPS+PNU-pre) and 1 hour after (LPS+PNU-post) injection of LPS (i.p.) and its therapeutic effects were compared. Blood flow velocity measurements were made under anesthesia 4 hours after LPS injection. Liver and spleen tissue samples were collected for histopathological evaluation and ELISA analysis. TNF- α , IL-1 β , TAS and TOS levels were measured to determine oxidative and inflammatory responses. Mesenteric artery blood flow velocity was significantly decreased in LPS treated animals compared to saline group. It increased significantly in the LPS+PNU-pre and LPS+PNU-post groups compared to the LPS group. Portal vein blood flow velocity increased significantly in the LPS+PNU-post group compared to the LPS and LPS+PNU-pre groups. As a result of histopathological examination of liver and spleen samples, it was observed that tissue damage in LPS groups decreased more in the LPS+PNU-post group than in the LPS+PNU-pre group. There was no significant difference between the groups in TNF- α and IL-1 β levels. Liver TAS level increased significantly in LPS+PNU-pre and LPS+PNU-post groups compared to LPS group. Splenic TOS level increased significantly in the LPS group compared to the saline group, and decreased significantly in the LPS+PNU-pre group compared to the LPS group. Our results show that the $\alpha 7nAChR$ agonist PNU-282987 increases the decreased blood flow velocity in mice with experimental sepsis model, and is effective in correcting the damage in liver and spleen tissue.

Keywords: Sepsis, Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor, Inflammation, Mesenteric Hypoperfusion, Portal Hypoperfusion, PNU-282987.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
TABLO DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sepsis	3
2.1.1. Sepsis Tanımları	3
2.1.2. Sepsis Patofizyolojisi	4
2.1.3. Sepsis ve Hipoperfüzyon	6
2.1.4. Sepsiste Deneysel Modeller	7
2.2. Kolinerjik Sistem	9
2.2.1. Asetilkolin Reseptörleri	10
2.2.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri	12
2.2.3. $\alpha 7$ Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri	16
2.2.4. Kolinerjik Antiinflamatuvar Yolak	22
2.2.5. PNU-282987	24
2.3. Hipotez	26
2.4. Amaç	26
3. YÖNTEMLER	27
3.1. Deney Hayvanları	27
3.2. Etik Kurul İzni	27

3.3. Deney Protokolü ve İlaç Uygulamaları	27
3.4. Mezenter Arter ve Portal Ven Kan Akım Hızlarının Ölçümü	28
3.5. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	30
3.6. ELISA Ölçümleri.....	31
3.7. Histopatolojik Analiz.....	32
3.8. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. PNU-282987'nin Farede Ölçülen Mezenter Arter Kan Akımına Etkileri.....	34
4.2. PNU-282987'nin Farede Ölçülen Portal Ven Kan Akımına Etkileri.....	36
4.3. PNU-282987'nin Fare Karaciğer Örneklerinde Ölçülen TNF- α Düzeyine Etkileri.....	38
4.4. PNU-282987'nin Fare Dalak Örneklerinde Ölçülen TNF- α Düzeyine Etkileri...	39
4.5. PNU-282987'nin Fare Karaciğer Örneklerinde Ölçülen IL-1 β Düzeyine Etkileri.....	40
4.6. PNU-282987'nin Fare Dalak Örneklerinde Ölçülen IL-1 β Düzeyine Etkileri....	41
4.7. PNU-282987'nin Fare Karaciğer Örneklerinde Ölçülen TAS Düzeyine Etkileri.....	42
4.8. PNU-282987'nin Fare Dalak Örneklerinde Ölçülen TAS Düzeyine Etkileri.....	43
4.9. PNU-282987'nin Fare Karaciğer Örneklerinde Ölçülen TOS Düzeyine Etkileri.....	44
4.10. PNU-282987'nin Fare Dalak Örneklerinde Ölçülen TOS Düzeyine Etkileri...	45
4.11. PNU-282987'nin Karaciğer ve Dalak Hasarına Histopatolojik Etkileri.....	46
4.11.1. Salin Grubu.....	46
4.11.2. LPS Grubu.....	46
4.11.3. LPS+PNU-pre Grubu.....	47
4.11.4. LPS+PNU-post Grubu.....	47

4.11.5. DMSO Grubu.....	48
4.11.6. PNU-pre Grubu.....	48
4.11.7. PNU-post Grubu.....	49
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	60
7. KAYNAKLAR.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	Adenilat siklaz
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
APC	Antijen sunan hücre
ATP	Adenozin trifosfat
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CAP	Kolinerjik antiinflamatuvar yolak
ChAT	Kolin asetiltransferaz
CLP	Çekum bağlama ve delme
CNS	Santral sinir sistemi
DAG	Diaçilgliserol
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler yapılar
EPSP	Eksitatör postsinaptik potansiyel
HMGB1	Yüksek mobilite grubu protein 1
IFN-γ	İnterferon gama
IL	İnterlökin
IP₃	İnozitol trifosfat
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
i.p.	Periton içi
JAK/STAT	Janus kinaz/sinyal dönüştürücüleri ve transkripsiyon
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisakkarit
mAChR	Muskarinik asetilkolin reseptörü

MABP	Ortalama arteriyel kan basıncı
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
nAChR	Nikotinik asetilkolin reseptörü
NE	Norepinefrin
NO	Nitrik oksit
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NTS	Nükleus traktus solitarius
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PAI-1	Plazminojen aktivator inhibitörü-1
PAM	Pozitif allosterik modülatör
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler yapılar
PKA	Protein kinaz A
ROS	Reaktif oksijen türleri
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SOFA	Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme
TAS	Total antioksidan seviyesi
TLR	Toll like (benzeri) reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
TOS	Total oksidan seviyesi
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
ZO-1	Zonula okludens-1

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
2.1. LPS etki mekanizması.....	9
2.2. Nikotinic asetilkolin reseptör alt tipleri ve yapısı.....	13
2.3. Nöronal nikotinic asetilkolin reseptörlerinin beyinde dağılımı	16
2.4. $\alpha 7$ aktivasyonunun aracılık ettiği hücre içi sinyal yolağı.....	19
2.5. Kolinerjik antiinflamatuvar yolak.....	23
2.6. PNU-282987'nin kimyasal yapısı.....	24
3.1. Deney protokolü.....	28
3.2. Doppler esasına göre akım hızı ölçen cihaz ve damar probu	29
3.3. Damar probu yardımıyla mezenter arter ve portal ven kan akımı ölçümü.....	30
4.1. Mezenter arter kan akım hızı değerleri.....	34
4.2. Gram başına mezenter arter kan akım hızı değerleri.....	35
4.3. Portal ven kan akım hızı değerleri.....	36
4.4. Gram başına portal ven kan akım hızı değerleri.....	37
4.5. Fare karaciğer örneklerinde ölçülen TNF- α konsantrasyonu	38
4.6. Fare dalak örneklerinde ölçülen TNF- α konsantrasyonu.....	39
4.7. Fare karaciğer örneklerinde ölçülen IL-1 β konsantrasyonu....	40
4.8. Fare dalak örneklerinde ölçülen IL-1 β konsantrasyonu.....	41

4.9.	Fare karaciğer örneklerinde ölçülen TAS konsantrasyonu.....	42
4.10.	Fare dalak örneklerinde ölçülen TAS konsantrasyonu.....	43
4.11.	Fare karaciğer örneklerinde ölçülen TOS konsantrasyonu.....	44
4.12.	Fare dalak örneklerinde ölçülen TOS konsantrasyonu.....	45
4.13.	Salin ve LPS gruplarına ait karaciğer ve dalak örneklerinin histopatolojik görüntüleri.....	50
4.14.	Salin ve kontrol gruplarına ait karaciğer ve dalak örneklerinin histopatolojik görüntüleri.....	51

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
2.1 LPS türleri.....	8
2.2. Muskarinik asetilkolin reseptör alt tipleri.....	11
2.3. Nikotinik asetilkolin reseptör alt birimleri.....	14
2.4. Nikotinik asetilkolin reseptörleri.....	15
2.5. $\alpha 7$ nAChR ligandları.....	21
2.6. $\alpha 7$ nAChR agonistleri ve EC50 değerleri.....	22
3.1. Fare karaciğer doku kesitlerinde nekrotik hücre sayımı.....	33
3.2. Fare dalak doku kesitlerinde dev hücre sayımı.....	33
4.1. Karaciğer örneklerine ait histolojik değerlendirme.....	52
4.2. Dalak örneklerine ait histolojik değerlendirme.....	53

1. GİRİŞ

Sepsis kontrolsüz inflamasyon sonucunda farklı organ ve sistemlerde fonksiyon kaybına sebep olan, sıklıkla yoğun bakım ünitesine yatış gerektiren mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Antibiyotik, intravenöz sıvı ve vazopressör desteğine rağmen sepsisin kesin tedavisi halen mevcut değildir. Sepsiste organ yetmezliğinin derecesi mortaliteyi öngörmede güçlü bir belirleyici olarak kabul edilmektedir.

Sepsise bağlı gelişen organ yetmezliği, infeksiyon kaynağı mikroorganizmalar ile konağın immün sistemi arasındaki karmaşık etkileşimler sonucu oluşmaktadır. Bu etkileşimleri taklit eden deneysel modeller sepsis araştırmalarında kullanılmaktadır. Tek başına LPS enjeksiyonu, sepsisin tüm hücresel cevaplarını ve bu cevaplarla ilişkili hemodinamik etkileri oluşturmada yeterli bir modeldir.

Sepsis hemodinamik dengede ve vasküler regülasyonda bozulmanın eşlik ettiği, sitokinlerin ve nitrik oksit düzensiz saliverilmesi ile karakterize aşırı sistemik inflamatuvar yanıttır. İndüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesinin artmasıyla nitrik oksit (NO) düzeyindeki yükselmenin sepsis şiddetiyle korele olduğu gösterilmiştir (1). LPS makrofajlarda bulunan reseptörüne bağlandığında gen transkripsiyonunu aktive eder ve proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 sentezini uyarır. Proinflamatuvar sitokinler endotel disfonksiyonuyla birlikte koagülasyonu artırır, fibrin tıkaçlar oluşturur ve organ hasarına neden olur (2).

Kolinerjik antiinflamatuvar yolak, yeni keşfedilen bir nöroimmünomodülatör yoldur. Vagus siniri ve reseptörleri aracılığıyla proinflamatuvar sitokin saliverilmesini inhibe eden nöral bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Bağışıklık sistemi hücrelerinin farklılaşarak ve işlevlerini vagus sinirine bağlı bir şekilde düzenleyerek antiinflamatuvar etkilerin oluşması ilgi çekici bulunmaktadır. Kolinerjik sinirler ile immün sistem arasındaki iletişim için nikotinik asetilkolin reseptörünün alt tipi olan $\alpha 7$ nAChR gereklidir. Bu reseptör makrofajlarda ve diğer immün hücrelerde eksprese edilir. $\alpha 7$ nAChR, asetilkolin ile etkileşime giren ve hücre içi moleküler olayları başlatan bu yolağın temel bileşenidir. $\alpha 7$ nAChR agonistlerinin hem TNF- α hem de IL-1 β , IL-6 ve IL-8 saliverilmesini inhibe ettiği farklı modellerde gösterilmiştir (3).

$\alpha 7nAChR$ agonistleri karaciğer, akciğer, kalp, beyin ve diğer hedef organlarda sepsise bağılı olan hasarı azaltmak için inflamatuvar mediyatörlerin üretimini inhibe edebilir (4). $\alpha 7nAChR$ selektif ve potent agonisti olan PNU-282987'nin sitokin profilini etkili bir şekilde değiştirebildiği ve sonuç olarak lokal ve sistemik inflamasyon üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (5).

Bu çalışmada $\alpha 7nAChR$ agonisti PNU-282987'nin, LPS ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde, mezenter arter ve portal ven kan akım hızları ile histopatolojik ve biyokimyasal ölçümler ile değerlendirilecek karaciğer ve dalak hasarı üzerine etkisi incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

2.1.1. Sepsis Tanımları

Sepsis enfeksiyona karşı düzensiz konak yanıtının neden olduğu yaşamı tehdit eden organ disfonksiyonu olarak tanımlanır (6). Dünya genelinde yılda yaklaşık olarak 50 milyon hasta yüküne yol açmakta ve 11 milyon ölüme neden olmaktadır (7). Sepsis sıklıkla bakteriyel nedenlidir ve hastane ölümlerinin üçte birinden sorumludur. Antibiyotik tedavisi, sıvı replasmanı ve organ desteğindeki son gelişmeler ile hastane içi ölümler azalmış olsa da, septik hastalarda uzun dönemde morbidite ve mortalitede artış hala görülmektedir. Sepsis, dünya genelinde yoğun bakım ünitelerine en sık başvuru nedenleri arasındadır (8).

En güncel tanımlama olarak, 2016 yılında "Sepsis ve Septik Şok için Üçüncü Uluslararası Konsensus Tanımları (Sepsis-3)" yayınlanmıştır (9). İnflamatuvar yanıtın sepsise özgü olmadığı düşünüldüğünden "sistemik inflamatuvar yanıt sendromu" (SIRS) kriterleri ve şiddetli sepsis tanımı Sepsis-3'ten çıkarılmıştır. Sepsis tanısı için, "Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme" (SOFA) skoruna dayalı olarak organ disfonksiyonunun saptanması gerektiği vurgulanmıştır (6). Organ disfonksiyonu, SOFA skorunda enfeksiyondan sonra en az 2 puan artış olması şeklinde tanımlanmıştır. SOFA skorlaması, yoğun bakım ünitelerinin dışında (örneğin, acil serviste veya cerrahi servislerde) her zaman kapsamlı bir şekilde yapılamadığından, hızlı (q) SOFA skorunun kullanılması önerilmiştir. qSOFA skorlaması ile sepsisin tanımlanması değil, ölüm riski yüksek hastaların belirlenmesi amaçlanmıştır (10). qSOFA, değerlendirilmesi kolay üç kriterden oluşmaktadır :

1. Mental durumda değişiklik (Glasgow Koma Skalası <15)
2. Solunum hızı ≥ 22 /dk.
3. Sistolik kan basıncı ≤ 100 mmHg

İki veya daha fazla kriterin varlığı organ disfonksiyonunun olduğunu göstermektedir (11).

Organ disfonksiyonu ile birlikte kanıtlanmış enfeksiyon bulgularının olması sepsis tanısını koymak için yeterlidir. SOFA skorlamasının 2 puan ve üzeri olduğu durumların artmış serum laktat seviyesi ile korele olduğu bildirilmiştir (6).

Sepsis-3 konsensusunda septik şok, ortalama arteriyel kan basıncının (MABP) 65 mmHg ve üzerinde tutulabilmesi için vazopressör gerekliliğinin olması ve yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen serum laktat değerinin 2mmol / L (18 mg / dL)'den yüksek olması şeklinde tanımlanmıştır (6). Septik şok, hastanelerde önde gelen ölüm nedenidir ve ölüm oranı farklı merkezlerde %40'ı aşmaktadır (12).

2.1.2. Sepsis Patofizyolojisi

Sepsis; vücudun enfeksiyona karşı aşırı immün yanıt oluşturduğu, hassas olan inflamasyon ve antiinflamasyon dengesinin çok yönlü bozulduğu bir durumdur. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar yolların up-regülasyonu sitokinler, mediyatörler ve patojenle ilgili moleküllerin saliverilmesine yol açar, bu da kompleman kaskadlarının aktivasyonu ve pıhtılaşma ile sonuçlanır (13).

Başlangıçta enfeksiyonu takip eden inflamasyon, organ hasarı ve ölümün, yalnızca vücudun patojenle ilişkili moleküler yapılar (pathogen associated molecular pattern, PAMP) gibi mikrobiyal ürünlere (LPS, lipoteikoik asit, lipoprotein, peptidoglikan) verdiği yanıtta kaynaklandığı düşünülmüştür (14). Ancak mikrobiyal olmayan moleküllerin de sepsiste etkili olduğu görülmüştür. Hasarla ilişkili moleküler yapılar (damage associated molecular pattern, DAMP) doku hasarı sonucu konakçı hücrelerinden saliverilen moleküllerdir. DAMP'lar (ısı şok proteinleri, HMGB1, ATP, ürik asit, heparin sülfat) sistemik inflamasyona, organ hasarına ve ölüme yol açan enfeksiyöz olmayan bir inflamatuvar yanıtı başlatan ve sürdüren bağışıklık sisteminin aktivatörleridir (15, 16). PAMP ve DAMP'lar, antijen sunan hücrelerin (antigen presenting cell, APC) ve monositlerin hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlerine (toll-like receptors, TLR) bağlanarak NF- κ B'yi (nuclear factor kappa B) aktive ederler (17). Bunun sonucunda ilgili genlerin transkripsiyonu ile proinflamatuvar sitokinler olan interlökinler (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve

interferonlar (IFN- γ) saliverilir (18). Proinflamatuvar sitokinlerin oluşturduğu etki lokal enfeksiyonun kontrolü için gereken yanıtı aştığında sepsis oluşur.

Proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1) prostaglandinler, lökotrienler, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve fosfolipaz A2 gibi mediyatörlerin üretimini başlatır. Bu mediyatörler endotel hücrelerine zarar verir ve kapiller sızıntı oluşumuna neden olur (19). TNF- α ve IL-1 doku faktörü ekspresyonunu artırır. Doku faktörü trombini indükler ve fibrin tıkaç oluşturur. TNF- α ve IL-1 güçlü bir fibrinoliz inhibitörü olan PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitörü-1)'in üretimini artırır (20). Koagülasyon kaskadı ve endotel hasarındaki dengesizlikler, mikrodolaşım değişiklikleri ve yaygın doku iskemisi ile sonuçlanır. Sepsis sırasında etkilenen başlıca organlar akciğerler, kalp, merkezi sinir sistemi (CNS), böbrekler ve karaciğerdir.

Sepsisin erken evrelerinde proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerde (IL-4, IL-10, IL-13) artış görülebilmektedir (2, 21). IL-1, IL-6 ve TNF- α prokoagülan moleküllerin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretiminin artmasına neden olur (22).

Patojene karşı konak yanıtının başlatılmasındaki ilk basamak makrofajlar, monositler, nötrofiller ve doğal öldürücü hücrelerden oluşan, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonudur (23). Nötrofiller savunma hattının önemli bir bölümünü oluşturmakta ve özellikle şiddetli bakteriyel enfeksiyonlar, kemik iliğinden matür ve immatür nötrofil formlarının saliverilmesine neden olmaktadır. İmmatür nötrofiller PAMP veya DAMP'lar aracılığıyla aktive edildiğinde, düşük fagositoz ve oksidatif patlama kapasitesi sergilerler (24, 25).

Endotel disfonksiyonu damar geçirgenliğinin artmasına, pıhtılaşma yolağının aktivasyonuna, doku ödeme ve perfüzyonun bozulmasına neden olarak organ yetmezliğinin patogenezinde kritik rol oynamaktadır (26). Vasküler endotel, bazal membran üzerindeki endotel hücre tabakası ile lümenal yüzeyi kaplayan glikokaliks yapısından oluşmaktadır (27). Glikokaliks; glikoprotein, hyalüronik asit ve sülfatlı proteoglikanlar içermektedir. Kan ve damar duvarı arasında koruyucu bir bariyer

görevi görerek lökosit adezyonunu düzenlemeye, endotel bariyerini korumaya ve intravasküler tromboz oluşumunu önlemeye yardımcı olmaktadır (28).

Sepsisin erken fazındaki “sitokin fırtınası” ile ilgili mediyatörler; PAMP, sitokinler, bradikinin, trombosit aktive edici faktör (PAF), ROS ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) endotelial hasara neden olmaktadır. Bununla birlikte sepsiste endotel, immün hücreleri uyaran kemokinlerin üretimini artırarak inflamatuvar yanıtı desteklemektedir (13, 29, 30)

Glikokaliks tabakasının oksidanlar, hiperglisemi, sitokinler ve bakteriyel endotoksin varlığında bütünlüğü bozulur ve açıkta kalan endotel lökosit adezyonuna maruz kalır. Proinflamatuvar sitokinler lökositlerin adezyonunu ve dokuya göçünü destekler (31).

2.1.3. Sepsis ve Hipoperfüzyon

Sepsiste mortalitenin önemli nedeni çoklu organ yetmezliğine yol açan doku hipoperfüzyonudur. Sepsisin erken evresinde mikrosirkülasyonda meydana gelen patofizyolojik değişikliklerle, doku hipoperfüzyonu ve hücrel hipoksi indüklenmektedir (32). Endotelial disfonksiyon organ yetmezliğinin belirteci ve nedenidir (33).

Vasküler disfonksiyonun, sistemik hemodinamideki değişikliklerin ortaya çıkışından önce görüldüğü bilinmektedir (34). Sepsisin erken evresinde makrosirkülasyon korunmuş gibi görünse de hemodinamik kompensasyonda bozulma olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (35, 36). Kapiller bütünlüğün ve perfüzyonun azalmasıyla doku oksijenasyonu bozulmaktadır. Sepsiste tüm vasküler alanlar aynı şekilde etkilenmeyebileceğinden, mikrosirkülasyon ve bölgesel kan akımı değişikliklerinde heterojenlik tanımlanmıştır (37).

Deneyel sepsis modeliyle yapılan bir çalışmada, superior mezenter arterde vasküler disfonksiyonun daha erken görüldüğü ve bunun kan akımındaki bozulmadan önce ortaya çıktığı belirtilmiştir (34). LPS ile indüklenmiş başka bir deneyel sepsis

çalışmasında sistemik hipotansiyon ile birlikte azalmış portal ven kan akımları gözlenmiştir (38).

Sepsis sırasında bağırsağın proinflamatuvar bir organ haline gelebileceği belirtilmektedir (39). Yapılan bir çalışmada, LPS infüzyonundan sonra superior mezenter arter akımında artış olmasına rağmen ileal mikrosirkülasyon perfüzyonunun azaldığı gösterilmiştir (40). Kan basıncı, kalp debisi ve oksijen satürasyonu gibi hemodinamik parametrelerin doku perfüzyonunu tam olarak yansıtmadığı ve mikrosirkülasyon disfonksiyonu ile korele olmadığı belirtilmektedir (41). Sistemik dolaşımın normalleşmesinin septik şokun erken döneminde, bozulmuş mikrosirkülasyon ve hücrel O₂ metabolizma bozukluğunu iyileştirmediği bildirilmiştir (42). Yapılan birçok çalışmada, mikrovasküler perfüzyon bozukluğunun sepsisin geç evresindeki hemodinamik değişikliklerden bağımsız olduğu ileri sürülmüştür (37, 43).

