

# Pinealektomize Edilmiş Septik Sıçanlarda TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 ve IL-1 $\beta$ 'nin Kan Düzeyleri ile Karaciğer ve Böbrekte Gen Ekspresyonu Seviyelerindeki Değişimlerin Araştırılması

## *The Investigation of Liver and Kidney TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and IL-1 $\beta$ Gene Expression and Blood Levels in Pinealectomised Septic Rats*

Metehan Uzun<sup>1\*</sup>, Aysun Öztürk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

### ÖZET

**Amaç:** Sepsis artan morbidite ve mortalitesi nedeni ile dikkat çeken bir hastalıktır. Melatonin ise pineal bezden salgılanan bir hormon olup, immun işlevler üzerine etki ettiğine dair bilgiler bulunmaktadır. Bu çalışma ile pinealektomi (PLT) yapılan sıçanlarda sepsise karşı oluşan cevabın TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 ve IL-1 $\beta$  yönü ile değişip değişmediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu amaç doğrultusunda toplam 54 sıçandan SHAM, PLT-CLP ve SHAM PLT-CLP olmak üzere üç farklı grup oluşturulmuştur. PLT-CLP grubunda hem PLT yapılmış hem de çekumun delinmesi ile (CLP) sepsis modeli oluşturulmuştur. Her gruptan 0. saat ile sepsis sonrası 12. ve 24. saatlerde rastgele 6 sıçan seçilerek kan TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 ve IL-1 $\beta$  düzeyleri ölçülmüş ve aynı parametrelerin karaciğer ve böbrek gen ekspresyonları düzeyleri belirlenmiştir.

**Bulgular:** PLT-CLP grubunda 0. saat değerleri ile kıyaslandığında, 12. saate TNF- $\alpha$ , 12. ve 24. saatlerde IL-1 $\beta$  ve IL-6 seviyelerinde anlamlı artışlar, 24. saat IL-10 düzeyinde ise azalma belirlenmiştir ( $p < 0.01$ ). SHAM PLT-CLP grubunda ise TNF- $\alpha$  değerlerinde 24. saate, IL-1 $\beta$  düzeyinde 12. ve 24. saatlerde anlamlı artışlar kaydedilmiştir ( $p < 0.05$ ). Karaciğer TNF- $\alpha$  gen ekspresyonu değerleri sadece PLT-CLP grubunda, IL-10 değerleri ise SHAM PLT-CLP grubunda değişiklik göstermiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak PLT operasyonunun sepsis tablosunun daha erken ortaya çıkmasına yol açabileceği ve bu durumun azalan melatonin seviyeleri ile ilişkili olabileceği kanaatine varılmıştır. Bu nedenle, özellikle sepsis gelişme ihtimali olan hastaların buldukları ortamın ışık yoğunluğu ve ışığa maruz kaldıkları sürelerin gözden geçirilmesi ve bu konuda daha dikkatli olunması gerektiği önerilmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Melatonin, sepsis, sitokinler, CLP

### ABSTRACT

**Introduction:** Sepsis is a remarkable disease due to its cause of increased morbidity and mortality. Melatonin is a hormone secreted from the pineal gland and previous reports demonstrated its effects on the immune function. The aim of this study was to investigate whether the change of septic response according to TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and IL-1 $\beta$  levels in pinealectomised (PLT) rats.

**Material and Methods:** For this purpose, three different groups as SHAM, PLT-CLP and SHAM PLT-CLP were formed. In the PLT-CLP group, both PLT and cecal ligation puncture (CLP) model were applied. Six rats were randomly selected from each group at before and 12<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hours after CLP administration. Blood TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 and IL-1 $\beta$  levels were measured and liver and kidney gene expression levels of the same parameters were determined.