2.1.4. Sepsiste Deneysel Modeller

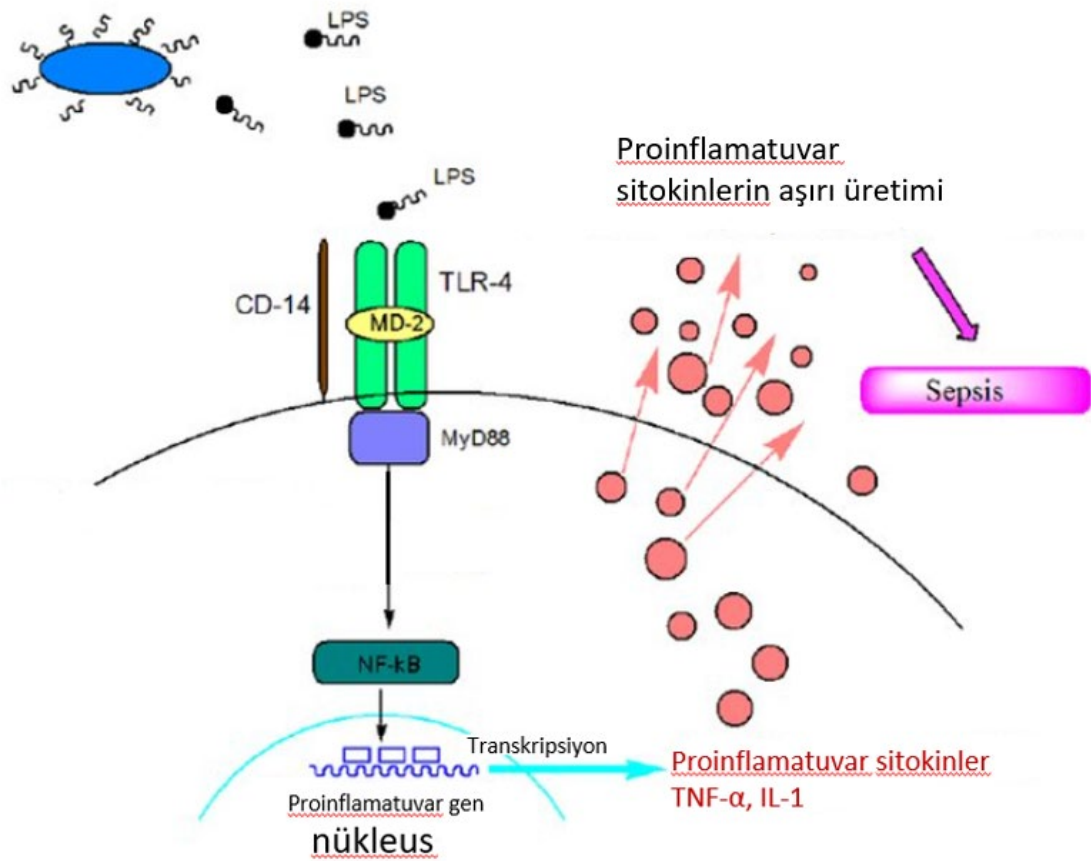
Deney hayvanlarında sepsis modeli oluşturmak için kullanılan başlıca yöntemler; lipopolisakkarid (LPS) ile oluşturulan sepsis modeli, çekum bağlama ve delme modeli (cecal ligation and puncture, CLP), IV/ IP canlı bakteri enjeksiyonudur.

LPS gram negatif bakterilerin hücre duvarından elde edilen, glikolipid içeren büyük moleküllerdir. Literatürde LPS ve endotoksin aynı anlamda kullanılsa da aralarında fark vardır. LPS saflaştırılmış glikolipid yapıya sahipken, endotoksinde ek olarak az miktarda hücre duvarı proteinleri, lipidler, lipoproteinler ve polisakkarid bulunmaktadır. LPS toksisitesi çoğunlukla içerdiği lipid A yapısından kaynaklanır. LPS genelde liyofilize toz halinde ticari olarak temin edilmektedir. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok gram negatif bakteriden elde edilmesine rağmen deneysel septik şok çalışmaları *E. coli*'den elde edilen LPS'ler üzerinde yoğunlaşmıştır (44). Farklı suşlardan elde edilmiş LPS türleri Tablo 2.1'de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. LPS türleri

Tür	Serotip	Kısaltma
<i>Escherichia coli</i>	O55:B5	LPS-O55
	O111:B4	LPS-O111
	O127:B8	LPS-O127
	O128:B12	LPS-O128
	O26:B6	LPS-O26
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Enteritidis</i>	LPS-SE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	LPS-PA

LPS immün hücrelerdeki TLR-4 (Toll-like receptor 4) reseptör tarafından tanınır. TLR-4 aktivasyonu, CD-14 ve MD-2 olarak bilinen iki yardımcı protein tarafından desteklenir. Aktive TLR-4, adaptör molekül MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88)'i uyarır. MyD88'e bağlı sinyal yolağı, proinflamatuvar mediyatörleri kodlayan hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açar (45).



Şekil 2.1. LPS etki mekanizması, (45) numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

2.2. Kolinerjik Sistem

Kolinerjik terimi asetilkolin (ACh) kullanan nöronları, reseptörleri veya sinapları tanımlamaktadır. Kolinerjik nöronlarda asetilkolin sentezlenir, depolanır ve salıverilir. Pregangliyonik otonom lifler, iskelet kasını innerve eden somatik lifler, postgangliyonik parasempatik lifler ve bazı postgangliyonik sempatik (ter bezi ve iskelet kası damarını innerve eden) lifler kolinerjiktir. Ayrıca santral sinir sisteminde de kolinerjik lifler bulunmaktadır.

Bir alkaloid olan ACh tanımlanan ilk nörotransmitterdir. Nörotransmitter kavramı, 1921'de Otto Loewi'nin vagus sinirinin kalp kasını inhibe eden bir madde

salgıladığını bulmasına kadar bilinmiyordu. Kolinerjik sistemin nörotransmitter olan ACh üzerine kurulu olduğunun keşfi 1936 yılında Loewi'ye Nobel ödülü kazandırmıştır (46).

ACh nöronal, nöronal olmayan ve nöromüsküler kavşaklarda sinyal iletimini düzenler. ACh öğrenme, hafıza, farkındalık ve uyku gibi beyin fonksiyonlarını için gereklidir. ACh'ın beyindeki iki majör kaynağı; bazal ön beyin ve mezopontin tegmentum alandır (47). ACh vagus siniri dışında eritrositler, immün hücreler, endotel ve epitel hücreleri ile plasenta hücrelerinde de bulunmaktadır (48). İmmün hücreler ACh'i sentezleyip doğrudan kan dolaşımına salıverirken, nöronal hücrelerde vezikülde depolanır ve sinaptik yarıklardan ekzositozla serbest bırakılır (49).

ACh, sitoplazmada kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından Asetilkoenzim A ve kolden sentezlenir. ATP bağımlı bir şekilde veziküllerde depolanır ve hücre içine kalsiyum girişı ile birlikte sinaptik aralığa salıverilir. ACh, postsinaptik veya presinaptik nörondaki nikotik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) veya muskarinik asetilkolin reseptörlerine (mAChR) bağlanır. Postsinaptik membran üzerinde bulunan asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolini kolin ve asetik aside yıkar. Kolinin sinaptik aralıktan presinaptik nörona taşıyıcı ile geri alınması asetilkolin sentezinde hız kısıtlayıcı basamaktır (50).

2.2.1. Asetilkolin Reseptörleri

Kolinerjik reseptör olarak da bilinen asetilkolin reseptörü (AChR), asetilkolinin bağlandığı integral membran proteinidir. ACh merkezi ve periferik sinir sistemi üzerindeki etkilerini nAChR ve mAChR aracılığıyla göstermektedir.

mAChR, belirli nöronların ve hücrelerin hücre zarlarında G proteinine bağlı reseptör kompleksleri oluşturan, "metabotropik" asetilkolin reseptörleri olarak da bilinen reseptörlerdir (51). Muskarinik reseptörler, muskarine nikotinden daha duyarlı olduğu için bu şekilde adlandırılmıştır. Parasempatik sinir sistemindeki esas reseptör olmasına rağmen, damar yataklarının çoğu gibi parasempatik innervasyona sahip olmayan yerlerdeki efektör hücrelerde de bulunurlar. Muskarinik reseptör ailesi çok çeşitli organ ve dokularda eksprese edilen M₁R-M₅R olarak adlandırılan beş alt

tipten oluşmaktadır. Aktive olan M_1 , M_3 ve M_5 reseptörleri $G_{q/11}$ proteini aracılığı ile membrandaki fosfolipaz C enzimini aktive ederek ikinci haberci olan IP_3 (inozitol trifosfat) ve DAG (diçilgliserol)'ı oluştururlar. DAG sitoplazmada protein kinaz C'yi aktive ederek bir dizi fosforilasyon olayını başlatır, IP_3 ise endoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesini artırarak etki eder. M_2 ve M_4 reseptörleri ise $G_{i/o}$ proteini ile kenetli olup uyarıldıklarında adenilat siklazın (AC) inhibisyonuna aracılık eder ve böylece siklik adenozin monofosfatta (cAMP) bir azalmaya neden olurlar (50).

Muskarinik asetilkolin reseptörleri kalp atış hızını, düz kas kasılmasını, glandüler sekresyonu ve merkezi sinir sisteminde birçok temel fonksiyonu düzenleyen önemli bir role sahiptirler (52). Muskarinik reseptör alt tiplerinin genel olarak doku ve organlardaki dağılımı ile fizyolojik etkileri Tablo 2.2'de belirtilmiştir (53).

Tablo 2.2. Muskarinik asetilkolin reseptör alt tipleri

Alt tip	G protein	Doku ve organ	Fizyolojik etkiler
M_1R	$G_{q/11}$	Otonom ganglion, serebral korteks, lenfosit ve keratinosit	Depolarizasyon, kasılma, mide asidi salgısında artış, IL-2 üretimi
M_2R	$G_{i/o}$	Kalp, atrium, ileum düz kası, SA nod	ACh salıverilmesi, kasılma kuvveti ve hızında azalma
M_3R	$G_{q/11}$	Mesane, iris sirküler kas, endotel, düz kas, tükürük bezleri, pankreas β hücreleri, lenfosit, keratinosit	Kasılma, NO bağımlı vazodilatasyon, apoptoz, migrasyon ve proliferasyonun inhibisyonu
M_4R	$G_{i/o}$	Corpus striatum, akciğer, keratinosit	Kasılma, NO bağımlı gevşeme, hücre migrasyonu
M_5R	$G_{q/11}$	Substantia nigra, ventral tegmental bölge	Büyüme ve proliferasyon

2.2.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

nAChR, asetilkolinin bağlandığı polipeptit yapıda reseptörlerdir. Nikotinik reseptör ismini muskarinik asetilkolin reseptörlerini uyarmayan, bunun yerine seçici olarak nikotinik reseptörlere bağlanan nikotinden alır (54). nAChR'ler, nöronal (Nn) ve musküler (Nm) olmak üzere iki alt tipe ayrılır. Nöronal tip santral ve periferik (otonom ganglion) sinir sisteminde bulunur. Musküler tip ise nöromusküler kavşakta yer alır.

İyonotropik reseptörler olarak nAChR'ler doğrudan iyon kanallarına bağlıdır. Yeni kanıtlar, bu reseptörlerin bazı durumlarda (metabotropik reseptörlerin yaptığı gibi) ikinci habercileri de kullanabileceğini göstermektedir (55).

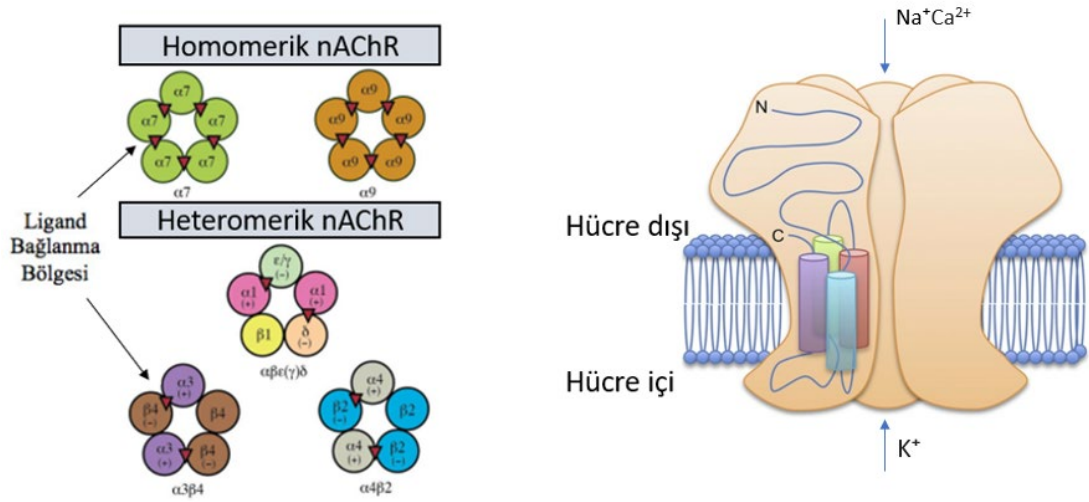
Nikotinik reseptörler 290 kDa moleküler kütleyle sahip olan, merkezi bir kanal etrafında simetrik olarak yerleşmiş beş alt birimden oluşur. Her nAChR pentameri, ligand bağlanmasında rol oynayan hücre dışı bir alandan, merkezi bir iyon kanalı olan transmembran alandan ve bir hücre içi alandan oluşur (56).

Her bir alt birim, ligand bağlanmasına katkıda bulunan uzun bir hücre dışı N-terminal ucundan, 4 hidrofobik transmembran sarmal alandan (M1-M4), M3 ve M4 arasında bir hücre içi döngüden ve kısa bir hücre dışı C-terminal ucundan oluşur (57). nAChR'ler, ligand kapılı iyon kanalı familyasının, katyonik 'Cys-loop' reseptörler grubundandır (58).

Musküler tip nAChR'lerin yetişkin formu $\alpha 1$, $\beta 1$, δ ve ϵ alt birimlerinden oluşur ve bu birimler 2:1:1:1 oranında ($(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$) bulunur. Embriyonik formunda ise $\alpha 1$, $\beta 1$, δ ve γ alt birimleri 2:1:1:1 oranında ($(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$) bulunur (59).

Nöronal tip nAChR'leri ise 11 farklı alt biriminin ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ ve $\beta 2$ - $\beta 4$) çeşitli kombinasyonlarıdır. $\alpha 8$ alt birimi insan veya memeli türlerinde bulunmaz. Nöronal tip nAChR'leri homomerik ve heteromerik olmak üzere 2 sınıfa ayrılırlar. Homomerik nAChR'nin pentamerik yapısı sadece α alt birimlerinden oluşurken ($(\alpha 7)_5, (\alpha 9)_5$), heteromerik olanlar hem α hem β alt birimlerine ($(\alpha 4)_3(\beta 2)_2, (\alpha 4)_2(\beta 2)_3, (\alpha 3)_2(\beta 4)_3$) sahiptir. Nikotinik nAChR'ye ligand bağlanabilmesi için α alt birimlerinden en az birini

bulundurması şarttır. Homomerik nAChR'nin tamamı α alt birimlerinden oluştuğu için bu reseptörlerin her birinde 5, heteromerik nAChR'nin ise her birinde 2 tane ligand bağlanma bölgesi bulunmaktadır (60).



Şekil 2.2. Nikotinik asetilkolin reseptör alt tipleri ve yapısı, (60, 61) numaralı kaynaklardan değiştirilerek alınmıştır.

Nöronal tip nAChR'lerin α alt birimi arttıkça bağlanma bölgesi ve kalsiyum geçirgenliği artmaktadır. β alt birimi artışı ise reseptörün asetilkoline karşı affinitesini artırmaktadır. Buna göre homomerik $\alpha 7$ nAChR'nin diğer alt tiplere göre kalsiyum geçirgenliği daha fazla, asetilkolin affinitesi ise daha düşüktür (62).

nAChR seçici olmayan bir katyon kanalıdır. Normal fizyolojik koşullarda, nAChR'deki iyon kanalının açılması için iki ACh molekülüne ihtiyaç vardır. Kanalın açılmasıyla pozitif yüklü iyonlar kanal boyunca hareket eder; sodyum hücreye girer ve potasyum çıkar. Pozitif yüklü iyonların net akışı içe doğrudur (63). Bazı alt birimleri kalsiyum için de geçirgendir (64). Ligand kapılı iyon kanalı üç yapısal durumda olabilir: kapalı, açık ve desensitize.

Nikotik reseptörlerin alt birimleri, bir multigen ailesine (insanlarda 16 üye) aittir ve alt birimlerin kombinasyonlarının birleşimi ile çok sayıda farklı reseptör oluşur. Oldukça değişken kinetik, elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip bu reseptörler, farklı konsantrasyonlardaki nikotine farklı yanıt verirler. Musküler tip nAChR her zaman postsinaptik yerleşimliken, nöronal tip nAChR postsinaptik ve presinaptik bölgede olabilir (65). nAChR alt birimleri, protein dizisindeki benzerliklere göre 4 alt aileye (I-IV) ayrılmıştır. Ek olarak, alt aile III'te 3 alt tip bulunur (66).

Tablo 2.3. Nikotik asetilkolin reseptör alt birimleri

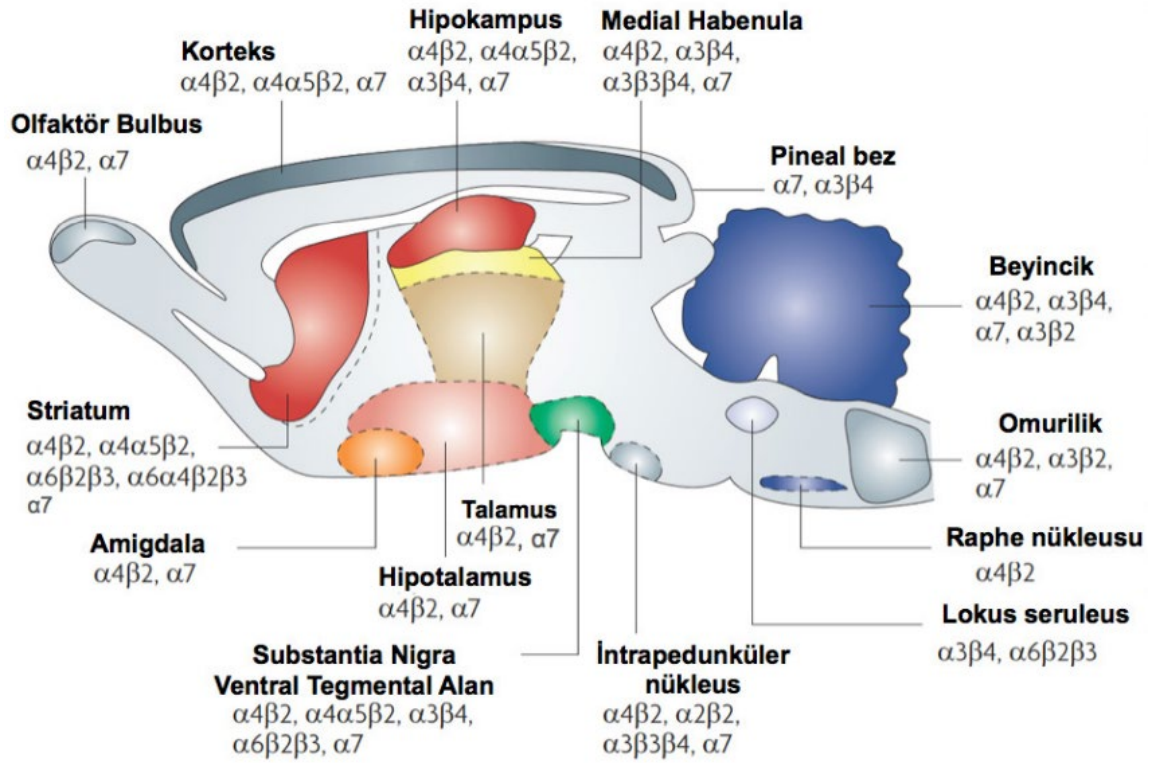
Nikotik Asetilkolin Reseptörleri					
Nöronal Tip					Musküler Tip
I	II	III			IV
$\alpha 9, \alpha 10$	$\alpha 7$	1	2	3	$\alpha 1, \beta 1, \delta, \epsilon, \gamma$
		$\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 6$	$\beta 2, \beta 4$	$\beta 3, \alpha 5$	

nAChR tipleri arasında en çok eksprese edilenler; $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ (musküler tip), $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ (gangliyon tipi), $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ (SSS tipi) ve $(\alpha 7)_5$ (SSS tipi)'dir. nAChR tiplerine ait özellikler Tablo 2.4'de gösterilmiştir (67-76).

Tablo 2.4. Nikotinik asetilkolin reseptörleri

Reseptör tipi	Yerleşim	Etki	Nikotinik agonistler	Nikotinik antagonistler
Musküler tip: ($\alpha 1$)₂$\beta 1\delta\epsilon$ veya ($\alpha 1$)₂$\beta 1\delta\gamma$	Nöromusküler bileşke	EPSP, Na ⁺ ve K ⁺ geçirgenliğini artırarak	Asetilkolin Karbakol Suksametyonyum	α -bungarotoksin α -konotoksin Tübokürarin Panküronyum Atraküryum
Gangliyon tipi: ($\alpha 3$)₂($\beta 4$)₃	Otonomik gangliyon	EPSP, Na ⁺ ve K ⁺ geçirgenliğini artırarak	Asetilkolin Karbakol Nikotin Epibatidin DMPP	Bupropiyon Dekstrometorfan Hekzametonyum Mekamilamin Trimetafan
Heteromerik SSS tipi: ($\alpha 4$)₂($\beta 2$)₃	Beyin	Post ve presinaptik uyarılma, Na ⁺ ve K ⁺ geçirgenliğini artırarak	Asetilkolin Epibatidin Nikotin Vareniklin Sitizin	α -konotoksin Dekstrometorfan Mekamilamin Bupropiyon
Diğer SSS tipi: ($\alpha 3$)₂($\beta 4$)₃	Beyin	Post ve presinaptik uyarılma	Asetilkolin Nikotin Sitizin Epibatidin	Hekzametonyum Dekstrometorfan Mekamilamin Bupropiyon Tübokürarin
Homomerik SSS tipi: ($\alpha 7$)₅	Beyin	Post ve presinaptik uyarılma, Na ⁺ , K ⁺ ve Ca ⁺² geçirgenliğini artırarak	Asetilkolin Kolin Nikotin Vareniklin Sitizin Epibatidin DMPP	α -bungarotoksin Amantadin Dekstrometorfan Mekamilamin Memantin

nAChR'lerin çeşitli formları olmasına rağmen, merkezi sinir sisteminde iki alt tipi yüksek oranda eksprese edilir. Bunlar; $\alpha 4\beta 2$ ve $\alpha 7$ alt birimleridir.



Şekil 2.3. Nöronal nikotinik asetilkolin reseptörlerinin beyinde dağılımı, (77) numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

2.2.3. $\alpha 7$ Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

$\alpha 7$ nAChR, beyinde bulunan ana reseptör alt tiplerinden biri olup öğrenme, sinaptik plastisite, hafıza, hareket, dikkat ve kaygı gibi fonksiyonlarda önemli role sahiptir (78). Bununla birlikte $\alpha 7$ nAChR dalak, cilt, pankreas, akciğer, T ve B lenfositler, makrofaj, dendritik hücre, astrosit, mikroglia, vasküler endotel olmak üzere çeşitli nöronal olmayan doku ve hücrelerde de eksprese edilir (79, 80). Son çalışmalar bu reseptörün retinadaki nöronların oluşumu için de önemli olduğunu göstermiştir (81).

$\alpha 7$ nAChR'ler kolinerjik antiinflamatuvar yolağın önemli bir parçasıdır. Farklı antiinflamatuvar özelliklere sahip $\alpha 7$ ligandları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla rapor edilmiştir (82). Yapılan çalışmalarda $\alpha 7$ "knockout" fare makrofajlarının kolinerjik agonistlere yanıt vermediği, TNF- α üretiminin nikotin ya da ACh ile inhibe edilemediği gösterilmiştir. Bu da kolinerjik antiinflamatuvar etkiye $\alpha 7$ nAChR'nin aracılık ettiği fikrini güçlendirir. Vagus sinirinin elektriksel uyarımı "wild type" farelerde endotoksin ile indüklenen serum TNF- α seviyelerinde önemli bir azalma sağlarken $\alpha 7$ "knockout" farelerde bu etki gözlenmemiştir (83). Agonist ligandların mikroglia ve astrositler tarafından eksprese edilen $\alpha 7$ nAChR'leri uyararak nöroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (84).

Kolinerjik antiinflamatuvar yolağın immünite ve inflamasyonda $\alpha 7$ nAChR'leri üzerinden rolü sepsis, iskemi/reperfüzyon, romatoid artrit, pankreatit, osteoartrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, diyabet, nöropsikiyatrik ve nörolojik bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli patolojilerde yeni tedavi olanakları ihtimalini güçlendirmektedir. $\alpha 7$ nAChR agonistleri Alzheimer, şizofreni ve depresyon gibi hastalıkların bilişsel semptomlarının tedavisi için de denenmiştir. Ayrıca bu reseptörlerin anjiyogenez, vasküler remodeling ve oksidatif vasküler stresle de ilişkili olduğu gösterilmiştir (85).

$\alpha 7$ nAChR'ler beş özdeş $\alpha 7$ alt birimden oluşan homopentamerik yapıdadır. Bazı karakteristik özellikleri ile diğer nikotidik alt tiplerden ayrılmaktadır. Bunlar; kalsiyuma karşı yüksek geçirgenlik, hızlı aktivasyon ve desensitizasyon fazı (milisaniyeler düzeyinde), ACh'e daha az duyarlılık, α -bungarotoksin ile selektif inhibisyon ve yüksek afinite, nikotin için düşük afinedir (84).

$\alpha 7$ reseptörleri nöronlarda postsinaptik, presinaptik veya perisinaptik yerleşimli olabilir. Hipokampus ve diğer bölgelerdeki GABAerjik ve glutamaterjik terminallerde presinaptik olarak lokalizedir ve nörotransmitterlerin saliverilmesini düzenler. Postsinaptik olarak hızlı sinaptik ilettime aracılık ederken, perisinaptik lokasyonlarda diğer nöronlardan gelen inputları ve çeşitli sinyal yollarını modüle eder (86).

$\alpha 7$ nAChR, insanlarda kromozom 15q14 *CHRNA7* geni tarafından kodlanan bir proteindir (87). $\alpha 7$ monomeri yaklaşık 50 kDa'dır ve 502 amino asitten oluşur (88). Alzheimer ve şizofreni hastalarında beyinde, özellikle hipokampusta $\alpha 7$ 'nin anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir (89). $\alpha 7$ geni şizofreni, bipolar bozukluk, otizm spektrum bozuklukları, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, epilepsi ile de bağlantılıdır (90). Sadece insanlarda bulunan, *CHRNA7*'nin kısmi delesyonu ile oluşan *CHRFAM7A* kimerik geni şizofreni ile ilişkilendirilmiştir. *CHRFAM7A* gen ürünü olan *dupa7*, ligand bağlanma bölgesinden yoksundur ve $\alpha 7$ 'nin negatif modülatörü olarak işlev görmektedir (91).

Son zamanlarda, iyon kanallarıyla içe doğru akımların oluşturduğu membran depolarizasyonuna ek olarak, hızlı katyon akışının G protein aracılığıyla farklı hücre içi sinyal iletim yollarını aktive edebileceği böylece daha uzun nöronal etkileri indükleyebileceği öne sürülmüştür. Nöronlarda iyonotropik ve metabotropik $\alpha 7$ nAChR fonksiyonları gözlenmiştir (92).

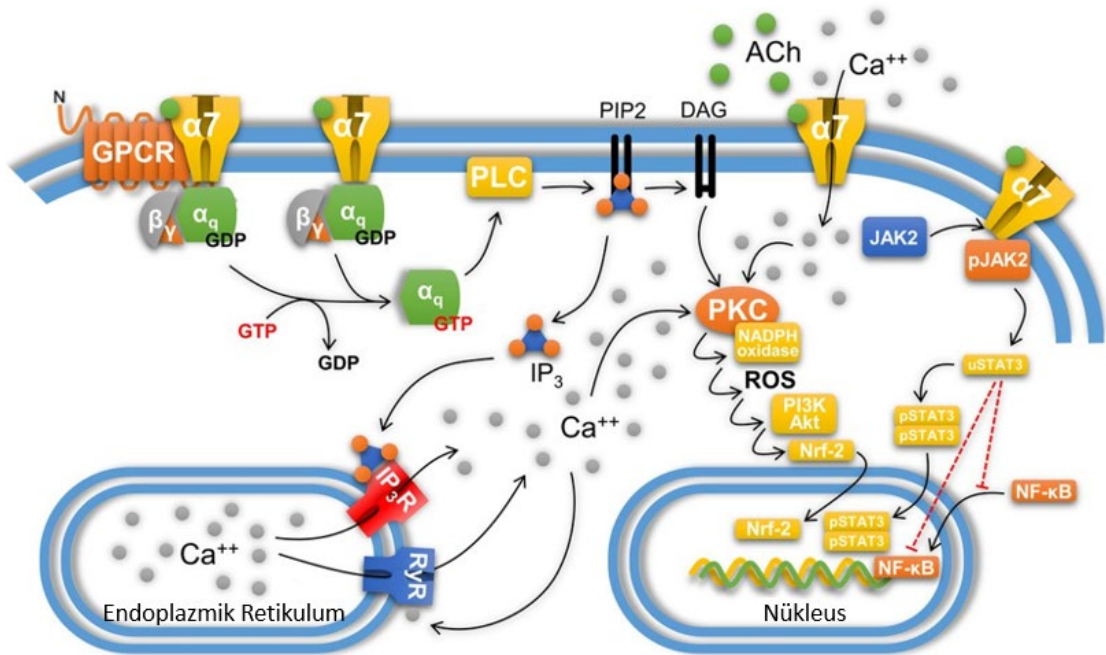
İyonotropik $\alpha 7$ nAChR'lerin aktivasyonu ile değişen hücre içi Ca^{+2} düzeyine, protein kinaz A (PKA) ve Ca^{+2} /kalmmodulin bağımlı protein kinaz enzimleri duyarlıdır. Bu kinazlar, sinaptik iyon kanallarının yanı sıra vezikül hareketini kontrol eden hücre iskelet proteinlerini düzenleyebilir (93). Ayrıca nöronda gen ekspresyonunu düzenleyerek hafıza ve öğrenmede önemli rol oynayan CREB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu kontrol eder (94).

İmmün ve glial hücreler gibi nöronal olmayan hücrelerde $\alpha 7$ nAChR aktivasyonunun aracılık ettiği metabotropik yollar tanımlanmıştır. $\alpha 7$ nAChR, hücre içi sinyal yolları olan JAK2/STAT3 ve PI3K/Akt ile antiinflamatuvar yanıtın oluşmasını sağlar (84). $\alpha 7$ reseptörün aktive olmasıyla hücre içinde kalsiyumun geçici artışı, IP3 reseptör aracılı kalsiyumun indüklediği kalsiyum saliverilme mekanizmasıyla sürekli bir kalsiyum yanıtına yol açabilir. Bir metabotropik reseptör olarak $\alpha 7$, $G\alpha$ ve $G\beta\gamma$ proteinlerine bağlanarak hücre içi sinyallere aracılık eder (95). $\alpha 7$ 'nin bazı immün

hücrelerde JAK2/STAT3'ü aktive ederek NF- κ B inhibisyonuna yol açtığı ve proinflamatuvar sitokin (TNF α , IL-1 β , IL-6) üretiminin azaldığı gösterilmiştir (96).

α 7, Nrf-2 (nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2)'nin nükleusa translokasyonunu destekleyen PI3K/Akt yolağını aktive ederek güçlü antiinflamatuvar etki oluşturmaktadır. Nrf2, antioksidan genlerin ekspresyonunu aktive ederek oksidanlara karşı hücrel direnç sağlar (97). Farede oluşturulan inme modelinde α 7nAChR agonisti PNU-282987 ile tedavinin nöroprotektif etkisinin olduğu gösterilmiştir (98).

α 7nAChR stimülasyonunun immün sistemde ve beyinde antiinflamatuvar ve antioksidan etkilere aracılık ettiği bilinmektedir (84).



Şekil 2.4. α 7 aktivasyonunun aracılık ettiği hücre içi sinyal yolağı, (99) numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. GPCR: G protein kenetli reseptör, PKC: protein kinaz C.

$\alpha 7$ nAChR agonistlerinin deneysel hayvan obezite modellerinde inflamasyonu baskıladığı, karaciğer, kas ve yağ dokuda insülin duyarlılığını artırdığı gözlemlenmiştir (100). Adipoz doku makrofajlarının proinflamatuvar olan M1 fenotipi TNF- α , IL-1 ve IL-6 sekrete eder. $\alpha 7$ nAChR agonistleri adipoz dokuda proinflamatuvar sitokinleri baskılamış, antiinflamatuvar mediyatörlerin aktivitesini artırmıştır (101). Özellikle MCP-1 (monosit kemoatraktan protein-1) kontrolündeki inflamatuvar monosit infiltrasyonunu etkisizleştirip, adipoz doku makrofajlarının birikmesini ve aktivasyonunu engeller (102).

Leptin reseptörü "knockout" db/db farelere $\alpha 7$ nAChR agonist TC-7020 uygulaması, dolaşımdaki TNF- α , glikoz ve trigliserit düzeylerinde azalma sağlamıştır (103). Başka bir çalışmada ise $\alpha 7$ nAChR "knockout" farelerde, insülin direnci, bozulmuş glikoz toleransı mevcutken, nikotinin proinflamatuvar sitokin inhibisyonunda azalma gösterilmiştir (102).

$\alpha 7$ nAChR yararlı etkilerinin dışında, yüksek seviyelerde ekspresyonunun akciğer, kolon ve mesane dokularında kanser hücresi proliferasyonunu ve metastazı desteklediği gösterilmiştir (104-106). $\alpha 7$ aktivasyonu anjiyogenez ve antiapoptotik etki ile ilişkilendirilmiştir (107). Bu nedenle $\alpha 7$ ekspresyonunun azaltılması veya inhibitörlerle tedavi, nikotinin proanjiyogenik etkilerini tersine çevirebilir ve kanser hücresi gelişimini inhibe edebilir (104, 105).

Medeiros ve diğ. (2014) deneysel Alzheimer hayvan modeli çalışmasında, $\alpha 7$ nAChR agonisti A-582941 ile tedavinin, öğrenme ve hafızada gelişme ile karakterize edilen nöronal koruyucu etkileri olduğunu göstermişlerdir (108).

Vagotominin sepsiste görülen sistemik inflamasyonu kötüleştirdiği artık iyi bilinmektedir. Bu nedenle vagus siniri tarafından uyarılan $\alpha 7$ nAChR aktivasyonu, sepsis tedavisi için potansiyel bir terapötik yaklaşım sağlayabilir (109). Yapılan bir çalışmada $\alpha 7$ nAChR antagonisti MLA (metillikakonitin) enjeksiyonunun, septik sıçanlarda mortaliteyi artırması $\alpha 7$ nAChR'nin sepsiste immünitelerde rolü olduğu şeklinde değerlendirilmiştir (110).

$\alpha 7$ nAChR ligandlarına ait örnekler Tablo 2.5'te belirtilmiştir (111, 112).

Tablo 2.5. $\alpha 7$ nAChR ligandları

Agonist	Pozitif Allosterik Modölatör (PAM)	Antagonist
ABBF	AVL-3288	ASS234
ABT-107	Bileşik 7z	Alfa-bungarotoksin
A-582941	JNJ-39393406	Bileşik 38
AQW051	Lu AF58801	Bileşik 7i
BMS-933043	PAM-2	Bileşik B10
BMS-902483	PNU-120596	Mecamylamin
GTS-21	NS-1738	tkP3BzPB
Encenicline	Galantamin	MLA
PNU-282987	İvermektin	
EVP-5141		
RG3487		
SEN-12333		
SSR-180711		
TC-5619		
Tropisetron		
Asetilkolin		
Nikotin		

Pozitif allosterik modölatör (PAM) agonistin affinitesini, effikasitesini ya da her ikisini birden artırarak reseptör yanıtını modüle eden bileşiklerdir. PAM'ların tek başlarına herhangi bir agonist aktivitesi yoktur, ancak ortosterik ligandın (agonist) kanal açma yeteneğini değiştirirler (113).

Bazı $\alpha 7nAChR$ agonistlerinin EC50 değerleri Tablo 2.6'da gösterilmiştir (114).

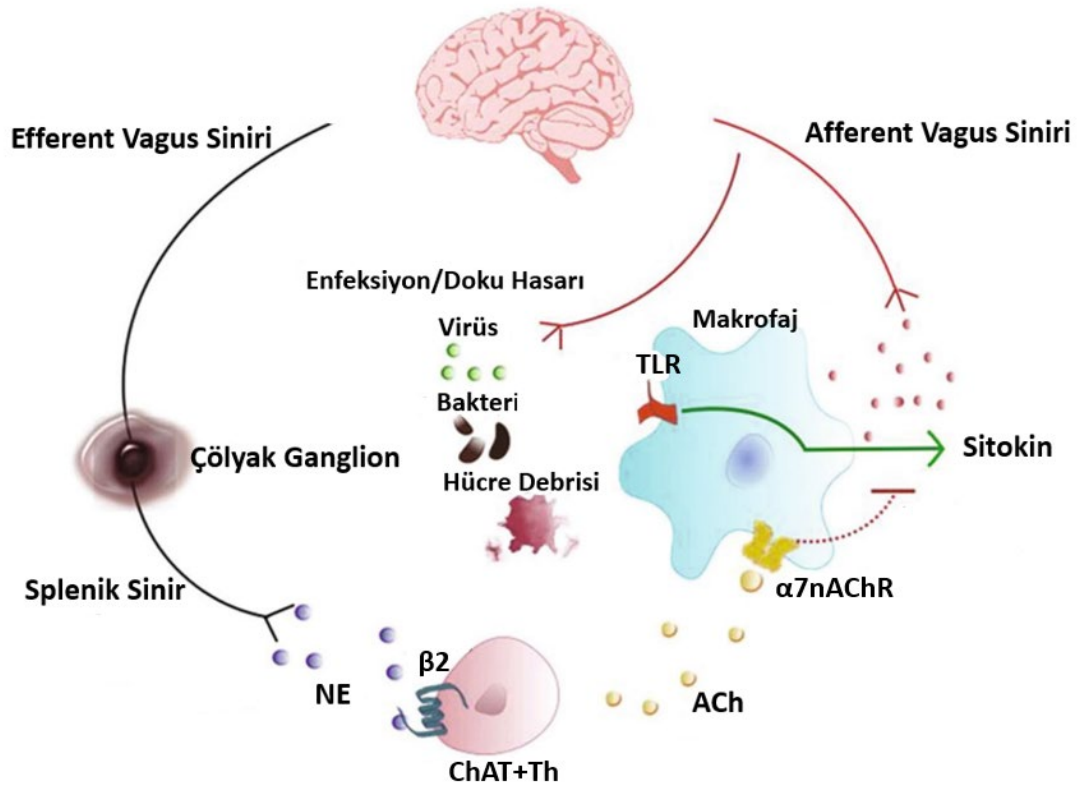
Tablo 2.6. $\alpha 7nAChR$ agonistleri ve EC50 değerleri

Agonist	Reseptör Seçiciliği	EC50/Sıçan (nM)	EC50/İnsan (nM)
GTS-21	Parsiyel agonist	310	2300
4-OH-GTS-21	Parsiyel agonist	170	450
PNU 282987	Tam agonist	27	-
PHA 543613	Tam agonist	8.8	-
PHA 709829	Tam agonist	3.4	-
ICH3	Parsiyel agonist	4.6	48.7
NS 6784	Tam agonist	3.3	-
NS 6740	Parsiyel agonist	1.1	-
BMS 933043	Parsiyel agonist	3.3	8.1

2.2.4. Kolinerjik Antiinflamatuvar Yolak

Kolinerjik antiinflamatuvar yolak (Cholinergic anti-inflammatory pathway; CAP), vagus siniri ve reseptörleri aracılığıyla proinflamatuvar sitokin saliverilmesini inhibe eden, yeni keşfedilen nroimmnomodlatr yoldur (115). Antiinflamatuvar etkiyi vagus siniri aracılığıyla immün hücrelerin farklılaşmasını sağlayarak ve işlevlerini düzenleyerek gösterir. $\alpha 7nAChR$, ACh aracılığıyla hücre içi moleküler olayları başlatan bu yolun temel bileşenidir (116). $\alpha 7nAChR$ aktivasyonunun sitokin profilini etkili bir şekilde değiştirebildiği, böylece lokal ve sistemik inflamasyon üzerine inhibitör etkisi olduğu belirtilmiştir (5). Sıçan endotoksemi modeliyle yapılan bir çalışmada, vagus sinirinin elektriksel uyarımıyla sistemik inflamatuvar yanıtın zayıfladığı, LPS ile indüklenen makrofajlarda ACh'in *in vitro* şartlarda konsantrasyona bağlı bir şekilde proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığı gösterilmiştir (117). Huston ve diğ. (2006)'e ait çalışmada splenektominin bu etkiyi dengelemesi, *in vivo* olarak endotoksemide CAP aktivasyonu ile ilişkili antiinflamatuvar etki için splenik sinirin gerekli olduğu şeklinde değerlendirilmiştir (118, 119).

Splenik sinir adrenerjik özellikli sinir olarak tanımlanır (120). Bu paradoksu açıklamak için Martelli ve diğ. (2014) vagus ve splenik sinir arasında nöral olmayan bir etkileşim teorisi öne sürdü. Buna göre, efferent vagus siniri çölyak ganglionunda sonlanırken sinir hücresi aksonları splenik siniri oluşturur. Vagus uyarımıyla splenik sinirden norepinefrin (NE) salıverilir ve T lenfositte bulunan β_2 reseptöre bağlanarak ChAT ekspresyonunu ve ACh üretimini indükler (121). Artan ACh lokal makrofajlarda α_7nAChR 'yi uyarır böylece TNF- α ve diğer birçok proinflamatuvar sitokin sentezi azalır (115).



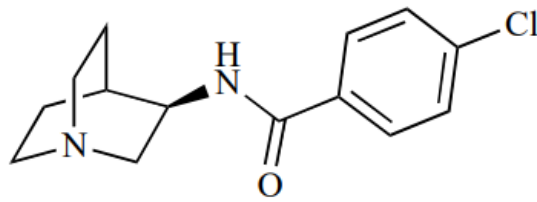
Şekil 2.5. Kolinerjik antiinflamatuvar yolak, (122) numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

İnflamatuvar refleks olarak da tanımlanan CAP yolağının afferent kısmında, PAMP veya proinflamatuvar sitokinlerin reseptörlerini (TLR4, IL-1 β R) içeren vagal afferentler ile NTS (nucleus tractus solitarius)'ye sinyal iletilir (123). NTS, servikal vagus sinirinin kolinerjik efferent lifleriyle çölyak ganglionu uyarır.

α 7nAChR "knockout" farelerde, insan makrofajlarında α 7'yi hedefleyen antisens oligonükleotitler ile yapılan deneylerde, endotoksin varlığında TNF- α inhibisyonunun olmadığı gösterilmiştir. İmmün hücrelerde diğer nAChR'lerin bulunmasına rağmen bu sonucun çıkması, CAP'da α 7nAChR'nin önemli rolü olduğunu desteklemektedir (124, 125).

2.2.5. PNU-282987

PNU-282987, nöral nikotinik asetilkolin reseptör α 7 alt tipinin potent ve selektif olan sentetik agonistidir. α 7nAChR, asetilkolin gibi endojen agonistler veya nikotin ve PNU-282987 gibi eksojen agonistler tarafından aktive edilebilir. PNU-282987'nin birçok hastalığın antiinflamatuvar etkisinde anahtar rol oynadığı yayınlarda bildirilmiştir (126, 127).



Şekil 2.6. PNU-282987'nin kimyasal yapısı (128).

Nikotine benzer şekilde PNU-282987'nin, insülin duyarlılığını artırdığı, bu etkinin $\alpha 7nAChR$ "knockout" farelerde kaybolduğu belirtilmiştir (129). Yüksek yağlı diyet ile beslenen $\alpha 7nAChR$ "knockout" farelerde hepatik insülin rezistansı, yağlanma ve inflamatuvar makrofaj infiltrasyonu hızlanır. Buna karşın yüksek yağlı diyet ile beslenen "wild type" farelerde PNU-282987 tedavisi ile karaciğer yağlanması azalmış ve inflamatuvar makrofaj infiltrasyonu gerilemiştir (130).