**Results:** In the PLT-CLP group, TNF- $\alpha$  at the 12<sup>th</sup> hour and IL-1 $\beta$  and IL-6 levels at 12<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hours were significantly increased and IL-10 level was decreased at the 24<sup>th</sup> hour ( $p < 0.01$ ) compared to before of CLP administration. In the SHAM PLT-CLP group, there was a significant increase in the TNF- $\alpha$  values at 24<sup>th</sup> hour and at the 12<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hours of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ). Liver TNF- $\alpha$  gene expression values were varied only in the PLT-CLP group while IL-10 values were changed in the SHAM PLT-CLP group.

**Conclusion:** As a result, it was concluded that pinealectomy may lead to the earlier appearance of sepsis, and this may be related to decreased levels of melatonin. Therefore, it is recommended that patients having the possibility of developing sepsis should consider the light intensity and duration of exposure to the environment in which they are exposed and that more attention should be paid to this issue.

**Key Words:** Melatonin, sepsis, cytokines, CLP

\*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Metehan Uzun, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale

E-mail: metehanuzun@hotmail.com, Tel: 0 (543) 582 86 83

\*Bu çalışma, Aysun Öztürk tarafından hazırlanan "Pinealektomize edilmiş septik sıçanlarda karaciğer ve böbrek TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 ve IL-1 $\beta$  gen ekspresyonu ve plazma düzeylerindeki değişimlerin araştırılması" (2017) başlıklı yüksek lisans tezinden alınmış olup Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi BAP komisyonu tarafından TYL-2014-196 kod nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Geliş Tarihi: 31.07.2018, Kabul Tarihi: 12.02.2019

## Giriş

Melatonin, epifiz bezi olarak ta isimlendirilen pineal bezden salgılanan (N-acetyl5-methoxytryptamine) bir hormon olup aydınlık ve karanlık döngüsünü ve sirkadiyen ritmi ayarlayan önemli moleküllerden bir tanesi olarak kabul edilir (1).

Sepsis, enfeksiyona karşı verilen sistematik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmakta olup yüksek mortalite ve morbidite ile seyretmektedir (2). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde son yıllarda sepsise bağlı ölümler dikkat çekici boyutlardadır. Bu nedenle sepsis tedavisi veya sepsise karşı organizmanın savunma gücünü artırıcı yöntemlerin geliştirilmesi ve sepsisten korunma ve tedavi açısından yeni yaklaşımların ortaya konulması gerekmektedir. Bu amaçla deney hayvanları üzerinde birçok araştırma yürütülmektedir. Deney hayvanlarında sepsis modeli olarak en fazla kullanılan yöntemlerden bir tanesi ise çekal bağlama ve delme (CLP) yöntemidir. Bu yöntem ile bağırsakta yaşayan bakterilerin karın boşluğuna bulaştırılması ve oluşan enfeksiyona karşı vücudun verdiği yangısal yanıtların belirlenmesi hedeflenmektedir (3).

Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), proinflamatuvar sitokin olarak bilinmekte ve diğer sitokinler olan interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), IL-17A ve IL-8 ile birlikte sepsiste salınmaktadır (4). İnflamasyon uyarısı aynı zamanda bir antiinflamatuvar sitokin olan IL-10'da salınmasına yol açmaktadır (5). Karaciğer ve böbrek hem bu sitokinlerin salgılandığı hem de sepsisten etkilenen başlıca iki organ olarak karşımıza çıkmaktadır (6).

Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda sirkadiyen ritmin bozulduğu ve melatonin salgısının azaldığı bildirilmektedir (7). Bu hastaların aynı zamanda sepsise karşı duyarlılığının diğer insanlara göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (8). Duyarlılık artışının bir nedeninin melatonin yoksunluğuna bağlı geliştiği iddia edilse de mekanizmayı ortaya koyacak araştırmalar yetersizdir. Bu nedenle melatonin yoksunluğu durumlarında sepsis gelişiminin incelenmesi ve ilgili bazı sitokinlerin düzeylerindeki değişimlerin araştırılması önem arz etmektedir.