Gupta ve diğ. (2018) streptozosin ile oluşturulmuş diyabet modelinde, PNU-282987'nin pankreas β hücrelerinde apoptozu baskıladığını ve hiperglisemiye azalttığını gözlemişlerdir (131).

PNU-282987, iskemi-reperfüzyonla indüklenen beyin ve kalp hasarında, asit ile indüklenen akut akciğer hasarında ve radyasyonla ilişkili bağırsak hasarında görülen steril inflamasyonu hafifletir (132-134). LPS ile indüklenen endotoksemik sıçanlarda yapılan bir çalışmada PNU-282987, zonula okludens-1 (ZO-1) proteininin ekspresyonunu artırarak ve enterosit apoptozunu inhibe ederek bağırsak mukozal bariyer hasarı üzerinde koruyucu etkiler göstermiştir (135).

Farelerde oluşturulan LPS'in indüklediği akut akciğer hasarı modelinde, nötrofil, kollajen ve alveolar ödem artışı ile NF- $\kappa\beta$ aktivasyonuna yol açan M1 (proinflamatuvar) makrofaj artışı saptanmıştır. PNU-282987 tedavisinin alveolar ödemini hafiflettiği, nötrofil infiltrasyonunu ve kollajen birikimini inhibe ettiği, M1 (proinflamatuvar) makrofaj yüzdesini azaltıp, M2 (antiinflamatuvar) makrofaj oranını artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca bronkoalveolar lavaj sıvısında ölçülen TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IL-10 düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (136).

2.3. Hipotez

α 7nAChR selektif agonisti PNU-282987,

- Sepsisin sirkülatuvar bulgusu olan gastrointestinal sistem azalmış kan akımını artırır,
- Sepsis ilişkili organ (karaciğer ve dalak) hasarını azaltır,
- Sepsis patofizyolojisinde rol oynayan artmış inflamatuvar yanıtı baskılar.

2.4. Amaç

Bu çalışmada α 7nAChR agonisti PNU-282987'nin farede LPS (O111:B4) ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde, mezenter arter-portal ven kan akımı, organ (karaciğer ve dalak) hasarı ve sitokin düzeyleri ile oksidatif hasara etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

3. YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilip Hacettepe Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın hayvan barınağına getirilen, 12-20 haftalık, ağırlıkları 20-35 g arasında değişen, Swiss albino soyu erkek fareler kullanıldı. Hayvanlar yeni yerlerine getirildikten sonra en az 5 gün ortama alıştırdı. Deney süreci boyunca standart laboratuvar yemi ve su ile *ad libitum* beslendi. 18-21°C sıcaklıkta, %50-60 nem aralığında ve 12 saat karanlık/12 saat aydınlık uygulanan ortamda barındırıldı.

3.2. Etik Kurul İzni

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2022/03-07 karar no'lu, 29.03.2022 tarihli onayı ile Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

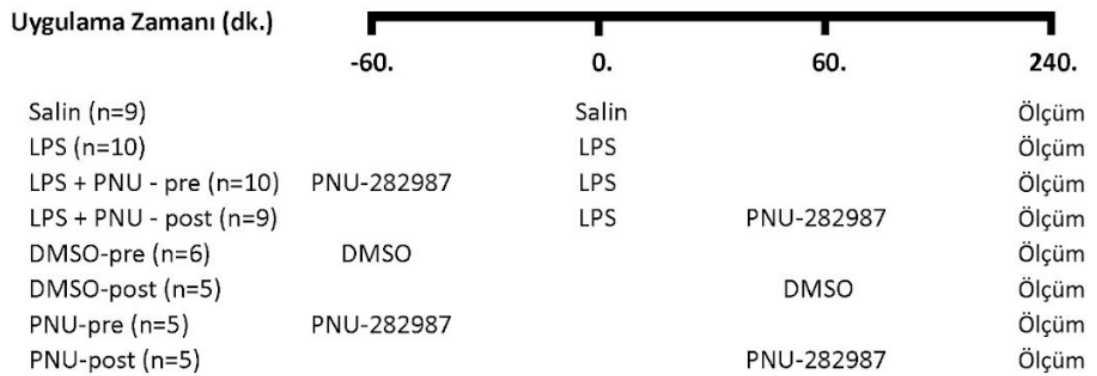
3.3. Deney Protokolü ve İlaç Uygulamaları

Deneylerde *Escherichia coli* O111:B4 serotipine ait lipopolisakarit (L2630, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), alfa-7 nikotinik asetilkolin reseptör agonisti PNU-282987 (SigmaAldrich, MO, ABD) ve kloralhidrat (MERCK KGaA, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. PNU-282987, LPS uygulamasından 1 saat önce 'LPS+PNU-pre' ve 1 saat sonra 'LPS+PNU-post' olmak üzere iki farklı zamanda, aynı dozda, farklı hayvan gruplarına uygulanarak tedavideki etkileri karşılaştırıldı. Deneylerde 59 adet erkek Swiss albino soyu fare kullanıldı. Hayvanlar 16 saat aç bırakıldıktan sonra deney protokollerine başlandı (137). Çalışmada kullanılan ilaçların dozları literatürdeki benzer çalışmalar referans alınarak belirlendi. LPS (O111:B4), salin (%0,9'luk NaCl) içerisinde çözülerek cerrahi uygulamadan 4 saat önce 12 mg kg⁻¹ dozda, 10 ml kg⁻¹ hacim içerisinde intraperitoneal (i.p.) yoldan verildi (138). PNU-282987, %1.8 DMSO

bulunan salin içerisinde çözüldü ve 3 mg kg^{-1} dozda, 10 ml kg^{-1} hacim içerisinde i.p. olarak uygulandı (138).

Bütün fareler 240. dk sonunda kloralhidrat (400 mg kg^{-1} , i.p.) ile anestezi altına alınarak cerrahi prosedürlere başlandı.

Çalışmada hayvanlar toplamda 8 gruba ayrıldı.



Şekil 3.1. Deney protokolü.

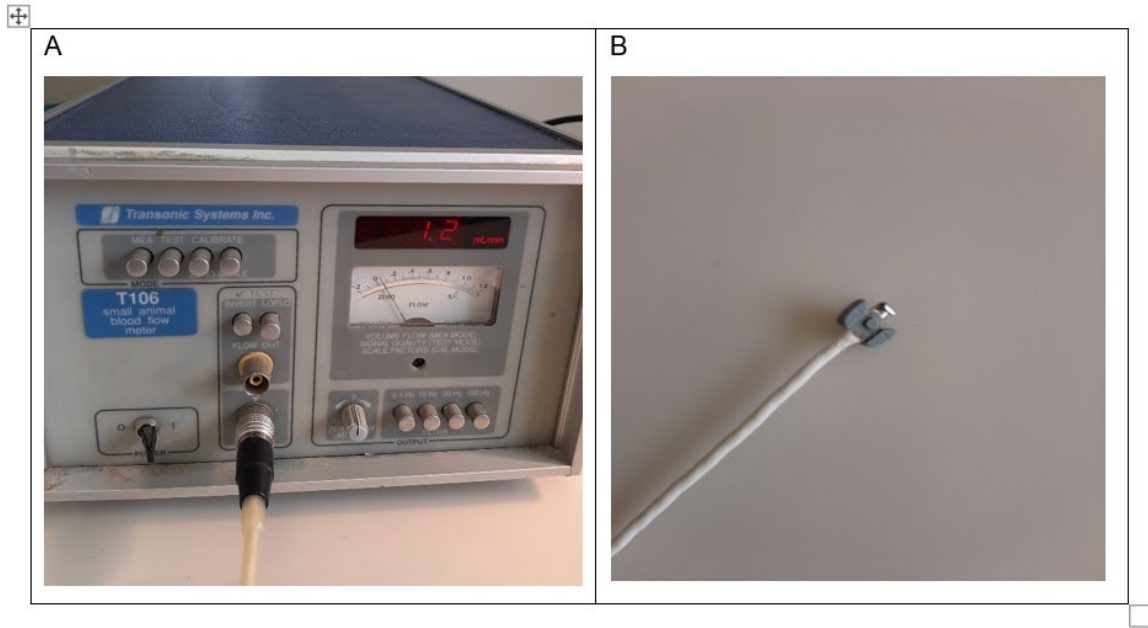
LPS + PNU-post grubundan 1 hayvanda PNU-282987 enjeksiyonu sonrasında mortalite gözlemlendi ve çalışma dışı bırakıldı.

3.4. Mezenter Arter ve Portal Ven Kan Akım Hızlarının Ölçümü

Uygulanan cerrahi yöntem daha önce birçok çalışmada laboratuvarlarımızda gerçekleştirilmiştir (139). Çalışmada kullanılan erkek Swiss albino fareler (20-35 g) kloralhidrat (400 mg kg^{-1} , i.p.) ile anestezi altına alındı. Anestezi derinliği parmak veya deri kıstırmaya yanıt ile değerlendirilerek cerrahi işleme başlandı. Hayvanların vücut sıcaklığı rektal termistör prob ile ölçülerek, hayvanın yaklaşık 35 cm yukarısında yerleşmiş olan 150 W'lık bir lamba ile 37°C 'de sabit kalması sağlandı.

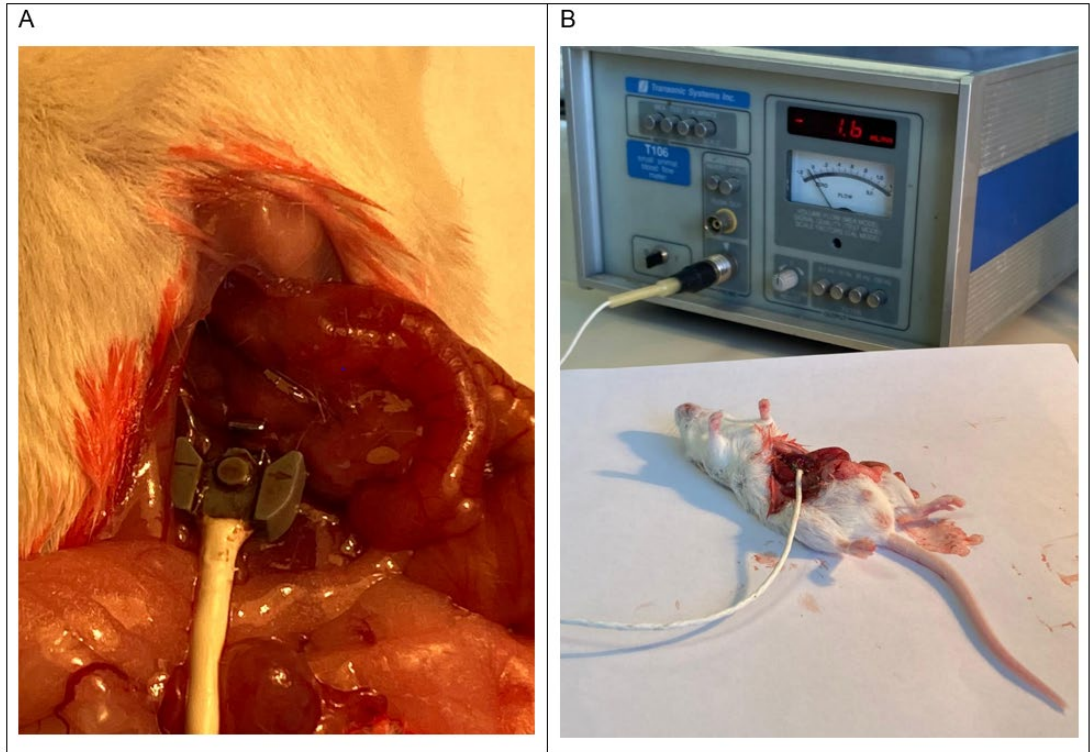
Umblikusun 1 cm altından, ksifoid–pubis hattı boyunca orta hat insizyonuyla karın boşluğuna girildi. Bağırsaklar orta hattın soluna alınıp, mezenter köküne inilerek superior mezenter arter bulundu. Daha sonra arter etrafındaki bağ dokudan izole edilerek akım ölçüm işlemine başlandı. Portal ven kan akımı ölçümünde karaciğer hafif kaldırıldı. Ven traseleri takip edilerek portal ven bulundu. Arterden farklı olarak venlerin daha frajil ve kanamaya yatkın olmasına dikkat edilerek portal ven diseke edildi. Ayrıca vendeki kan akımın arterdeki akıma göre ters yönde olmasından dolayı ölçümde eksi (-) değerler elde edildi (Şekil 3.3).

Doppler esasına göre akım algılayan bir damar probu (Perivascular Flow Probes, Transonic Systems) ile, akım hızı ölçen cihaz (Small animal blood flowmeter T 106X, Transonic Systems) aracılığıyla mezenter arter ve portal ven kan akım hızları ölçüldü ve kaydedildi.



Şekil 3.2. A. Doppler esasına göre akım hızı ölçen cihaz (Small animal blood flowmeter T106, Transonic Systems) **B.** Damar probu (Perivascular Flow Probes, Transonic Systems).

Çalışmada LPS grubunda 1 hayvanın mezenter arter kan akımı; LPS grubunda 2, salin grubunda ise 3 hayvanın portal ven kan akımları cerrahi sorunlar nedeniyle ölçülemedi. Mezenter arter ve portal ven kan akım hızları değerlendirilirken bu hayvanlar çalışma dışı bırakıldı, sitokin ölçümü ve histopatolojik incelemeye dahil edildi.



Şekil 3.3. A. Damar probu yardımıyla mezenter arter kan akım hızı ölçümü **B.** Portal ven kan akım hızı ölçümü- genel görünüm.

3.5. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Mezenter arter ve portal ven kan akım hızları ölçüldükten sonra toraks açılarak intrakardiyak ponksiyon ile kan alındı. Alınan kanlar biyokimya tüplerine konuldu. 3000 rpm 10 dk santrifüj edildikten sonra diğer kan materyallerinden ayrılan serum Eppendorf tüplere aktarıldı ve -80°C olan dondurucuda saklandı.

Karaciğer ve dalaktan alınan doku parçaları histopatolojik değerlendirme için %10'luk formaldehit solüsyonuna konuldu. Daha sonra toplanan tüm dokular Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na götürülerek analiz edildi. Kalan karaciğer ve dalak parçaları Eppendorf tüplere alınarak ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ölçümleri yapılana kadar -80°C'de dondurucuda muhafaza edildi.

3.6. ELISA Ölçümleri

Karaciğer ve dalak doku homojenatlarında IL-1 β , TNF- α , Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) düzeyi ölçümü için öncelikle protein miktar analizi yapıldı. Protein miktarı ölçümünde standart olarak bovine serum albümin (BSA), kimyasal olarak ise 'DC Protein assay reagent A Bio-Rad', 'DC Protein assay reagent B Bio-Rad', 'DC Protein assay reagent S Bio-Rad', 'Protein assay dye reagent Bio-Rad' kullanıldı. Hücre lizatları içerisindeki proteinlerin miktar analizi Bio-Rad deterjan uyumlu ölçüm sistemi (Bio Rad DC) ile yapıldı. Bu sistemin temeli proteinlerin bakır ile kompleks oluşturması ve sonrasında Folin reaktifinin bu kompleks tarafından indirgenmesine dayanan kolorimetrik bir ölçme yöntemidir. Bu sistem tüm çalışmalarda standart olarak kullanılan ticari kit ürünleri ile yapılmaktadır. 750 nm dalga boyunda Bio-Rad standart sığır serum albümin ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Regresyon denklemi ve tanımlayıcılık katsayısı hesaplanarak regresyon denkleminde proteinlerin miktar tayini yapıldı.

IL-1 β (Elabscience E-EL-M0037), TNF- α (Abcam ab208348), TAS (SunRed, 201-11-2672), TOS (SunRed, 201-11-1669) ölçümleri için ticari ELISA kitleri kullanıldı. Kullanılan ELISA kitleri, Sandwich-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. İşleme başlamadan önce bütün preparatlar oda sıcaklığına getirildi. Kitlerde bulunan mikro ELISA plakası, araştırılan interlökinine özgü bağlanan bir antikor ile kaplıdır. Standartlar ile 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilen doku homojenatları antikor kaplı mikro ELISA plakası kuyucuklarına eklendi ve kitlerin prosedürlerinde belirtilen sürede inkübe edildi. Antijen-antikor kompleksi oluşuktan sonra bağlanmamış proteinler yıkama basamakları ile ortamdan uzaklaştırıldı ve hemen ardından araştırılan interlökinine

spesifik biyotinlenmiş tespit antikoru her bir plakaya eklendi. Prosedürde belirtilen süre kadar solüsyon aspire edildi ve plakalar absorbent kağıdı ile kurulandı. Yıkama işleminden sonra Horseradish Peroksidaz (HRP) eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Serbest bileşenler yıkandıktan sonra substrat solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. Işıktan etkilenmeyecek şekilde kapatılarak inkübe edildi. İzleminde enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözültisi eklenerek reaksiyon sona erdirildi. Renk değişimi gözlenmiş olan plakalarda optik yoğunluğu (OD) belirleyebilmek için spektrofotometri (Multiskan Go, Thermo) kullanılarak 450nm’de ölçüm yapıldı. Numunelerin OD değerleri standart eğri ile karşılaştırılarak tespit edilen antijene ait konsantrasyon hesaplandı.

3.7. Histopatolojik Analiz

Deney ve kontrol gruplarına ait karaciğer ve dalak örnekleri %10'luk tamponlu nötral formalinde 48 saat tespit edildikten sonra Leica TP1020 Doku Takip Cihazı ile rutin histolojik doku takip yöntemine göre takip edildi. Doku takibi sırasında dokular artan derecelerde alkollerden (%70, %80, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildiler. Dehidratasyonu takiben ksilolde şeffaflandırılan dokular parafine alıştırıldıktan sonra parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica SM2000R kızaklı mikrotomla 4 mikrometre kalınlığında kesilen kesitler, lamlara alındı. Kesitler hematoksilin eozin ve fibrozisi göstermek için 'mallory trikrom' ile boyandıktan sonra aydınlık alan mikroskobunda (Leica DM6000 B) incelendi ve görüntüler Leica DCF7000 T kamera yardımıyla bilgisayara aktarılarak fotoğraflandı.

Örneklerin değerlendirilmesinde karaciğerde hepatositlerde dejenerasyon, santral ven ve sinüzoidlerde dilatasyon ve staz, fibrozis ve infiltratif hücre varlığına bakıldı. Alınan seri kesitlerde rastgele beş farklı alanda iki farklı histolog tarafından birbirlerinden bağımsız nekrotik hücre sayımı yapılarak ortalaması alındı. Değerlendirme kriteri Tablo 3.1’de görülmektedir.

Tablo 3.1. Fare karaciğer doku kesitlerinde nekrotik hücre sayımı

Nekrotik hücre \leq alandaki toplam hücrenin %25'i	+
Nekrotik hücre alandaki toplam hücrenin %25-50'i	++
Nekrotik hücre alandaki toplam hücrenin %50-75'i	+++
Nekrotik hücre \geq alandaki toplam hücrenin %75'i	++++

Dalakta beyaz ve kırmızı pulpa değerlendirilirken konjesyon, staz ve dev hücre varlığına bakıldı. Alınan seri kesitlerde rastgele beş farklı alanda iki farklı histolog tarafından birbirlerinden bağımsız dev hücre sayımı yapılarak ortalaması alındı. Değerlendirme kriteri Tablo 3.2'de görülmektedir.

Tablo 3.2. Fare dalak doku kesitlerinde dev hücre sayımı

Dev hücre \leq alandaki toplam hücrenin %25'i	+
Dev hücre alandaki toplam hücrenin %25-50'i	++
Dev hücre alandaki toplam hücrenin %50-75'i	+++
Dev hücre \geq alandaki toplam hücrenin %75'i	++++

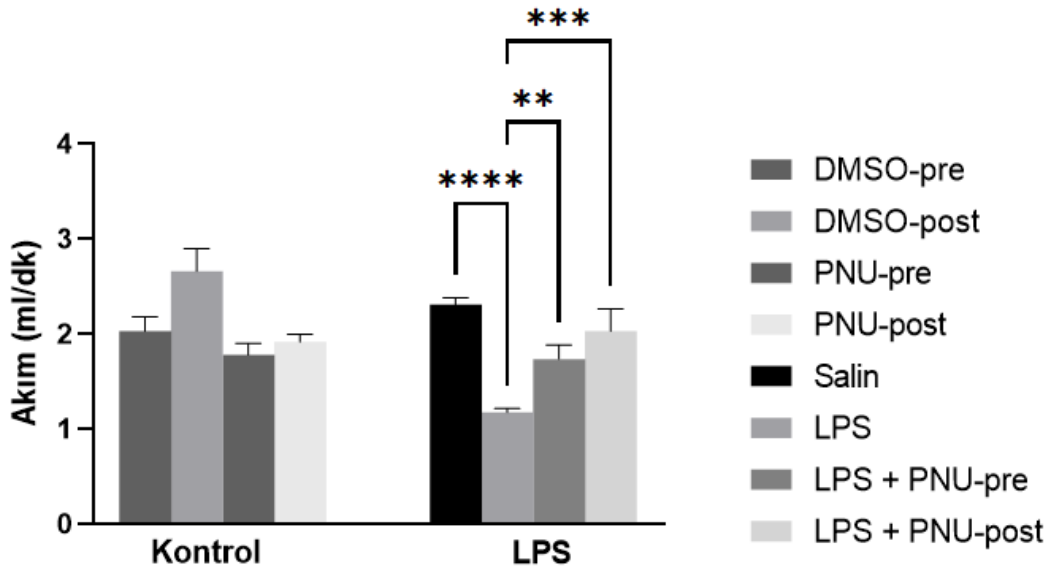
3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Graphpad Prism versiyon 9.0.0.(121) ve Microsoft Excel 2019 yazılımları kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm data aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (Histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) incelendi. Hipotez testlerinde bağımsız gruplarda tek yönlü varyans analizi ile değerlendirme yapıldı. Post-hoc Newman-Keuls çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. *P* değerinin 0,05'den küçük olduğu durumlarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu şeklinde yorumlandı.

4. BULGULAR

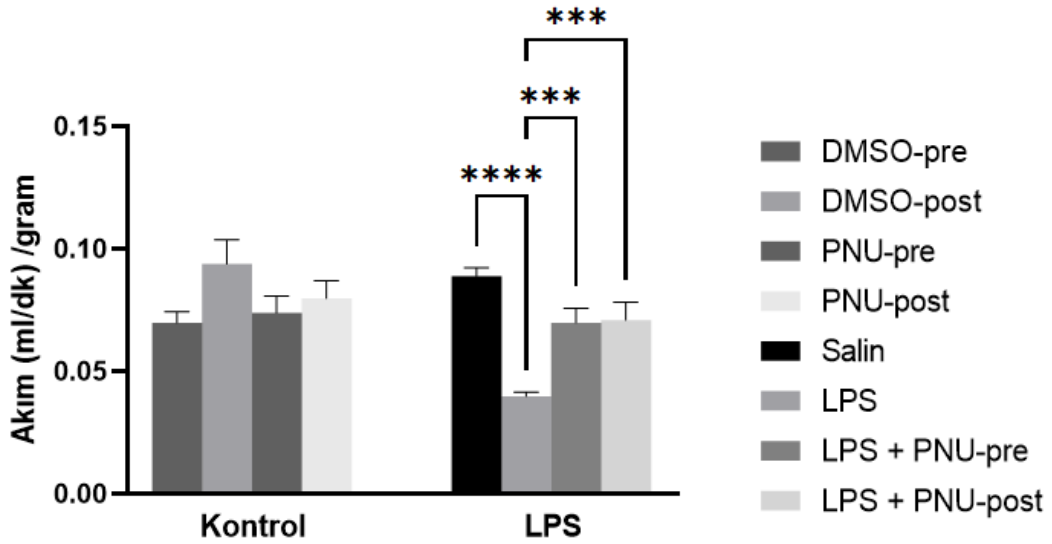
4.1. PNU-282987'nin Farede Ölçülen Mezenter Arter Kan Akımına Etkileri

Anestezi altındaki farelerde ölçülen mezenter arter kan akım hızının LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 4.1), LPS uygulanan hayvanlarda mezenter arter kan akım hızı, salin grubundaki hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı (salin: $2,31 \pm 0,07$, LPS: $1,17 \pm 0,04$, $p < 0,0001$). LPS+PNU-pre grubunda mezenter arter kan akım hızı LPS grubuna göre anlamlı şekilde arttı (LPS+PNU-pre: $1,74 \pm 0,14$, $p < 0,001$). LPS+PNU-post grubunda mezenter arter kan akım hızı LPS grubuna göre anlamlı şekilde arttı (LPS+PNU-post: $2,03 \pm 0,23$, $p < 0,0002$). Kontrol grupları ile salin grubu arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.1. Mezenter arter kan akım hızı (ml/dk) değerleri. Veri aritmetik ortalama±ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$. (n=9 salin, n=6 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=9 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)

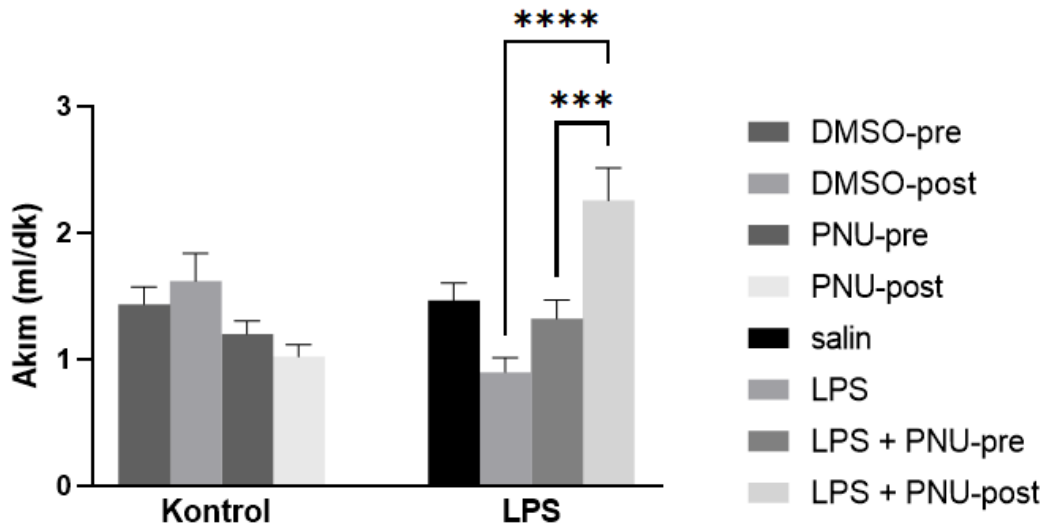
Mezenter arter kan akım hızının fare ağırlığına oranının, LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.2), LPS uygulanan hayvanlarda mezenter arter kan akım hızı, salin grubundaki hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı (salin: $0,08 \pm 0,003$, LPS: $0,04 \pm 0,001$, $p < 0,0001$). LPS+PNU-pre grubunda mezenter arter kan akım hızı LPS grubuna göre anlamlı şekilde arttı (LPS+PNU-pre: $0,07 \pm 0,005$, $p < 0,0002$). LPS+PNU-post grubunda mezenter arter kan akım hızı LPS grubuna göre anlamlı şekilde arttı (LPS+PNU-post: $0,07 \pm 0,007$, $p < 0,0002$). Kontrol grupları salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.2. Gram başına mezenter arter kan akım hızı (ml/dk.gr) değerleri. *Data aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$. (n=9 salin, n=6 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=9 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

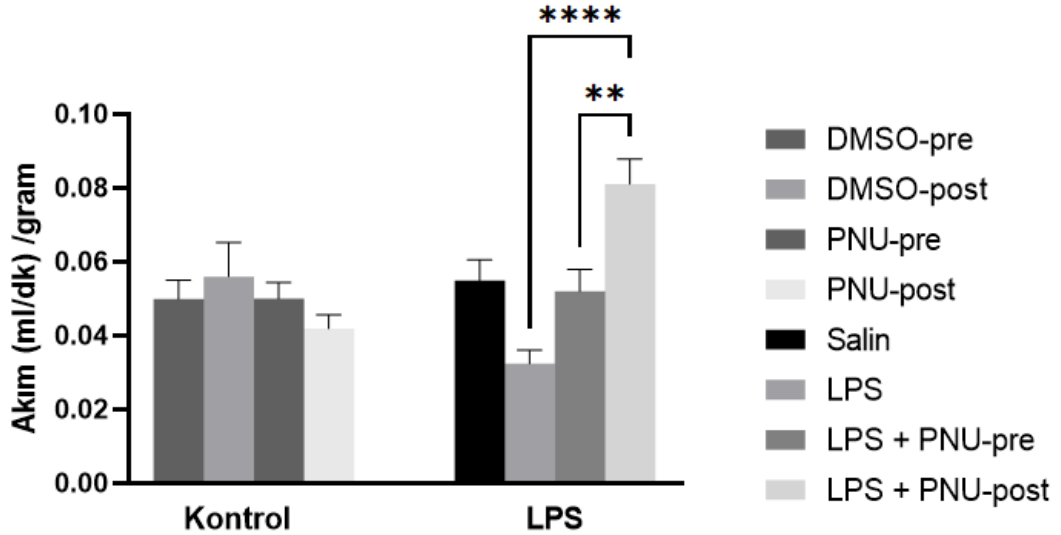
4.2. PNU-282987'nin Farede Ölçülen Portal Ven Kan Akımına Etkileri

Anestezi altındaki farelerde ölçülen portal ven kan akım hızının LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 4.3), LPS uygulanan grupta kan akımında salin grubuna göre azalma olmasına rağmen bu azalmada istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (salin: $1,46 \pm 0,13$, LPS: $0,9 \pm 0,11$). LPS+PNU-post grubunda portal ven kan akım hızı LPS grubuna göre anlamlı şekilde arttı (LPS: $0,9 \pm 0,11$, LPS+PNU-post: $2,25 \pm 0,25$, $p < 0,0001$). LPS+PNU-post grubunda portal ven kan akım hızı LPS+PNU-pre grubuna göre de anlamlı şekilde arttı (LPS+PNU-pre: $1,32 \pm 0,14$, $p < 0,0002$). LPS+PNU-pre grubunda LPS'e göre anlamlı artış gözlenmedi. Kontrol grupları salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.3. Portal ven kan akım hızı (ml/dk) değerleri. *Data aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$. (n=6 salin, n=6 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=8 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

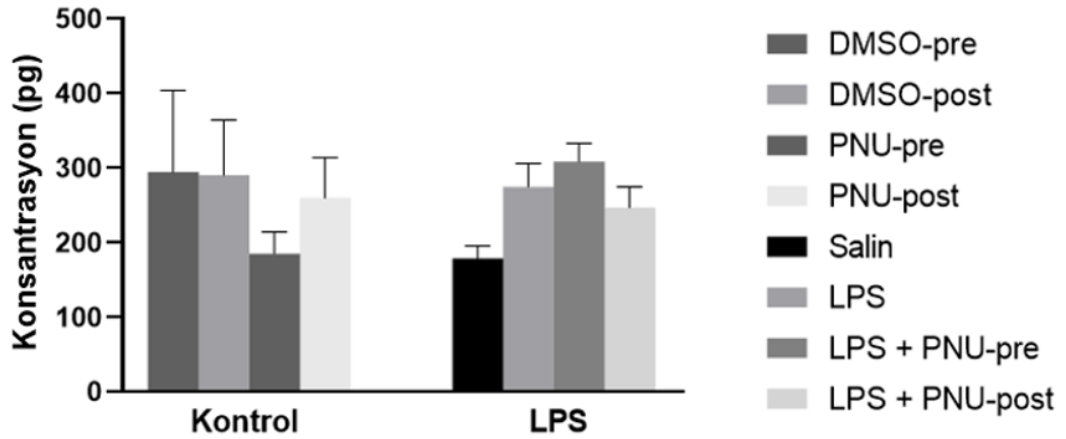
Portal ven kan akım hızının fare ağırlığına oranının LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.4), LPS uygulanan grupta kan akım hızında azalma olmasına rağmen salin grubuna göre istatistiksel anlamlılık gözlenmedi. LPS+PNU-post grubunda portal ven kan akım hızı LPS grubuna göre anlamlı şekilde arttı (LPS: $0,03 \pm 0,003$, LPS+PNU-post: $0,08 \pm 0,006$, $p < 0,0001$). LPS+PNU-post grubunda portal ven kan akım hızı LPS+PNU-pre grubuna göre de anlamlı şekilde arttı (LPS+PNU-pre: $0,05 \pm 0,005$, $p < 0,001$). LPS+PNU-pre grubu ile LPS grubu arasında fark gözlenmedi. Kontrol grupları salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.4. Gram başına portal ven kan akım hızı (ml/dk.gr) değerleri. *Data aritmetik ortalama±ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. ** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (n=6 salin, n=6 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=8 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.3. PNU-282987'nin Fare Karaciğer Örneklerinde Ölçülen TNF- α Düzeyine Etkileri

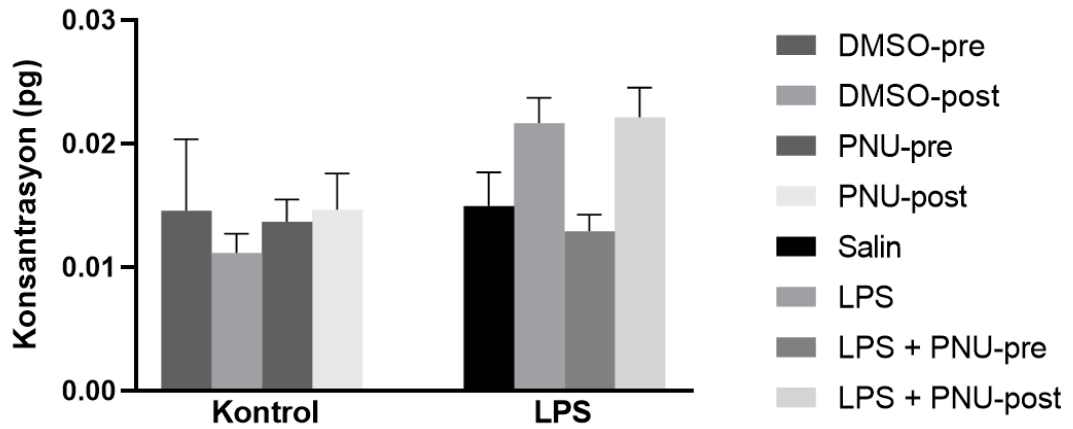
Fare karaciğer örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen TNF- α konsantrasyonu, homojenize edilen dokudaki total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. TNF- α konsantrasyonunun LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.5), salin grubuyla LPS grupları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.5. Fare karaciğer örneklerinde ölçülen TNF- α konsantrasyonu (pg). *Data aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. (n=9 salin, n=4 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=10 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.4. PNU-282987'nin Fare Dalak Örneklerinde Ölçülen TNF- α Düzeyine Etkileri

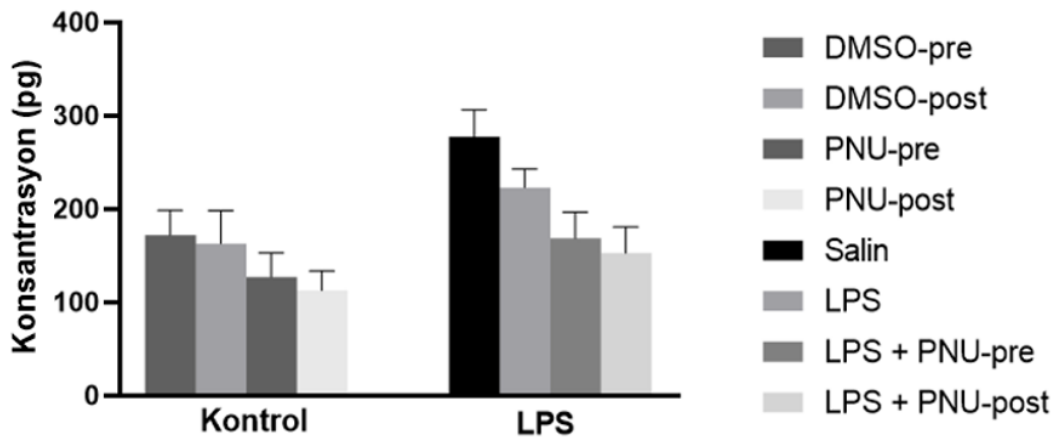
Fare dalak örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen TNF- α konsantrasyonu, homojenize edilen dokudaki total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. TNF- α konsantrasyonunun LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.6), salin grubuyla LPS grupları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.6. Fare dalak örneklerinde ölçülen TNF- α konsantrasyonu (pg). *Data aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. (n=9 salin, n=5 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=10 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.5. PNU-282987'nin Fare Karaciğer Örneklerinde Ölçülen IL-1 β Düzeyine Etkileri

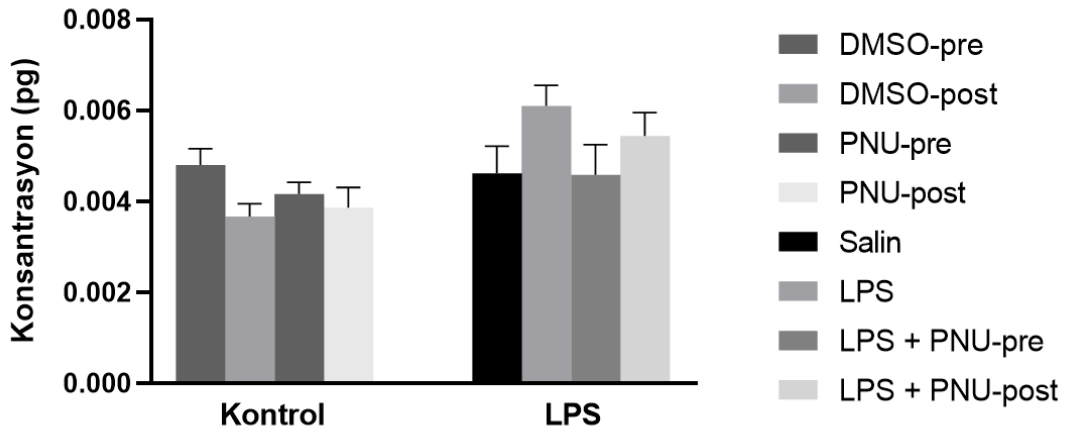
Fare karaciğer örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen IL-1 β konsantrasyonu, homojenize edilen dokudaki total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. IL-1 β konsantrasyonunun LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.7), salin grubuyla LPS grupları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.7. Fare karaciğer örneklerinde ölçülen IL-1 β konsantrasyonu (pg). *Data aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. (n=9 salin, n=5 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=10 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.6. PNU-282987'nin Fare Dalak Örneklerinde Ölçülen IL-1 β Düzeyine Etkileri

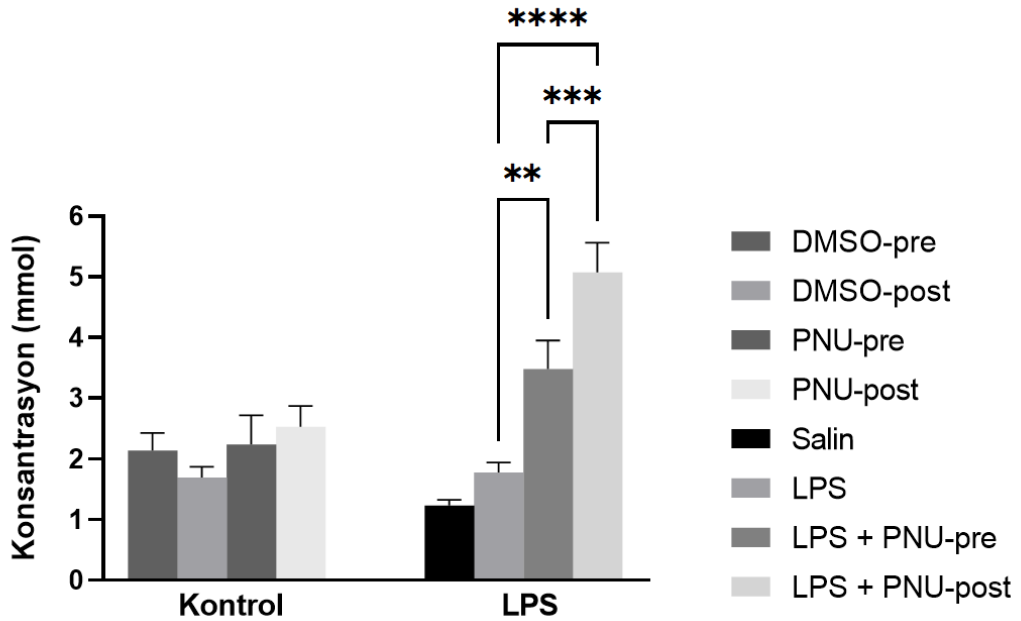
Fare dalak örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen IL-1 β konsantrasyonu, homojenize edilen dokudaki total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. IL-1 β konsantrasyonunun LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.8), salin grubuyla LPS grupları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.8. Fare dalak örneklerinde ölçülen IL-1 β konsantrasyonu (pg). *Data aritmetik ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. (n=9 salin, n=5 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=10 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.7. PNU-282987'nin Fare Karaciğer Örneklerinde Ölçülen TAS Düzeyine Etkileri

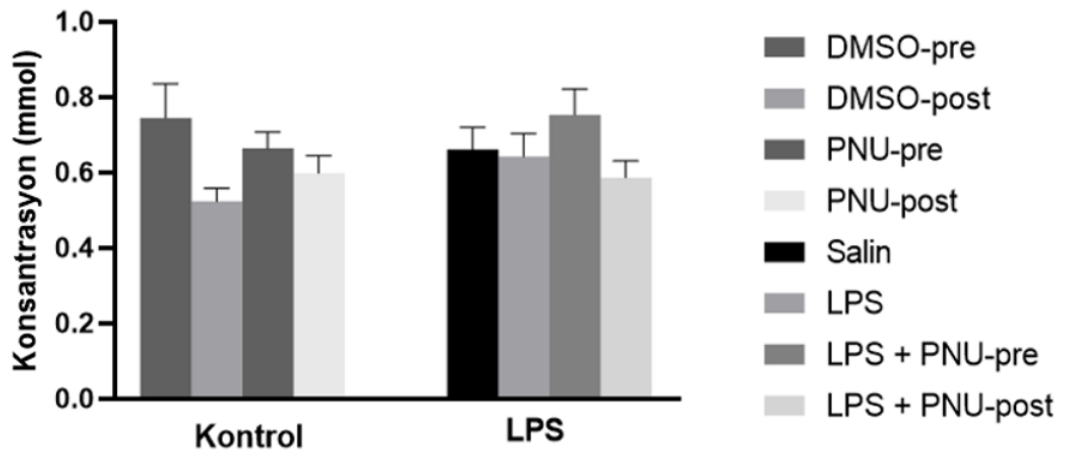
Fare karaciğer örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen TAS konsantrasyonu, homojenize edilen dokudaki total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. TAS konsantrasyonunun LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.9), LPS uygulanan grupla salin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. LPS+PNU-pre grubunda TAS konsantrasyonu LPS grubuna göre anlamlı şekilde arttı (LPS: $1,77 \pm 0,16$, LPS+PNU-pre: $3,48 \pm 0,46$, $p<0,001$). LPS+PNU-post grubunda da TAS konsantrasyonu LPS grubuna göre anlamlı şekilde arttı (LPS+PNU-post: $5,07 \pm 0,48$, $p<0,0001$). LPS+PNU-post grubunda TAS konsantrasyonu, LPS+PNU-pre grubuna göre anlamlı şekilde arttı ($p<0,0002$). Kontrol grupları salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.9. Fare karaciğer örneklerinde ölçülen TAS konsantrasyonu (mmol). *Data aritmetik ortalama±ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. ** $p<0,001$, *** $p<0,0002$, **** $p<0,0001$. (n=9 salin, n=5 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=10 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.8. PNU-282987'nin Fare Dalak Örneklerinde Ölçülen TAS Düzeyine Etkileri