Bu araştırma ile pinealektomi (PLT) yapılan ve CLP modeli ile sepsis oluşturulan sıçanlarda kan sitokin düzeyleri ile karaciğer ve böbrek sitokin gen ekspresyonu değerlerinde herhangi bir değişiklik olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda; PLT sonrası karaciğer ve böbrek TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 ve IL-1 $\beta$  gen ekspresyonları düzeyleri ile bu sitokinlerin kan seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (Karar no: 2014-11-15) ile yürütülmüştür.

Araştırmada 4-5 aylık, 200-300 gram ağırlığında Wistar Albino ırkı toplam 54 adet erkek erişkin sıçan kullanıldı. Deneysel süreç boyunca tüm sıçanlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ve ortam sıcaklığı 22 °C olacak şekilde ayarlanan ortamlarda barındırıldı. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yem ve şehir içme suyu kullanıldı. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi.

Deney grupları sıçanların canlı ağırlıkları dikkate alınarak her grupta 18 sıçan olacak şekilde oluşturuldu. Tüm gruplarda deneysel süreç 31 gün olarak belirlendi. Hayvanlara literatür bildirimlerine uygun olarak aşağıdaki işlemler uygulandı (9,10).

**1. grup (SHAM; n=18):** Bu gruba çalışmanın 1. günü PLT işlemi yapılmış olan gruplardaki tüm cerrahi işlemler uygulandı ancak sadece pineal bez çıkarılmadı. Bu sıçanlar 30 gün boyunca yukarıda bahsedilen ortamda kafeslerde beslendi. Çalışmanın 30. gününe gelindiğinde gruptan 0., 12. ve 24. saatlerde her seferinde rastgele 6 sıçan seçilerek aşağıdaki işlemler uygulandı.

**0. saat:** Bu amaçla rastgele seçilen 6 sıçandan sabah saat 08:00-10:00 saatleri arasında anestezi altında kalpten kan örnekleri alınan hayvanlar servikal dislokasyon işlemi uygulanarak feda edildi karaciğer ve böbrekten doku örnekleri elde edildi. Geriye kalan 12 sıçana SHAM CLP işlemi uygulandı.

**12. saat:** SHAM CLP uygulamasından 12 saat sonra (aynı gün akşam 20:00-22:00 saatleri arasında) sıçanlardan yine rastgele 6 tanesi seçilerek 0. saatte yapılan işlemler tekrarlandı.

**24. saat:** Geriye kalan 6 sıçana SHAM CLP uygulamasından 24 saat sonra (ertesi gün sabah 08:00-10:00 saatleri arasında) 0. saatte yapılan işlemler tekrarlandı.

**2. grup (PLT-CLP; n=18):** Bu gruba çalışmanın 1. gününde PLT işlemi yapıldı. Deneysel sürecin 30. gününde ise 0. saatte işlem yapılanlar hariç geriye kalan 12 sıçana CLP operasyonu yapılarak sepsis modeli oluşturuldu.

**0. saat:** PLT operasyonundan 30 gün sonra bu gruptan rastgele seçilen 6 sıçandan sabah saat 08:00-10:00 saatleri arasında anestezi altında kalpten kan örnekleri alınan hayvanlar servikal dislokasyon işlemi uygulanarak feda edildi, karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri elde edildi. Geriye kalan 12 sıçana CLP işlemi uygulandı.

**Tablo 1.** Tüm gruplarda plazma TNF- $\alpha$  düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişiklikler (0. saatle kıyaslandığında; \*: p<0,05, \*\*\*: p<0.001, Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır)

Gruplar	Plazma TNF- $\alpha$ düzeyleri (pg/ml)		
	Sepsis öncesi 0.saat	12. saat	Sepsis sonrası 24. saat
SHAM	1.3 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.5
PLT-CLP	1.9 $\pm$ 0.5	6.6 $\pm$ 0.6 ***	2.4 $\pm$ 0.4
SHAM PLT-CLP	2.0 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 1	5.3 $\pm$ 0.7 *

**Tablo 2.** Tüm gruplarda plazma IL1- $\beta$  düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişiklikler (0. saatle kıyaslandığında; \*\*p<0.01, \*\*\*: p<0.001, Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır)

Gruplar	Plazma IL-1 $\beta$ düzeyleri (pg/ml)		
	Sepsis öncesi 0. saat	12. saat	Sepsis sonrası 24. saat
SHAM	72,2 $\pm$ 18,6	61,6 $\pm$ 2,3	68 $\pm$ 6,9
PLT-CLP	49,6 $\pm$ 1,3	81,2 $\pm$ 8,9 **	67,7 $\pm$ 3,9 **
SHAM PLT-CLP	50,9 $\pm$ 3,9	76,6 $\pm$ 6,9 **	77,7 $\pm$ 2,8 ***

**12. saat:** CLP işleminden 12 saat sonra (aynı gün 20:00-22:00 saatleri arasında) sıçanlardan yine rastgele 6 tanesi seçilerek 0. saatte yapılan işlemler tekrarlandı.

**24. saat:** Geriye kalan 6 sıçana ise CLP işleminden 24 saat sonra (ertesi gün sabah 08:00-10:00 saatleri arasında) 0. saatte yapılan işlemler aynen uygulandı.

**3. grup (SHAM PLT-CLP; n=18):** Bu gruba çalışmanın 1. gününde PLT işlemi yapılmış olan gruplardaki tüm cerrahi işlemler uygulandı ancak sadece pineal bez çıkarılmadı. Deneysel sürecin 30. gününde 0. saatte işlem yapılanlar hariç geriye kalan 12 sıçana CLP operasyonu yapılarak sepsis modeli oluşturuldu.

**0. Saat:** Bu amaçla çalışmanın 30. gününde rastgele seçilen 6 sıçandan sabah saat 08:00-10:00 saatleri arasında anestezi altında kalpten kan örnekleri alınan hayvanlar servikal dislokasyon işlemi uygulanarak feda edildi, karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri de alındı. Geriye kalan 12 sıçana CLP işlemi uygulandı;

**12.saat:** CLP işleminden 12 saat sonra (aynı gün 20:00-22:00 saatleri arasında) sıçanlardan yine rastgele 6 tanesi seçilerek 0. saatte yapılan işlemler tekrarlandı.

**24. saat:** Geriye kalan 6 sıçana ise CLP işleminden 24 saat sonra (ertesi gün sabah 08:00-10:00 saatleri arasında) 0. saatte yapılan işlemler aynen uygulandı.

**Anestezi Yapılması:** PLT ve CLP operasyonu, genel anestezi altında gerçekleştirildi. Bu amaçla ksilazin (5 mg/kg; rompun) ve ketamin (60 mg/kg; ketalar) intramüsküler olarak uygulandı ve sıçanlar genel anesteziye alındı.

**Pinealektomi Operasyonunun Yapılması:** PLT operasyonu Ovalı ve Uzun'un belirttiği yönteme göre

yapıldı. Anestezi sonrasında kafa derisi traşlanan sıçanların kafatasının üst kısmından 3 cm'lik bir deri insizyonu ile cilt açıldı. Kafatasında dışı turu yardımıyla lambda bölgesinden 3-5 mm çapında açılan daireden kafatası kemiği bir forsepsle tutularak kaldırıldı ve yaklaşık 60°'lik bir açıdan ince uçlu bir forsepsle pineal bezin bulunduğu bölgeye girilerek pineal bez sap kısmından tutularak alındı (9).