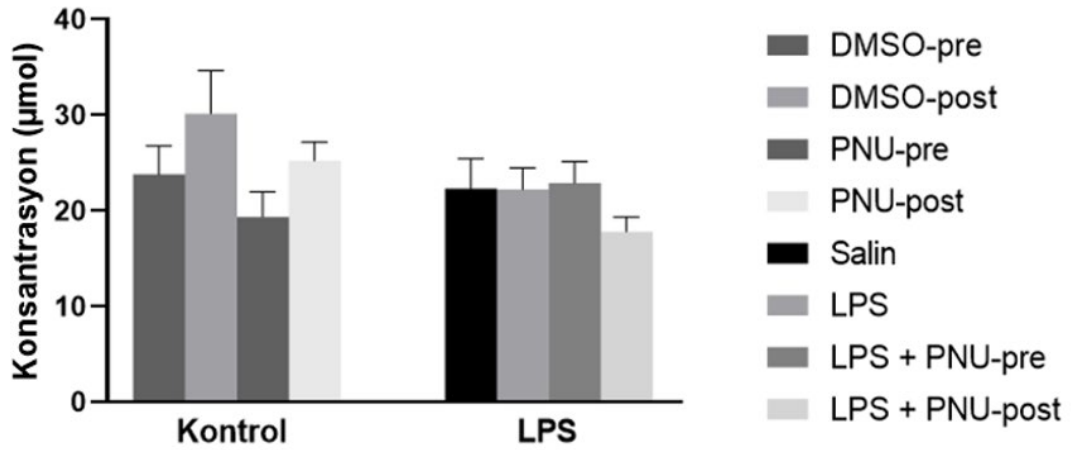
Fare dalak örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen TAS konsantrasyonu, homojenize edilen dokudaki total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. TAS konsantrasyonunun LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.10), salin grubuyla LPS grupları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.10. Fare dalak örneklerinde ölçülen TAS konsantrasyonu (mmol). *Data aritmetik ortalama±ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. (n=9 salin, n=5 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=10 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.9. PNU-282987'nin Fare Karaciğer Örneklerinde Ölçülen TOS Düzeyine Etkileri

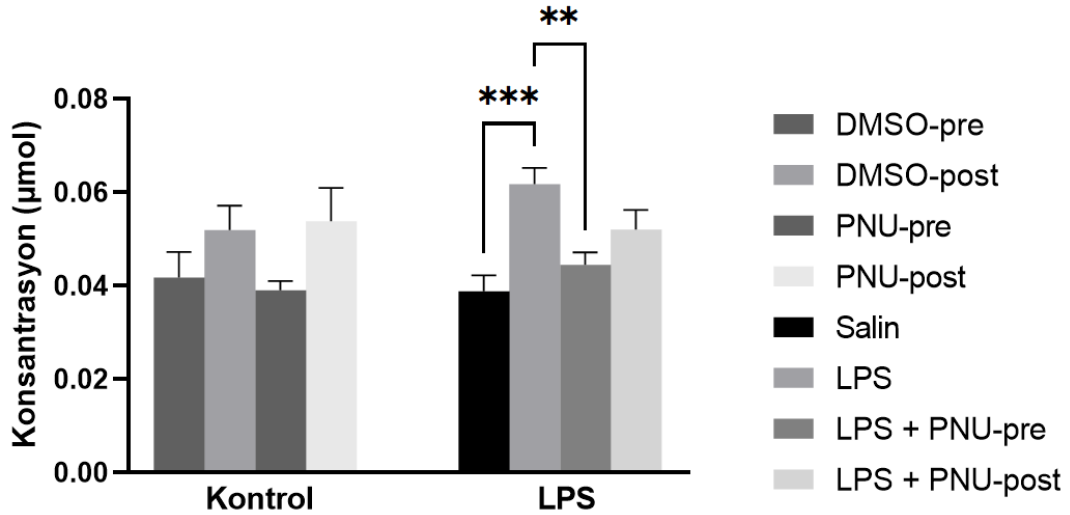
Fare karaciğer örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen TOS konsantrasyonu, homojenize edilen dokudaki total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. TOS konsantrasyonunun LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.11), salin grubuyla LPS grupları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.11. Fare karaciğer örneklerinde ölçülen TOS konsantrasyonu (µmol). *Data aritmetik ortalama±ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. (n=9 salin, n=5 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=10 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.10. PNU-282987'nin Fare Dalak Örneklerinde Ölçülen TOS Düzeyine Etkileri

Fare dalak örneklerinde ELISA metoduyla ölçülen TOS konsantrasyonu, homojenize edilen dokudaki total protein miktarına oranlanarak hesaplandı. TOS konsantrasyonunun LPS varlığında değişimi ve bu değişim üzerine PNU-282987 etkisi incelendiğinde (Şekil 4.12), LPS uygulanan grupta TOS konsantrasyonu salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı (salin: $0,03 \pm 0,003$, LPS: $0,06 \pm 0,003$, $p < 0,0002$). LPS+PNU-pre grubunda TOS konsantrasyonu LPS grubuna göre anlamlı şekilde azaldı (LPS+PNU-pre: $0,04 \pm 0,002$, $p < 0,001$). Kontrol grupları salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu.



Şekil 4.12. Fare dalak örneklerinde ölçülen TOS konsantrasyonu (µmol). *Data aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) şeklinde verildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Newman-Keuls post-hoc testleri kullanıldı. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0002$. (n=9 salin, n=5 DMSO-pre, n=5 DMSO-post, n=5 PNU-pre, n=5 PNU-post, n=10 LPS, n=10 LPS+PNU-pre, n=9 LPS+PNU-post grupları için)*

4.11. PNU-282987'nin Karaciğer ve Dalak Hasarına Histopatolojik Etkileri

4.11.1. Salin Grubu

Karaciğerde hepatositlerin çoğu sağlıklıydı. Örneklerin çoğunda az sayıda hepatositin nekrotik olduğu görüldü. Ancak az sayıda hepatositte dejenerasyon izlendi. İki örnek dışında bazı santral venlerde staz izlenirken sinuzoidlerde staz olmadığı dikkati çekti (Şekil 4.13A). Fibrozis saptanmadı.

Dalakta kırmızı pulpada venöz sinuslerde üç örnekte dilatasyon ve staz saptanmazken 6 örnekte sepsis grubundaki kadar ileri derecede olmamakla birlikte yer yer dilatasyon ve staz belirgindi. İki örnekte çok sayıda dev hücre izlenirken diğer örneklerde venöz sinus komşuluğunda az sayıda dev hücre izlendi (Şekil 4.13B). Fibrozis saptanmadı.

4.11.2. LPS Grubu

Normal karaciğer yapısında izlenen santral venden periferine doğru uzanan hepatosit hücre kordonları seçilemedi, hücreler arası bağlantılar bozulmuştu. Hepatositlerin çoğunda piknotik çekirdekler vardı, bir kısım hepatositte ise çekirdek bütünlüğünün de bozulduğu dikkati çekti. Özellikle santral ven çevresindeki hepatositlerde daha fazla olmakla birlikte hepatositlerin büyük çoğunluğunda şişme, balon dejenerasyonu izlendi. Yer yer çok sayıda nekrotik hücre ile dolu alanlar dikkati çekti. Santral venlerin çoğunda konjesyon ve staz izlenirken sinuzoidlerde hafif staz vardı (Şekil 4.13C). Fibrozis saptanmadı.

Dalakta kırmızı pulpada venöz sinuslerde ileri derecede dilatasyon ve staz izlendi. Çok sayıda infiltratif hücre ve venöz sinüs komşuluğunda çok sayıda dev hücre dikkati çekti (Şekil 4.13D). Fibrozis saptanmadı.

4.11.3. LPS+PNU-pre Grubu

Karaciğerde sepsis grubuna benzer şekilde özellikle santral ven çevresinde piknotik çekirdekli hepatositlerle birlikte balon dejenerasyonun izlendiği hepatositler dikkati çekti. Hepatositlerde hücre bütünlüğünün bozulduğu ve hücrelerarası bağlantıların kopuk olduğu gözlemlendi. Santral venlerde üç örnek dışında staz izlenmedi. İncelen örneklerin dördünde sepsis grubuna göre daha az sayıda sinuzoidde staz vardı. Dört örnekte ise sinuzoidlerde staz izlenmedi. Bir örnekte ise bazı sinuzoidlerde staz saptandı (Şekil 4.13E). Fibrozis saptanmadı.

Dalakta kırmızı pulpada venöz sinuslarda sepsis grubundaki kadar ileri derecede olmamakla birlikte dilatasyon ve staz izlendi. İki örnekte daha az olmakla birlikte venöz sinus komşuluğunda dev hücre sayısındaki artış dikkati çekiyordu (Şekil 4.13F). Fibrozis saptanmadı.

4.11.4. LPS+PNU-post Grubu

Karaciğerde hepatositlerin çoğunda hücre bütünlüğünün korunduğu, çekirdeklerin sağlıklı olduğu görüldü. Ancak LPS ve LPS+PNU-pre gruplarına göre daha az sayıda hepatositte dejenerasyon izlendi. Bazı alanlarda nekrotik hücreler dikkati çekti ancak nekrotik hücre sayısı sepsis grubuna göre daha azdı. İki örnekte bazı santral venlerde ve sinuzoidlerde staz izlenirken, bir örnekte santral vende staz vardı ancak sinuzoidlerde staz yoktu, bir örnekte santral vende staz yokken sinuzoidde staz vardı. Beş örnekte ise santral ven ve sinuzoidlerde staz yoktu (Şekil 4.13G). Fibrozis saptanmadı.

Dalakta kırmızı pulpada venöz sinuslarda sepsis grubundaki kadar ileri derecede olmamakla birlikte dilatasyon ve staz belirgindi. Üç örnekte daha az olmakla birlikte venöz sinus komşuluğunda çok sayıda dev hücre izlendi (Şekil 4.13H). Fibrozis saptanmadı.

4.11.5. DMSO Grubu

Karaciğerde salin grubuna benzer şekilde hepatositlerin çoğu sağlıklıydı. Bir örnekte fazla sayıda nekrotik hepatosit izlenirken örneklerin çoğunda az sayıda hepatositin nekrotik olduğu görüldü. Ancak LPS grubuna göre daha az sayıda hepatositte balon dejenerasyon izlendi. Beş örnekte santral venlerde staz izlenmezken altı örnekte santral venlerde belirgin staz vardı (Şekil 4.14C). Örneklerin hiçbirinde sinuzoidlerde dilatasyon ve staz yoktu. Fibrozis saptanmadı.

Dalakta kırmızı pulpada venöz sinüslerde üç örnekte dilatasyon ve staz saptanmazken 4 örnekte LPS grubundaki kadar ileri derecede olmamakla birlikte dilatasyon ve staz belirgindi. 4 örnekte ise yer yer dilatasyon ve staz vardı. Bir örnekte sepsis grubuna benzer şekilde çok sayıda dev hücre izlenirken, 8 örnekte az sayıda dev hücre ve 2 örnekte ise çok az sayıda dev hücre venöz sinus komşuluğunda görüldü (Şekil 4.14D). Fibrozis saptanmadı.

4.11.6. PNU-pre Grubu

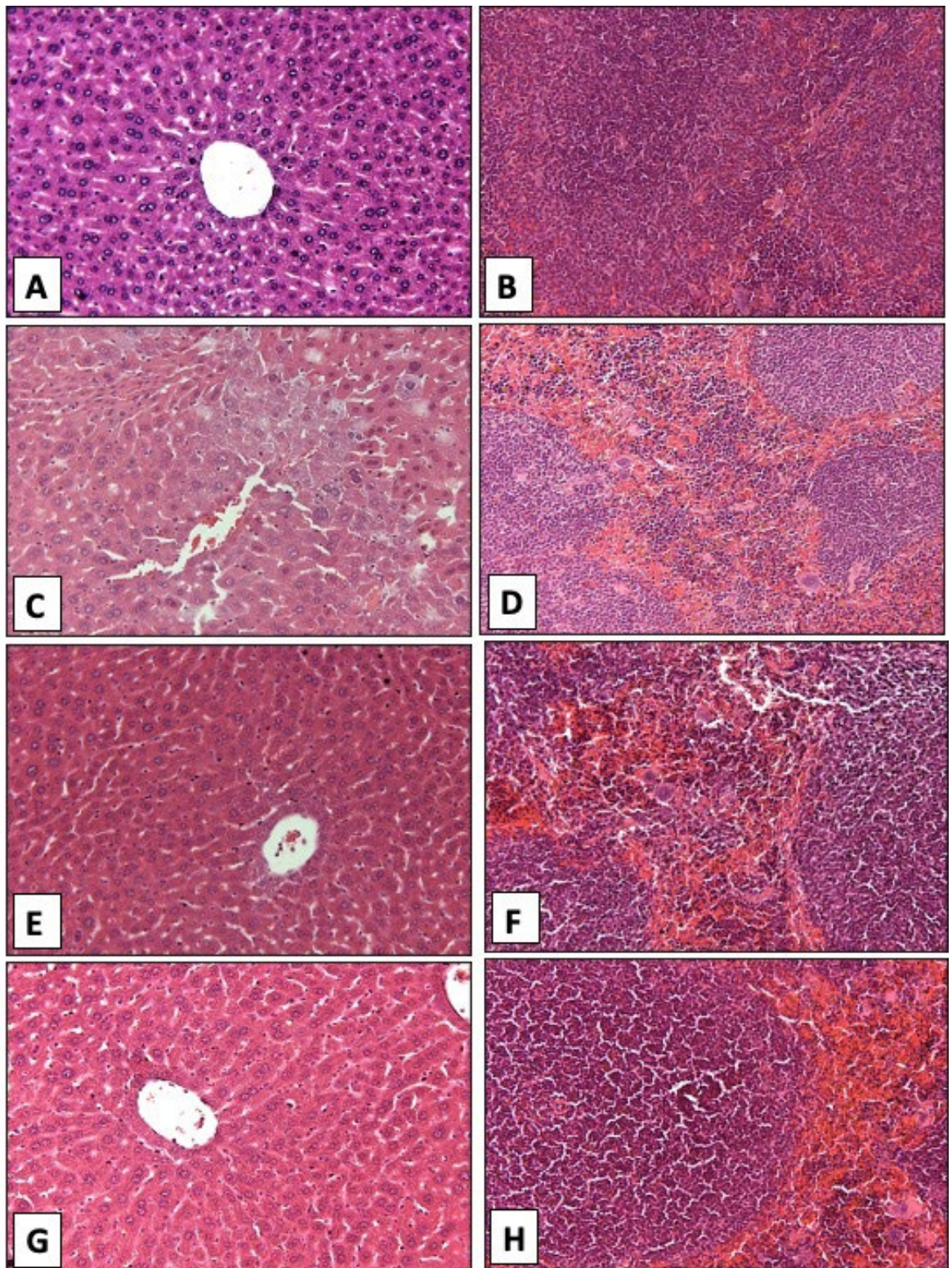
Karaciğerde hepatositlerde hücre bütünlüğü korunmuştu, hücreler arası bağlantıların sağlam olduğu görüldü. Hepatosit hücre kordonları seçiliyordu. Santral venlerin çevresindeki hepatositlerin bazılarında dejenerasyon vardı. Ancak sepsis grubuna göre dejenerasyonu olan hepatosit sayısı azdı. Santral ven ve sinuzoidlerde dilatasyon ve staz yoktu (Şekil 4.14E). Fibrozis saptanmadı.

Dalakta kırmızı pulpa venöz sinüslerinde diğer gruplara oranla dilatasyon ve stazın çok az olduğu dikkati çekti. 1 örnek dışında çok az sayıda dev hücre özellikle kırmızı pulpada venöz sinus komşuluğunda yer yer seçiliyordu (Şekil 4.14F). Fibrozis saptanmadı.

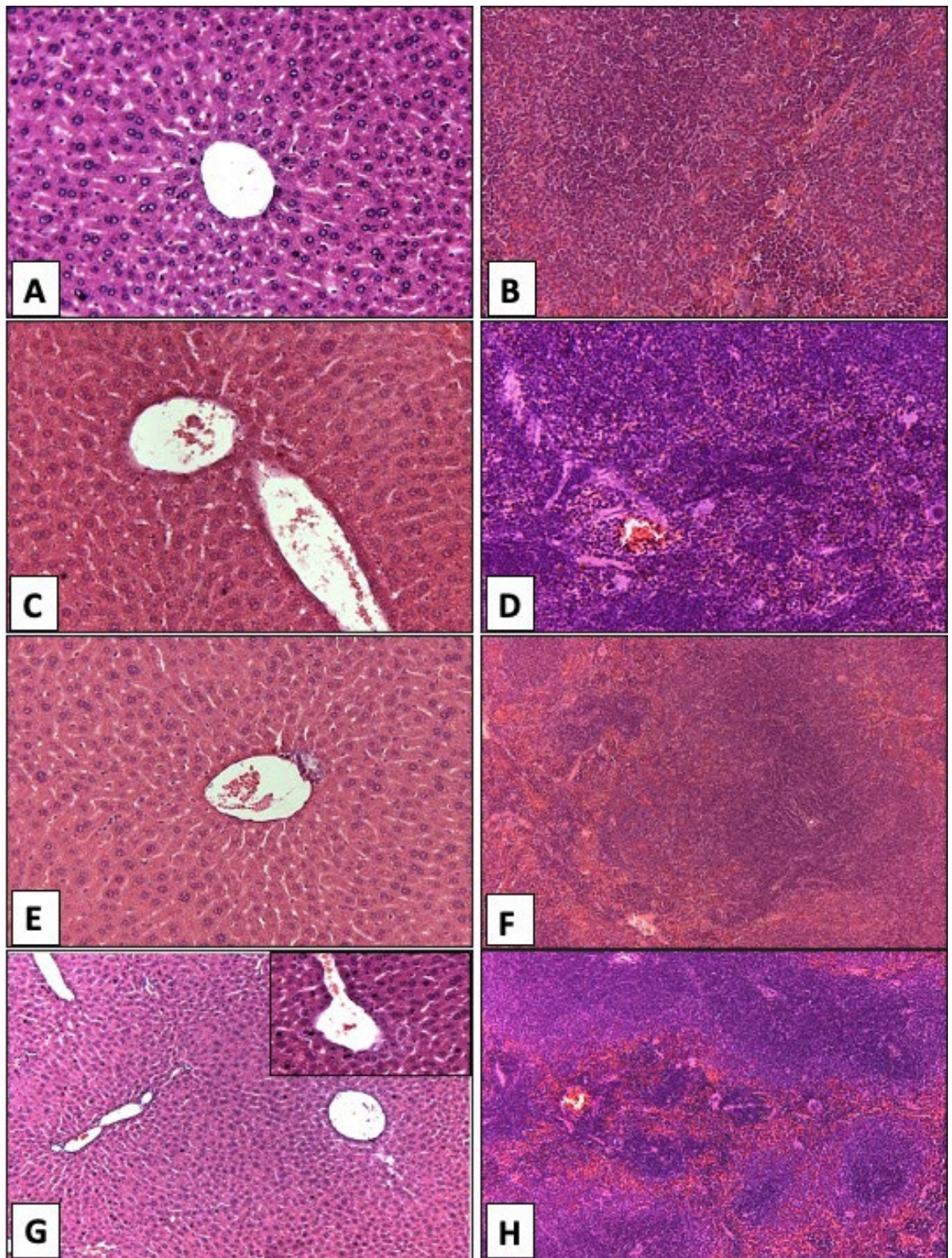
4.11.7. PNU-post Grubu

Karaciğerde PNU-pre grubuna benzer şekilde hepatositlerde hücre bütünlüğü korunmuştu, ancak santral ven çevresinde LPS grubuna göre daha az PNU-pre grubuna benzer şekilde bazı hepatositlerde dejenerasyon mevcuttu. Santral ven sinuzoidlerde dilatasyon ve staz yoktu (Şekil 4.14G). Fibrozis saptanmadı.

Dalakta kırmızı pulpada venöz sinüslerde belirgin dilatasyon ve staz vardı. 1 örnek dışında çok az sayıda dev hücre özellikle kırmızı pulpada venöz sinus komşuluğunda seçiliyordu (Şekil 4.14H). Fibrozis saptanmadı.



Şekil 4.13. A. Salin KC, B. Salin dalak, C. LPS KC, D. LPS dalak, E. LPS+PNU-pre KC, F. LPS+PNU-pre dalak, G. LPS+PNU-post KC, H. LPS+PNU-post dalak



Şekil 4.14. A. Salin KC, B. Salin dalak, C. DMSO KC, D. DMSO dalak, E. PNU-pre KC
 F. PNU-pre dalak, G. PNU-post KC, H. PNU-post dalak

Tablo 4.1. Karaciğer örneklerine ait histolojik değerlendirme

Gruplar	Örnekler	Hücre Dejenerasyonu		Staz		Fibrozis
		Nekrotik Hücre	Balon Dejenerasyonu	Santral Ven	Sinüzoid	
Salin	1	+	Var	Yok	Yok	Yok
	2	++	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	3	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	4	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	5	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	6	+	Var	Yok	Yok	Yok
	7	++	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	8	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	9	++	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
LPS	1	+++	Var	Var	Var	Yok
	2	+++	Var	Var	Var	Yok
	3	+++	Var	Var	Var	Yok
	4	+++	Var	Var	Var	Yok
	5	+++	Var	Var	Var	Yok
	6	+++	Var	Var	Var	Yok
	7	+++	Var	Var	Var	Yok
	8	+++	Var	Var	Var	Yok
	9	+++	Var	Var	Var	Yok
	10	+++	Var	Var	Var	Yok
LPS+PNU-pre	1	+++	Var	Bazılarında var	Bazılarında var	Yok
	2	+++	Var	Yok	Var	Yok
	3	+++	Var	Bazılarında var	Var	Yok
	4	+++	Var	Bazılarında var	Var	Yok
	5	+++	Var	Yok	Var	Yok
	6	+++	Var	Yok	Yok	Yok
	7	+++	Var	Yok	Yok	Yok
	8	+++	Var	Yok	Yok	Yok
	9	+++	Var	Yok	Yok	Yok
LPS+PNU-post	1	++	Var	Yok	Yok	Yok
	2	+++	Var	Bazılarında var	Var	Yok
	3	++	Var	Yok	Var	Yok
	4	++	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	5	++	Var	Yok	Yok	Yok
	6	++	Var	Yok	Yok	Yok
	7	++	Var	Yok	Yok	Yok
	8	++	Var	Yok	Yok	Yok
	9	+++	Var	Bazılarında var	Var	Yok
DMSO	1	++	Var	Yok	Yok	Yok
	2	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	3	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	4	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	5	++	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	6	+	Var	Yok	Yok	Yok
	7	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	8	++	Var	Yok	Yok	Yok
	9	+	Var	Bazılarında var	Yok	Yok
	10	+	Var	Yok	Yok	Yok
	11	+++	Var	Yok	Yok	Yok
PNU-pre	1	+	Yer yer	Bazılarında var	Yok	Yok
	2	+	Yer yer	Var	Yok	Yok
	3	+	Yer yer	Var	Yok	Yok
	4	+	Yer yer	Bazılarında var	Yok	Yok
	5	+	Yer yer	Var	Yok	Yok
PNU-post	1	+	Var	Yok	Yok	Yok
	2	+	Var	Var	Yok	Yok
	3	++	Var	Yok	Yok	Yok
	4	+	Var	Var	Yok	Yok
	5	+	Var	Yok	Bazılarında var	Yok

Tablo 4.2. Dalak örneklerine ait histolojik değerlendirme

Gruplar	Örnekler	Dev Hücre	Venöz Sinüs Konjesyonu	Fibrozis
Salin	1	+++	Yer yer var	Yok
	2	++	Yer yer var	Yok
	3	++	Yer yer var	Yok
	4	++	Yer yer var	Yok
	5	++	Yok	Yok
	6	++	Yer yer var	Yok
	7	+++	Yok	Yok
	8	++	Yok	Yok
	9	++	Yer yer var	Yok
LPS	1	+++	Var	Yok
	2	+++	Var	Yok
	3	+++	Var	Yok
	4	+++	Var	Yok
	5	+++	Var	Yok
	6	+++	Var	Yok
	7	+++	Var	Yok
	8	+++	Var	Yok
	9	+++	Var	Yok
	10	+++	Var	Yok
LPS+PNU-pre	1	+++	Var	Yok
	2	+++	Var	Yok
	3	+++	Var	Yok
	4	+++	Var	Yok
	5	+++	Var	Yok
	6	++	Var	Yok
	7	+++	Var	Yok
	8	++	Var	Yok
	9	+++	Var	Yok
LPS+PNU-post	1	++	Var	Yok
	2	+++	Var	Yok
	3	+++	Var	Yok
	4	+++	Var	Yok
	5	++	Var	Yok
	6	++	Var	Yok
	7	+++	Var	Yok
	8	+++	Var	Yok
	9	+++	Var	Yok
DMSO	1	++	Yer yer var	Yok
	2	++	Yer yer var	Yok
	3	+++	Yer yer var	Yok
	4	++	Yok	Yok
	5	+	Yok	Yok
	6	++	Yok	Yok
	7	+	Yer yer var	Yok
	8	++	Var	Yok
	9	++	Var	Yok
	10	++	Var	Yok
	11	++	Var	Yok
PNU-pre	1	++	Yer yer var	Yok
	2	+	Yer yer var	Yok
	3	+	Var	Yok
	4	+	Var	Yok
	5	+	Var	Yok
PNU-post	1	+	Var	Yok
	2	+	Var	Yok
	3	++	Var	Yok
	4	+	Var	Yok
	5	+	Var	Yok

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında LPS ile oluşturulan deneysel fare sepsis modelinde $\alpha 7nAChR$ tam agonisti olan PNU-282987'nin bozulan hemodinami, oksidatif ve inflamatuvar organ hasarına olan etkileri incelendi. Mezenter arter kan akım hızı LPS grubunda salin grubuna göre anlamlı olarak azalırken, LPS+PNU-pre ve LPS+PNU-post gruplarında bu azalma ortadan kalktı. Portal ven kan akım hızı LPS+PNU-post grubunda LPS grubuna göre anlamlı olarak arttı. Bu artış LPS+PNU-pre grubunda gözlenmedi. Histopatolojik olarak incelendiğinde, karaciğerde LPS grubunda artmış olan nekrotik hücre yüzdesinin LPS+PNU-post grubunda azaldığı gösterildi. Karaciğer ve dalak örneklerinde ölçülen TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde anlamlı fark yoktu. Karaciğer örneklerinde ölçülen TAS düzeyi LPS+PNU-pre ve LPS+PNU-post gruplarında LPS grubuna göre anlamlı olarak arttı. Dalak örneklerinde ölçülen TOS düzeyi LPS grubunda salin grubuna göre anlamlı olarak artarken, LPS+PNU-pre grubunda LPS grubuna göre anlamlı olarak azaldı.

Sepsiste ilk hemodinamik bozukluk deri ve mezenter dolaşımında gözlenir. Arteriyel kan basıncı vazokonstriktör ajanlarla normal aralıkta tutulabilir, ancak mezenter dolaşım bozulmaya devam eder. Septik şokun erken evrelerinde gözlenen mezenter kan akımındaki azalmanın kanı böbrek ve beyin gibi vital organlara yönlendirerek bu organların perfüzyonunu artırmak için olduğu düşünülür. Mezenter hipoperfüzyonu sonucunda bağırsak iskemisi ve bakteriyel translokasyon görülür (140, 141). Bakteriyel translokasyonun sistemik etkisiyle proinflamatuvar sitokin saliverilmesi şiddetlenir. Bu yüzden mezenter kan akımı regülasyonu çoklu organ yetmezliğinin önüne geçmek için gereklidir.

Vasküler düz kasın fizyolojik tonusu, lokal (damar kaynaklı) veya nörohormonal yollar ile belirlenir. Perfüzyon basıncı ile damar çapı kan akışını düzenleyen ana etkenlerdir. Basınç ve çap etkileşimi, organ sistemlerinin perfüzyonunda 'direnc' kavramını oluşturur (142). Hayvan türüne, vasküler yatağın anatomik lokalizasyonuna ve damar çapına göre farklılık gösteren vasküler sistemin

nöronal innervasyon dağılımı immünohistokimyasal çalışmalar ile gösterilmiştir (143). Innervasyon dağılımındaki fark, incelenen vasküler yatağın özgül fizyolojik tonusunun düzenlenmesinde etkili olur. Postganglionik adrenerjik innervasyon, vasküler sistemde direnci oluşturan prekapiller damarlarda yüksek orandadır; hemen hemen her vasküler yatakta tonusun düzenlenmesi vasküler düz kasın doğrudan adrenerjik inervasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Vasküler düz kasın doğrudan postganglionik kolinerjik inervasyonu; bundan ötürü kolinerjik inervasyonun fizyolojik tonik aktivitesi bulunmamaktadır. Kolinerjik sistem vasküler sistemdeki etkisini sadece endotelde sentezini tetiklediği nitrik oksit aracılığı ile, vazodilatasyon şeklinde göstermektedir. Nitrenerjik sistem, sinir sonlanımında nitrik oksit sentezi ile vazodilatasyona katkıda bulunur (144, 145).

Vasküler sistemin tonusu ve fizyolojik işlevi, sepsis ilişkili damar yanıt düzensizliği sebebiyle hasarlanır. İnflamasyon ile sentezi tetiklenen moleküllerin işlevleri dışındaki ikincil hasarları, arter basıncını düzenleyen kardiyovasküler reflekslere yanıtızlık literatürde vasküler tonus kaybının olası sebepleri olarak incelenmiştir (146, 147).

Fizyolojik fonksiyonlarından biri “miyojenik kontrol” olan nitrik oksit vazodilatasyona sebep olan ana etmendur. Endotelial nitrik oksit sentaz (*eNOS*) aktivitesi sonucu sentezlenen ve vasküler düz kas hücresi içinde 3'-5'-siklik guanozin monofosfat (*cGMP*) ile etkileşen nitrik oksit, hücre içi kalsiyum derişimini düşürerek, hiperpolarizasyonda etkili kanalları aktifleştirerek vasküler düz kası gevşetir (148-150). Deneysel sepsis modelleri, *eNOS* aktivitesinin baskılandığını göstermiş; indüklenebilen nitrik oksit sentaz (*iNOS*) aktivitesinin arttığını kanıtlamıştır. *iNOS* aktivitesi nedeniyle sentez miktarı artan nitrik oksit oksidatif hasara sebep olmuş, vasküler hasarın şiddetini artırmıştır (151, 152). Parasempatik inervasyonun hedefi olan endotel, hasar nedeniyle işlevini yerine getirememiştir.

Ayrıca prospektif klinik çalışmalar ve deneysel hayvan modelleri, sepsis varlığında kan akışının mikrodolaşım birimlerinden uzaklaşıp arteriyel kompartmandan venöz kompartmana hat değiştirdiğini göstermiştir (153, 154). Çalışmamızda mezenter arter kan akım hızı LPS grubunda salin grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı, ancak portal ven kan akım hızındaki azalma salin grubuyla karşılaştırıldığında LPS grubuna göre anlamlı azalma gözlenmedi.

Çalışmada, deneysel sepsis modeli oluşturulan sıçanlarda endotoksin enjeksiyonu ardından periferel vasküler sistem fonksiyonunda gözlemlenen farklılıklar literatür ile uyum göstermektedir (155, 156). Mezenter arter kan akım hızındaki düşüş yukarıdaki verilerle ilişkilendirilebilir.

Çalışmada PNU-282987 sağlıklı hayvanlarda mezenter arter ve portal ven kan akım hızını etkilemedi ancak LPS enjeksiyonuyla oluşturulan deneysel sepsis modelinde tedavi edici etkiyle, anlamlı olarak kan akım hızını artırdı. PNU-282987 aracılı $\alpha 7nAChR$ 'lerin aktivasyonu bu olumlu etkiden sorumlu olabilir.

Hem LPS+PNU-pre hem de LPS+PNU-post gruplarında PNU-282987'nin mezenter arter yatağında kan akım hızını artırıcı etkisi çalışmamızda gözlenmiştir. Ancak LPS+PNU-post grubunda LPS grubuna göre portal ven kan akım hızı anlamlı olarak artarken (Şekil 4.3), LPS+PNU-pre grubunda anlamlı fark tespit edilmedi. Endotoksin enjeksiyonu öncesi PNU-282987 uygulaması portal vende olmayıp mezenter arterde varolan bir mekanizmayı tetikleyerek akım hızını artırıyor olabilir. Bu farkın oluşmasında kolinerjik antiinflamatuvar refleksiyle dalaktan saliverilen norepinefrinin etkisi ileri çalışmalarla incelenebilir.

Kolinerjik antiinflamatuvar yolağın aktivasyonu; vagus sinirinin direkt stimülasyonu, $\alpha 7nAChR$ 'yi uyarmak için nikotin veya nikotinik agonistlerin kullanılmasıyla veya kolinesteraz inhibitörleri ile sağlanabilir (157). ACh konsantrasyonlarını artıran ve merkezi sinir sistemine geçebilen kolinesteraz inhibitörleri inflamatuvar hastalıkların tedavisinde daha etkili olabilir (158). Sıçanlarda oluşturulmuş deneysel kolit modelinde, hem neostigmin hem de

fizostigmin kolonik makroskopik hasarı ve nötrofil infiltrasyonunu azaltmış, fizostigmin muhtemelen santral sinir sistemine geçebildiği için daha iyi etki göstermiştir (159). Buradan, santral kolinerjik reseptörlerin uyarılmasının fizostigminin antiinflamatuvar etkisine daha fazla katkıda bulunduğu sonucuna varılabilir.

Deneyel fare sepsis modeliyle yapılan başka bir çalışmada, vagus sinir stimülasyonu ile $\alpha 7nAChR$ aktivasyonunun plazma, karaciğer ve dalaktaki TNF- α seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (118). Başka bir çalışmada farede çekal ligasyon ve delme (CLP) ile oluşturulan sepsis modelinde, PNU-282987, 1 mg/kg dozunda cerrahiden 1 saat önce (pre) ve 2 saat sonra (post) uygulanmıştır. Hem ön tedavi (pre) hem de tedavi (post) gruplarında sepsise bağlı akciğer hasarı ile bronkoalveolar lavaj sıvısında IL-6 düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Ön tedavi grubunda ayrıca artan TNF- α düzeyi de anlamlı olarak düşük bulunmuştur (160).

Su ve diğ. (2007)'ne ait çalışmada, PNU-282987 ile ön tedavinin, farelerde asit kaynaklı akut akciğer hasarını azalttığı bildirilmiştir (134). CLP cerrahisi yapıldıktan 2 saat sonra uygulanan PNU-282987 tedavisinin de inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve akciğer hasarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (160). Çalışmamızda karaciğer ve dalak dokusu örneklerinde, özellikle karaciğerde olmak üzere, LPS uygulaması ile oluşan hasarda LPS+PNU-pre ve LPS+PNU-post gruplarında düzelme görüldü ve bu düzelme LPS+PNU-post grubunda daha belirgindi.

Pinheiro ve diğ. (2017)'nin yaptığı çalışmada ise PNU-282987, ön tedavi grubunda LPS indüksiyonundan 30 dk önce, tedavi grubunda ise 6 saat sonra uygulanmıştır. LPS indüksiyonu sonrası bronkoalveolar lavaj sıvısında artan TNF- α ve IL-1 β düzeyleri hem ön tedavi hem de tedavi gruplarında anlamlı olarak azalmıştır. Bu azalma IL-1 β düzeyi için daha efektif olup ön tedavi ve tedavi grupları arasında anlamlı fark yoktur (136). Çalışmamızda karaciğer ve dalak örneklerinde ölçülen TNF- α ve IL-1 β konsantrasyonlarında gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması, doku düzeyinde

henüz inflamatuvar yanıtın oluşmamış olabileceğini düşündürmektedir. Doku örnekleri yerine serumda TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin ölçümünün yapılması bu çalışma için daha yararlı olabilirdi. Ayrıca çalışmamızda kullanılan LPS serotipinin farklı olmasının da bu sonuçların bir nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Oksidatif stres organizmadaki ROS üretimi ile antioksidan kapasite arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Total oksidan durum genellikle hidrojen peroksit, peroksil radikalleri ve DNA hasar belirteçleri gibi nispeten kararlı ROS ailesi üyelerinin doğrudan ölçümü yoluyla belirlenir. Total antioksidan durum ise güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur. Mevcut araştırmalar, sepsisli yoğun bakım ünitesi hastalarında TOS ve TAS arasındaki dengesizlik ile klinik şiddetin değerlendirilebileceğini düşündürmektedir (161).

Lipopolisakkaritin TLR4 reseptörüne bağlanarak inflamatuvar yanıtları uyarması, sentezi/saliverilmesi artan proinflamatuvar sitokinlerin hücre içi yollar aracılığıyla oksidatif hasarın öncüsü radikallerin sentezini tetiklemesi, endotoksin enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel hayvan sepsis şok modellerinde oksidatif hasarın inflamasyon ile ilişkili nedenleridir (162-164). İnflamatuvar yanıtın oksidatif hasar sonucu uyarılması veya inflamatuvar yanıt şiddetinin oksidatif hasar ile artması kısır döngüye sebep olur (165).

İnflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde otonom sinir sisteminin rolü klinik çalışmalar ve hayvan deneyleri ile incelenmiştir. Kolinerjik sistemin uyarılması (deney hayvanında vagal sinirin uyarılması, makrofaj kültüründe ACh inkübasyonu gibi) endotoksin ile tetiklenen inflamatuvar yanıtı baskılamıştır (166, 167). Kolinerjik antiinflamatuvar etkinin oluşmasında $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptör aktivasyonunun özellikle etkili olduğu belirtilmiştir (124).

Oksidatif hasar, kolinerjik uyarıma inflamatuvar profile benzer şekilde yanıt verir. Vagal sinir innervasyonunun cerrahi/farmakolojik yöntemler ile engellendiği hayvan deneylerinde endotoksin ile indüklenen oksidatif hasarın arttığı gözlemlenmiştir (168). İnflamasyona eşlik eden oksidatif hasar, hücrel inflamatuvar dengeyi düzenleyen vagal uyarımın endotoksin ile doğrudan hasarı ile ilişkilendirilebilir. Diyet değişikliği uygulanan deney hayvanlarında barsak mikrobiyotasının değişimi proinflamatuvar bakteriyal ürün olan lipopolisakkarit ve proinflamatuvar sitokin miktarının artışına sebep olmuştur. Bu hayvanlarda vagal uyarımda lipopolisakkarit ilişkili hasar tespit edilmiştir (169). Çalışmada, PNU-282987 tedavisinin oksidatif hasara etkisi endotoksin enjeksiyonu ardından engellenen vagal uyarımı artırması ile açıklanabilir.

Bu tez çalışmasının ana bulgusu son yıllarda ilgi çeken bir konu olan kolinerjik antiinflamatuvar yolağın ve bu mekanizma ile ilişkili $\alpha 7nAChR$ agonisti olan PNU-282987'nin, deneysel fare sepsis modelinde azalmış mezenter arter kan akımını artırması ve karaciğer, dalak hasarını azaltmasıdır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. $\alpha 7nAChR$ agonisti PNU-282987, LPS (O111:B4) ile oluşturulan deneysel fare sepsis modelinde gözlenen mezenter arter kan akım hızındaki azalmayı önlemiştir.
2. PNU-282987'nin LPS uygulamasından hem önce hem de sonra verilmesi mezenter arter kan akım hızını artırmıştır.
3. LPS uygulamasından sonra yapılan PNU-282987 tedavisinde portal ven kan akım hızı, LPS grubuna göre anlamlı olarak artmıştır.
4. Karaciğer ve dalak örneklerinde ölçülen TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde gruplar arasında fark bulunmamıştır. TNF- α ve IL-1 β düzeyleri bu deneysel modelde farklı zamanda ölçülebilir ya da serumda ölçümün yapılması daha aydınlatıcı olabilir.
5. Karaciğer ve dalak örneklerinde yapılan histopatolojik incelemede LPS ile oluşan doku hasarının özellikle karaciğerde azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma LPS sonrası PNU-282987 tedavisinde daha yüksektir.
6. Farklı bir sepsis modeli olarak çekal ligasyon ve delme (CLP) modeliyle de bu hipotez test edilebilir.
7. LPS (O55:B5) serotipi ile deneysel sepsis modeli oluşturularak benzer etkilerin olup olmadığı test edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Luo M, Luo S, Cheng Z, Yang X, Lv D, Li X, et al. Tubeimoside I improves survival of mice in sepsis by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;126:110083.
2. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In vivo*. 2013;27(6):669-84.
3. Kong F-J, Ma L-L, Zhang H-H, Zhou J-Q. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 mitigates isoflurane-induced cognitive impairment in aged rats. *Journal of Surgical Research*. 2015;194(1):255-61.
4. Gong M, Wang G, Li G, Liu J, Sun P, Xu L, et al. Dysfunction of inflammation-resolving pathways is associated with postoperative cognitive decline in elderly mice. *Behavioural Brain Research*. 2020;386:112538.
5. Jarczyk J, Yard BA, Hoeger S. The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway as a Conceptual Framework to Treat Inflammation-Mediated Renal Injury. *Kidney Blood Press Res*. 2019;44(4):435-48.
6. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.
7. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 2020;395(10219):200-11.
8. Marik PE. Early management of severe sepsis: concepts and controversies. *Chest*. 2014;145(6):1407-18.
9. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *The Lancet*. 2018;392(10141):75-87.
10. Fernando SM, Rochweg B, Seely AJ. Clinical implications of the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Cmaj*. 2018;190(36):E1058-E9.
11. Hecker A, Reichert M, Reuß C, Schmoch T, Riedel J, Schneck E, et al. Intra-abdominal sepsis: new definitions and current clinical standards. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2019;404(3):257-71.
12. Vincent J-L, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*. 2019;23(1):1-11.
13. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF, editors. *Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. Seminars in immunopathology*; 2017: Springer.
14. Gentile LF, Moldawer LL. DAMPS, PAMPS and the origins of SIRS in bacterial sepsis. *Shock (Augusta, Ga)*. 2013;39(1):113.
15. Seong S-Y, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(6):469-78.
16. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology*. 2007;28(10):429-36.
17. Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, Skirecki T, Winkler MS, Lachmann G, et al. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019;19(12):e422-e36.
18. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2(1):1-21.

19. Larosa SP. Sepsis: menu of new approaches replaces one therapy for all. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 2002;69(1):65-73.
20. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Economou M, Kotanidou A, El Ali M, Christopoulou-Kokkinou V, et al. Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive care medicine*. 2001;27(12):1853-9.
21. Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L, Gandía F, et al. A combined score of pro-and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*. 2012;57(3):332-6.
22. Wasyluk W, Zwolak A. Metabolic alterations in sepsis. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(11):2412.
23. Vincent J-L, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. Springer-Verlag; 1996.
24. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Critical care medicine*. 2013;41(3):820-32.
25. Nierhaus A, Klatte S, Linssen J, Eismann NM, Wichmann D, Hedke J, et al. 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*. 2013;14(1):1-8.
26. Bermejo-Martin JF, Martín-Fernandez M, López-Mestanza C, Duque P, Almansa R. Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (aging and chronic disease). *Journal of clinical medicine*. 2018;7(11):400.
27. Gane J, Stockley R. Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD. *Thorax*. 2012;67(6):553-61.
28. Colbert JF, Schmidt EP. Endothelial and microcirculatory function and dysfunction in sepsis. *Clinics in chest medicine*. 2016;37(2):263-75.
29. Pool R, Gomez H, Kellum JA. Mechanisms of organ dysfunction in sepsis. *Critical care clinics*. 2018;34(1):63-80.
30. Lubkin A, Torres VJ. Bacteria and endothelial cells: a toxic relationship. *Current opinion in microbiology*. 2017;35:58-63.
31. Martin L, Koczera P, Zechendorf E, Schuerholz T. The endothelial glycocalyx: new diagnostic and therapeutic approaches in sepsis. *BioMed research international*. 2016;2016.
32. Ma S, Evans RG, Iguchi N, Tare M, Parkington HC, Bellomo R, et al. Sepsis-induced acute kidney injury: a disease of the microcirculation. *Microcirculation*. 2019;26(2):e12483.
33. Daniere C, Louart G, Louart B, Bacle M, Bazalgette F, Martin AP, et al. Effects of Fluid Therapy on Mesenteric Microcirculation Using New Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy (Cellvizio®) in a Porcine Model of Endotoxic Shock. *Journal of Vascular Research*. 2022;59(2):124-34.
34. Jahandideh F, Panahi S, Noble RM, Gragasin FS, Khadaroo RG, Macala KF, et al. Characterization of Systemic and Regional Hemodynamics and Vascular Dysfunction in Mice with Fecal Induced Peritonitis. *Biomedicine*. 2022;10(2):470.
35. Dyson A, Cone S, Singer M, Ackland G. Microvascular and macrovascular flow are uncoupled in early polymicrobial sepsis. *British journal of anaesthesia*. 2012;108(6):973-8.
36. Lipinska-Gediga M. Sepsis and septic shock-is a microcirculation a main player? *Anaesthesiology Intensive Therapy*. 2016;48(4):261-5.
37. Edul VSK, Enrico C, Laviolle B, Vazquez AR, Ince C, Dubin A. Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. *Critical care medicine*. 2012;40(5):1443-8.