**Çekal Bağlama ve Delme Operasyonunun Yapılması:** Sıçanlar operasyondan önce 12 saat aç bırakıldı. Anestezi işlemi sonrası ilk olarak karın bölgesi tıraş edildi ve tıraş sonrası % 10'luk povidiniodine ile karın duvarı bakteriyel kontaminasyon olmaması için dezenfekte edildi. Daha sonra karın orta hatta 2 cm kesi yapıldı, çekum izole edildi, ileoçekal valfin hemen distalinde çekum 3-0 ipek iplik ile bağlandı. Çekum, 18 gauge iğne ile 2 farklı yerden delindi, delindikten sonra bağırsak içeriği dışarı çıkana kadar hafifçe sıkıldı (10). Daha sonra karın duvarı dikildi, sıçanlar postoperatif bireysel kafeslere alındı. Anesteziden çıktığı belirlenen sıçanlar normal kafeslerine alındı. SHAM CLP yapılan sıçanlara çekumun delinmesi ve bağırsak içeriğinin karın boşluğuna bulaştırılması aşaması hariç yukarıdaki işlemler aynen uygulandı.

**Kan Örneklerinin Alınması:** Kan örnekleri sol ventrikülden bir enjektör ile 0., 12. ve 24. saatlerde alındı

**Doku Örneklerinin Alınması:** Karaciğer ve sağ böbrekten doku örnekleri hızlı bir şekilde alındı ve izotonik sodyum klorür ile yıkandıktan sonra RNAaz-free tüplere konuldu. Tüm sıçanlardan doku örneği alınması bittikten sonra dokular gen ekspresyonları

**Tablo 3.** Tüm gruplarda plazma IL-6 düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişiklikler (0. saatle kıyaslandığında; \*: p<0,05, Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır)

Gruplar	Plazma IL-6 düzeyleri (pg/ml)		
	Sepsis öncesi 0. saat	Sepsis sonrası	
		12. saat	24. saat
SHAM	4,4 ± 1,3	7,8 ± 1,7	5,6 ± 0,8
PLT-CLP	3,8 ± 0,7	8,6 ± 1,6 *	6,8 ± 0,9 *
SHAM PLT-CLP	6,6 ± 2,6	8,8 ± 1,7	6,2 ± 0,7

**Tablo 4.** Tüm gruplarda plazma IL-10 düzeylerinde saatlere göre meydana gelen değişiklikler (0. saatle kıyaslandığında; \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, 12. saatle kıyaslandığında ‡: p<0,01, δ: p<0,05, Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır)

Gruplar	Plazma IL-10 düzeyleri (pg/ml)		
	Sepsis öncesi 0. saat	Sepsis sonrası	
		12. saat	24. saat
SHAM	78 ± 2,2	80,2 ± 6,6	68,5 ± 3,7
PLT-CLP	73,2 ± 4,7	88,4 ± 8	54,5 ± 6,2 *‡
SHAM PLT-CLP	76,2 ± 4,2	86,5 ± 11,7	56,8 ± 5 **δ

belirleninceye kadar -80 °C' de saklandı.

**Biyokimyasal Analizler:** Çalışmada tüplere alınan kanlar 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Sonuçlar ELX 808 IU model ELISA okuyucusunda okunarak hesaplandı. Plazma TNF-α (KRC3011, Invitrogen ABD), IL-1β (SEA563Ra, USCN, Wuhan, Çin) IL-6 (SEA079Ra, USCN, Wuhan, Çin) ve IL-10 düzeylerinin belirlenmesi için (SEA056Ra, USCN, Wuhan, Çin) ticari ELISA kiti kullanıldı.

#### Genetik Analizler

**Total RNA İzolasyonu:** Total RNA izolasyonu -80 °C'de bekletilen doku örneklerinden kit kullanılarak (Ambion Pure Link RNA MiniKit, Katalog No:1218301A, Life Technologies, ABD) manuel yolla yapıldı.

İzole edilen RNA'lar steril 0,2 ml'lik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tüplerine alındı. cDNA eldesi manuel olarak kit yardımıyla yapıldı (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 200 reaction, ABD). Yönteme uygun olarak elde edilen karışım PCR tüplerine dağıtıldı ve uygun şartlar altında PCR cihazında (Applied Biosystems®) çalışıldı.

Çoğaltılan cDNA örnekleri kantitatif real time PCR (qRT-PCR; LightCycler®480, Roche) çalışması için kullanıldı. Syber Green kullanılarak gen ekspresyon seviyeleri analiz edildi (Power SYBR Green PCR Master Mix, 5 ml, Applied Biosystems, İngiltere).