38. García-Septien J, Lorente JA, Delgado MA, de Paula M, Nin N, Moscoso A, et al. Levosimendan increases portal blood flow and attenuates intestinal intramucosal acidosis in experimental septic shock. *Shock*. 2010;34(3):275-80.
39. Assimakopoulos SF, Triantos C, Thomopoulos K, Fligou F, Maroulis I, Marangos M, et al. Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment. *Infection*. 2018;46(6):751-60.
40. Andersson A, Rundgren M, Kalman S, Rooyackers O, Brattstrom O, Oldner A, et al. Gut microcirculatory and mitochondrial effects of hyperdynamic endotoxaemic shock and norepinephrine treatment. *British journal of anaesthesia*. 2012;108(2):254-61.
41. Asfar P, Meziani F, Hamel J-F, Grelon F, Megarbane B, Anguel N, et al. High versus low blood-pressure target in patients with septic shock. *N Engl J Med*. 2014;370:1583-93.
42. Weil MH, Tang W. Welcoming a new era of hemodynamic monitoring: expanding from the macro to the microcirculation. *Critical care medicine*. 2007;35(4):1204-5.
43. De Backer D, Donadello K, Sakr Y, Ospina-Tascon G, Salgado D, Scolletta S, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Critical care medicine*. 2013;41(3):791-9.
44. İskit AB. Sepsiste deneysel modeller. *Yoğun Bakım Dergisi*. 2005;5(2):133-6.
45. Solov'eva T, Davydova V, Krasikova I, Yermak I. Marine compounds with therapeutic potential in gram-negative sepsis. *Marine Drugs*. 2013;11(6):2216-29.
46. Zeisel SH. A brief history of choline. *Annals of nutrition and metabolism*. 2012;61(3):254-8.
47. Sam C, Bordoni B. Physiology, Acetylcholine. *StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022*.
48. Wessler I, Kirkpatrick C. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*. 2008;154(8):1558-71.
49. Wessler I, Kirkpatrick C, Racke K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1999;26(3):198-205.
50. Halder N, Lal G. Cholinergic system and its therapeutic importance in inflammation and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 2021;12.
51. Eglén R. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*. 2006;26(3):219-33.
52. Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A, Wess J. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(7):549-60.
53. O Borroto-Escuela D, F Agnati L, Fuxe K, Ciruela F. Muscarinic acetylcholine receptor-interacting proteins (mAChRIPs): targeting the receptorsome. *Current Drug Targets*. 2012;13(1):53-71.
54. Itier V, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS letters*. 2001;504(3):118-25.
55. Kabbani N, Nordman JC, Corgiat BA, Veltri DP, Shehu A, Seymour VA, et al. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *Bioessays*. 2013;35(12):1025-34.
56. Gulsevin A. Nicotinic receptor pharmacology in silico: Insights and challenges. *Neuropharmacology*. 2020;177:108257.
57. McKay BE, Placzek AN, Dani JA. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*. 2007;74(8):1120-33.
58. Cascio M. Structure and function of the glycine receptor and related nicotinic receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(19):19383-6.
59. Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends in neurosciences*. 2005;28(7):371-8.

60. Ho TN, Abraham N, Lewis RJ. Structure-function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from natural toxins. *Frontiers in Neuroscience*. 2020;1209.
61. Chatzidaki A, Millar NS. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*. 2015;97(4):408-17.
62. Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F, Zoli M. Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochemical pharmacology*. 2007;74(8):1102-11.
63. Aidley DJ. *The physiology of excitable cells*: Cambridge University Press; 1998.
64. Weber M, Motin L, Gaul S, Beker F, Fink RH, Adams DJ. Intravenous anaesthetics inhibit nicotinic acetylcholine receptor-mediated currents and Ca²⁺ transients in rat intracardiac ganglion neurons. *British journal of pharmacology*. 2005;144(1):98.
65. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends in neurosciences*. 1997;20(2):92-8.
66. Le Novere N, Changeux J-P. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *Journal of Molecular Evolution*. 1995;40(2):155-72.
67. Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. edition 5. *Pharmacology* Edinburgh Churchill Livingstone. 2003.
68. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A. S, McNamara JO, White LE. *Neuroscience* (4th ed) Sunderland, MA: Sinauer Associates. 2008:857.
69. Sarter M. Behavioral-cognitive targets for cholinergic enhancement. *Current opinion in behavioral sciences*. 2015;4:22-6.
70. Wu J, Gao M, Shen J-X, Shi W-X, Oster AM, Gutkin BS. Cortical control of VTA function and influence on nicotine reward. *Biochemical pharmacology*. 2013;86(8):1173-80.
71. D Levin E. α 7-Nicotinic receptors and cognition. *Current drug targets*. 2012;13(5):602-6.
72. Sadigh-Eteghad S, Mahmoudi J, Babri S, Talebi M. Effect of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor activation on beta-amyloid induced recognition memory impairment. Possible role of neurovascular function. *Acta chirurgica brasileira*. 2015;30:736-42.
73. Wang J, Lu Z, Fu X, Zhang D, Yu L, Li N, et al. Alpha-7 nicotinic receptor signaling pathway participates in the neurogenesis induced by ChAT-positive neurons in the subventricular zone. *Translational stroke research*. 2017;8(5):484-93.
74. Lee J, Cooke JP. Nicotine and pathological angiogenesis. *Life sciences*. 2012;91(21-22):1058-64.
75. Jain G, Jaimes EA. Nicotine signaling and progression of chronic kidney disease in smokers. *Biochemical pharmacology*. 2013;86(8):1215-23.
76. Mihalak KB, Carroll FI, Luetje CW. Varenicline is a partial agonist at α 4 β 2 and a full agonist at α 7 neuronal nicotinic receptors. *Molecular pharmacology*. 2006;70(3):801-5.
77. Taly A, Corringer P-J, Guedin D, Lestage P, Changeux J-P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(9):733-50.
78. Kume T, Takada-Takatori Y. Nicotinic acetylcholine receptor signaling: Roles in neuroprotection. *Nicotinic acetylcholine receptor signaling in neuroprotection*. 2018:59-71.
79. Vieira-Alves I, Coimbra-Campos L, Sancho M, Da Silva RF, Cortes SF, Lemos VS. Role of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor in the pathophysiology of atherosclerosis. *Frontiers in Physiology*. 2020:1719.
80. Chen L-Y, Liu Z-G, Li Y-H, Feng Y-Z, Wang J-R. Expression of neuronal acetylcholine receptor alpha 7 (nAChR α 7) in peripheral blood CD (4)(+) T lymphocytes from asthmatic

children. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua Jiehe he Huxi Zazhi= Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2008;31(11):803-5.

81. Webster MK, Cooley-Themm CA, Barnett JD, Bach HB, Vainner JM, Webster SE, et al. Evidence of BrdU-positive retinal neurons after application of an Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist. *Neuroscience*. 2017;346:437-46.
82. Horenstein NA, Papke RL. *Anti-inflammatory silent agonists*. ACS Publications; 2017. p. 989-91.
83. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421(6921):384-8.
84. Piovesana R, Salazar Intriago MS, Dini L, Tata AM. Cholinergic modulation of neuroinflammation: focus on $\alpha 7$ nicotinic receptor. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4912.
85. Li D-J, Fu H, Tong J, Li Y-H, Qu L-F, Wang P, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibits neointimal hyperplasia by suppressing inflammation and oxidative stress. *Redox biology*. 2018;15:22-33.
86. Sinkus ML, Graw S, Freedman R, Ross RG, Lester HA, Leonard S. The human CHRNA7 and CHR FAM7A genes: A review of the genetics, regulation, and function. *Neuropharmacology*. 2015;96:274-88.
87. Canastar A, Logel J, Graw S, Finlay-Schultz J, Osborne C, Palionyte M, et al. Promoter methylation and tissue-specific transcription of the $\alpha 7$ nicotinic receptor gene, CHRNA7. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012;47(2):389-400.
88. Kombo DC, Mazurov AA, Chewning J, Hammond PS, Tallapragada K, Hauser TA, et al. Discovery of novel $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ligands via pharmacophoric and docking studies of benzylidene anabaseine analogs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2012;22(2):1179-86.
89. Dineley KT, Pandya AA, Yakel JL. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends in pharmacological sciences*. 2015;36(2):96-108.
90. Deutsch SI, Burket JA, Benson AD, Urbano MR. The 15q13.3 deletion syndrome: Deficient $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptor-mediated neurotransmission in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016;64:109-17.
91. Wang Y, Xiao C, Indersmitten T, Freedman R, Leonard S, Lester HA. The duplicated $\alpha 7$ subunits assemble and form functional nicotinic receptors with the full-length $\alpha 7$. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(38):26451-63.
92. King JR, Ullah A, Bak E, Jafri MS, Kabbani N. Ionotropic and metabotropic mechanisms of allosteric modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptor intracellular calcium. *Molecular Pharmacology*. 2018;93(6):601-11.
93. Shen J-x, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009;30(6):673-80.
94. Chang KT, Berg DK. Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron*. 2001;32(5):855-65.
95. King JR, Nordman JC, Bridges SP, Lin M-K, Kabbani N. Identification and characterization of a G protein-binding cluster in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(33):20060-70.
96. Egea J, Buendia I, Parada E, Navarro E, Leon R, Lopez MG. Anti-inflammatory role of microglial $\alpha 7$ nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochemical pharmacology*. 2015;97(4):463-72.
97. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2013;53:401.

98. Parada E, Egea J, Buendia I, Negredo P, Cunha AC, Cardoso S, et al. The microglial $\alpha 7$ -acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(11):1135-48.
99. Corradi J, Bouzat C. Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: implications for drug discovery. *Molecular pharmacology*. 2016;90(3):288-99.
100. Han JM, Levings MK. Immune regulation in obesity-associated adipose inflammation. *The Journal of Immunology*. 2013;191(2):527-32.
101. Chang EH, Chavan SS, Pavlov VA. Cholinergic control of inflammation, metabolic dysfunction, and cognitive impairment in obesity-associated disorders: mechanisms and novel therapeutic opportunities. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:263.
102. Wang X, Yang Z, Xue B, Shi H. Activation of the cholinergic antiinflammatory pathway ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Endocrinology*. 2011;152(3):836-46.
103. Marrero MB, Lucas R, Salet C, Hauser TA, Mazurov A, Lippiello PM, et al. An $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-selective agonist reduces weight gain and metabolic changes in a mouse model of diabetes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010;332(1):173-80.
104. Wu C-H, Lee C-H, Ho Y-S. Nicotinic Acetylcholine Receptor-Based Blockade: Applications of Molecular Targets for Cancer Therapy. *Nicotinic Acetylcholine Receptor-Targeted Cancer Therapy*. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(11):3533-41.
105. Pepper C, Tu H, Morrill P, Garcia-Rates S, Fegan C, Greenfield S. Tumor cell migration is inhibited by a novel therapeutic strategy antagonizing the alpha-7 receptor. *Oncotarget*. 2017;8(7):11414.
106. Zhao Y. The oncogenic functions of nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of oncology*. 2016;2016.
107. Brown KC, Lau JK, Dom AM, Witte TR, Luo H, Crabtree CM, et al. MG624, an $\alpha 7$ -nAChR antagonist, inhibits angiogenesis via the Egr-1/FGF2 pathway. *Angiogenesis*. 2012;15(1):99-114.
108. Medeiros R, Castello NA, Cheng D, Kitazawa M, Baglietto-Vargas D, Green KN, et al. $\alpha 7$ Nicotinic receptor agonist enhances cognition in aged 3xTg-AD mice with robust plaques and tangles. *The American journal of pathology*. 2014;184(2):520-9.
109. Kumar V, Sharma A. Is neuroimmunomodulation a future therapeutic approach for sepsis? *International immunopharmacology*. 2010;10(1):9-17.
110. Ren C, Li X-h, Wang S-b, Wang L-x, Dong N, Wu Y, et al. Activation of central alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor reverses suppressed immune function of T lymphocytes and protects against sepsis lethality. *International Journal of Biological Sciences*. 2018;14(7):748.
111. Terry Jr AV, Callahan PM. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors as therapeutic targets in schizophrenia: Update on animal and clinical studies and strategies for the future. *Neuropharmacology*. 2020;170:108053.
112. Papke RL, Horenstein NA. Therapeutic Targeting of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2021;73(3):1118-49.
113. Pandya AA, Yakel JL. Effects of neuronal nicotinic acetylcholine receptor allosteric modulators in animal behavior studies. *Biochemical pharmacology*. 2013;86(8):1054-62.
114. Xie H, Yepuri N, Meng Q, Dhawan R, Leech CA, Chepurny OG, et al. Therapeutic potential of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonists to combat obesity, diabetes, and inflammation. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2020;21(4):431-47.

115. Wu Y-j, Wang L, Ji C-f, Gu S-f, Yin Q, Zuo J. The role of $\alpha 7$ nAChR-mediated cholinergic anti-inflammatory pathway in immune cells. *Inflammation*. 2021;44(3):821-34.
116. Qian YS, Zhao QY, Zhang SJ, Zhang YJ, Wang YC, Zhao HY, et al. [Effect of $\alpha 7$ nAChR mediated cholinergic anti-inflammatory pathway on inhibition of atrial fibrillation by low-level vagus nerve stimulation]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2018;98(11):855-9.
117. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458-62.
118. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(7):1623-8.
119. Revathikumar P, Estelius J, Karmakar U, Le Maitre E, Korotkova M, Jakobsson P-J, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 gene deletion impairs neuro-immune circuitry of the cholinergic anti-inflammatory pathway in endotoxaemic mouse spleen. *Plos one*. 2018;13(2):e0193210.
120. Bellinger DL, Felten SY, Lorton D, Felten DL. Origin of noradrenergic innervation of the spleen in rats. *Brain, behavior, and immunity*. 1989;3(4):291-311.
121. Martelli D, McKinley M, McAllen R. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Autonomic Neuroscience*. 2014;182:65-9.
122. Benfante R, Di Lascio S, Cardani S, Fornasari D. Acetylcholinesterase inhibitors targeting the cholinergic anti-inflammatory pathway: a new therapeutic perspective in aging-related disorders. *Aging Clin Exp Res*. 2021;33(4):823-34.
123. Pavlov VA, Tracey KJ. Neural circuitry and immunity. *Immunologic research*. 2015;63(1):38-57.
124. Hoover DB. Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. *Pharmacology & therapeutics*. 2017;179:1-16.
125. Eduardo C-RC, Alejandra T-IG, Guadalupe D-RKJ, Herminia V-RG, Lenin P, Enrique B-V, et al. Modulation of the extraneuronal cholinergic system on main innate response leukocytes. *Journal of Neuroimmunology*. 2019;327:22-35.
126. Shao B-Z, Ke P, Xu Z-Q, Wei W, Cheng M-H, Han B-Z, et al. Autophagy plays an important role in anti-inflammatory mechanisms stimulated by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Frontiers in immunology*. 2017;8:553.
127. Cao Y, Wang L, Lin L-T, Wang X-R, Ma S-M, Yang N-N, et al. Acupuncture attenuates cognitive deficits through $\alpha 7$ nAChR mediated anti-inflammatory pathway in chronic cerebral hypoperfusion rats. *Life Sciences*. 2021;266:118732.
128. Toyohara J, Hashimoto K. $\alpha 7$ nicotinic receptor agonists: potential therapeutic drugs for treatment of cognitive impairments in schizophrenia and Alzheimer's disease. *The open medicinal chemistry journal*. 2010;4:37.
129. Xu T-Y, Guo L-L, Wang P, Song J, Le Y-Y, Viollet B, et al. Chronic exposure to nicotine enhances insulin sensitivity through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-STAT3 pathway. *PLoS One*. 2012;7(12):e51217.
130. Li D-J, Zhao T, Xin R-J, Wang Y-Y, Fei Y-B, Shen F-M. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against oxidant stress damage through reducing vascular peroxidase-1 in a JNK signaling-dependent manner in endothelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2014;33(2):468-78.
131. Gupta D, Lacayo AA, Greene SM, Leahy JL, Jetton TL. β -Cell mass restoration by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(52):20295-306.

132. Duris K, Manaenko A, Suzuki H, Rolland WB, Krafft PR, Zhang JH. α 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 attenuates early brain injury in a perforation model of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*. 2011;42(12):3530-6.
133. Li F, Chen Z, Pan Q, Fu S, Lin F, Ren H, et al. The protective effect of PNU-282987, a selective α 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist, on the hepatic ischemia-reperfusion injury is associated with the inhibition of high-mobility group box 1 protein expression and nuclear factor κ B activation in mice. *Shock*. 2013;39(2):197-203.
134. Su X, Lee JW, Matthay ZA, Mednick G, Uchida T, Fang X, et al. Activation of the α 7 nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007;37(2):186-92.
135. Zhang Y, Zhou F, Wang Z, Li Z, Li J. PNU-282987 attenuates intestinal epithelial barrier dysfunction in LPS-induced endotoxemia. *Inflammation*. 2020;43(2):417-24.
136. Pinheiro NM, Santana FP, Almeida RR, Guerreiro M, Martins MA, Caperuto LC, et al. Acute lung injury is reduced by the α 7nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. *The FASEB Journal*. 2017;31(1):320-32.
137. Fang J-G, Liu Y-h, Wang W-Q, Xie W, Fang S-x, Han H-g. The anti-endotoxic effect of o-aminobenzoic acid from *Radix Isatidis*. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005;26(5):593-7.
138. Souza ACP, Souza CM, Amaral CL, Lemes SF, Santucci LF, Milanski M, et al. Short-Term High-Fat Diet Consumption Reduces Hypothalamic Expression of the Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha7 Subunit (α 7nAChR) and Affects the Anti-inflammatory Response in a Mouse Model of Sepsis. *Front Immunol*. 2019;10:565.
139. Iskit AB, Sungur A, Gedikoglu G, Guc MO. The effects of bosentan, aminoguanidine and L-canavanine on mesenteric blood flow, spleen and liver in endotoxaemic mice. *European journal of pharmacology*. 1999;379(1):73-80.
140. Sautner T, Wessely C, Riegler M, Sedivy R, Götzinger P, Losert U, et al. Early effects of catecholamine therapy on mucosal integrity, intestinal blood flow, and oxygen metabolism in porcine endotoxin shock. *Annals of surgery*. 1998;228(2):239.
141. Iskit AB, Senel I, Sokmensuer C, Guc MO. Endothelin receptor antagonist bosentan improves survival in a murine caecal ligation and puncture model of septic shock. *European journal of pharmacology*. 2004;506(1):83-8.
142. McCulloch K, McGrath J. Neurohumoral regulation of vascular tone. *An Introduction to Vascular Biology*. 2002:70-92.
143. Hill CE, Phillips JK, Sandow SL. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Medicinal research reviews*. 2001;21(1):1-60.
144. Westcott EB, Segal SS. Perivascular innervation: a multiplicity of roles in vasomotor control and myoendothelial signaling. *Microcirculation*. 2013;20(3):217-38.
145. Sheng Y, Zhu L. The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2018;10(1):17-28.
146. Greer J. Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in sepsis. *BJA Education*. 2015;15(6):316-21.
147. Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(3):361-70.
148. Lee SH, Ok SH, Kang D, Kim HJ, Ahn SH, Bae SI, et al. Nitric oxide-dependent vasodilation induced by minoxidil in isolated rat aorta. *Gen Physiol Biophys*. 2021;40(3):197-206.
149. Pittner J, Liu R, Brown R, Wolgast M, Persson AE. Visualization of nitric oxide production and intracellular calcium in juxtamedullary afferent arteriolar endothelial cells. *Acta Physiol Scand*. 2003;179(3):309-17.

150. Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Impaired Vasodilation in the Pathogenesis of Hypertension: Focus on Nitric Oxide, Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factors, and Prostaglandins. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2012;14(4):198-205.
151. El-Awady MS, Nader MA, Sharawy MH. The inhibition of inducible nitric oxide synthase and oxidative stress by agmatine attenuates vascular dysfunction in rat acute endotoxemic model. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2017;55:74-80.
152. Drake-Holland AJ, Noble MI. The important new drug target in cardiovascular medicine-the vascular glycocalyx. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders)*. 2009;9(2):118-23.
153. Ince C, Sinaasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Critical care medicine*. 1999;27(7):1369-77.
154. Cronenwett JL, Lindenauer SM. Direct measurement of arteriovenous anastomotic blood flow in the septic canine hindlimb. *Surgery*. 1979;85(3):275-82.
155. Vajdová K, Smreková R, Kukan M, Jakubovský J, Rooijen Nv, Horecký J, et al. Endotoxin-induced aggravation of preservation-reperfusion injury of rat liver and its modulation. *Journal of Hepatology*. 2000;32(1):112-20.
156. Pscheidl EM, Wan JM, Blackburn GL, Bistrrian BR, Istfan NW. Influence of omega-3 fatty acids on splanchnic blood flow and lactate metabolism in an endotoxemic rat model. *Metabolism*. 1992;41(7):698-705.
157. Sun L, Zhang G-f, Zhang X, Liu Q, Liu J-g, Su D-f, et al. Combined administration of anisodamine and neostigmine produces anti-shock effects: involvement of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012;33(6):761-6.
158. Wazea SA, Wadie W, Bahgat AK, El-Abhar HS. Galantamine anti-colitic effect: Role of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in modulating Jak/STAT3, NF- κ B/HMGB1/RAGE and p-AKT/Bcl-2 pathways. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-10.
159. Miceli P, Jacobson K. Cholinergic pathways modulate experimental dinitrobenzene sulfonic acid colitis in rats. *Autonomic Neuroscience*. 2003;105(1):16-24.
160. Shao Z, Li Q, Wang S, Chen Z. Protective effects of PNU-282987 on sepsis-induced acute lung injury in mice. *Molecular Medicine Reports*. 2019;19(5):3791-8.
161. Miliaraki M, Briassoulis P, Ilia S, Michalakakou K, Karakonstantakis T, Polonifi A, et al. Oxidant/Antioxidant Status Is Impaired in Sepsis and Is Related to Anti-Apoptotic, Inflammatory, and Innate Immunity Alterations. *Antioxidants*. 2022;11(2):231.
162. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
163. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
164. Sakaguchi S. [Metabolic aspects of endotoxin as a model of septic shock--approached from oxidative stress]. *Yakugaku Zasshi*. 2004;124(2):69-87.
165. Wu H, Wang Y, Zhang Y, Xu F, Chen J, Duan L, et al. Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress. *Redox Biology*. 2020;32:101500.
166. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458-62.
167. Pereira MR, Leite PEC. The involvement of parasympathetic and sympathetic nerve in the inflammatory reflex. *Journal of cellular physiology*. 2016;231(9):1862-9.

168. Abdel-Salam OM, Abdel-Rahman RF, Sleem AA, Mosry FA, Sharaf HA. Effects of afferent and efferent denervation of vagal nerve on endotoxin-induced oxidative stress in rats. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013;120(12):1673-88.
169. Sen T, Cawthon CR, Ihde BT, Hajnal A, DiLorenzo PM, de La Serre CB, et al. Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity. *Physiology & behavior*. 2017;173:305-17.