**İstatistiksel Analiz:** Biyokimyasal veriler, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 16.0 (Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirildi. Bulgular ortalama±standart hata

olarak verilmiştir. İki grup karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki'den fazla grubun karşılaştırılmasında ise non parametrik sonuçlar için uygun olan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kruskal-Wallis analizinde fark bulunması durumunda ikili karşılaştırma testi olarak Mann-Whitney U testi kullanıldı. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında en az p<0,05 değerindeki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Genetik analizler için qRT-PCR yönteminde elde edilen CP (Crossing points) değerleri düzenlendi. qRT-PCR sonuçlarına istatistiksel analiz yapılırken 2<sup>-ΔCp</sup> formülü kullanıldı. (ΔCp= Hedef gen – Referans Gen; 11). Elde edilen sonuçların yorumlanmasında p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

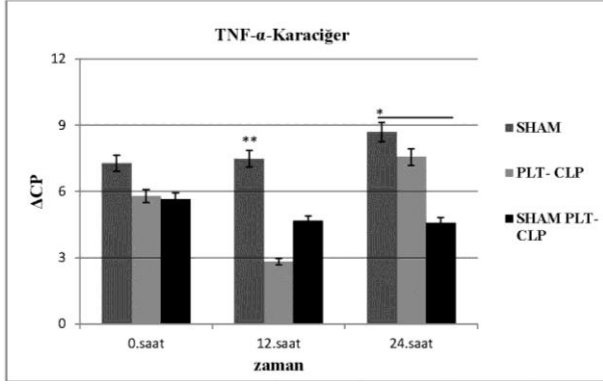
#### Bulgular

**Plazmada Belirlenen Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimler:** Kan TNF-α, IL-1β, IL-6 ve IL-10 düzeylerinin değişimleri ve gruplar arası karşılaştırılması Tablo 1-4'de gösterilmiştir.

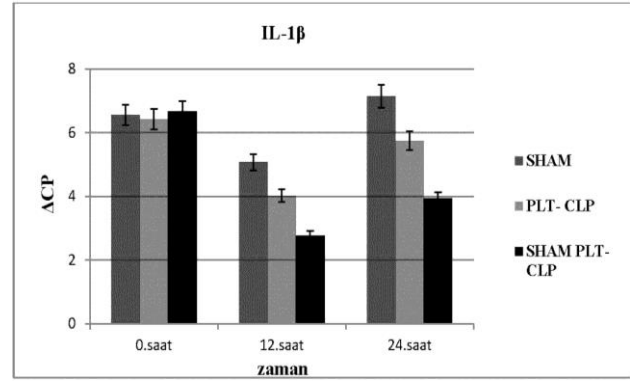
#### Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

**Karaciğer Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler:** Karaciğer TNF-α gen ekspresyon düzeylerinde elde edilen veriler ve bu sonuçların istatistiksel karşılaştırmaları Şekil 1'de gösterilmiştir.

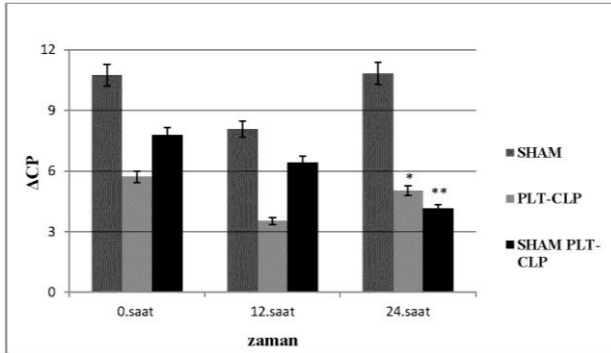
Karaciğer IL-1β gen ekspresyon düzeylerine için elde edilen bulgulara uygulanan istatistiksel değerlendirmede herhangi bir anlamlılık düzeyine



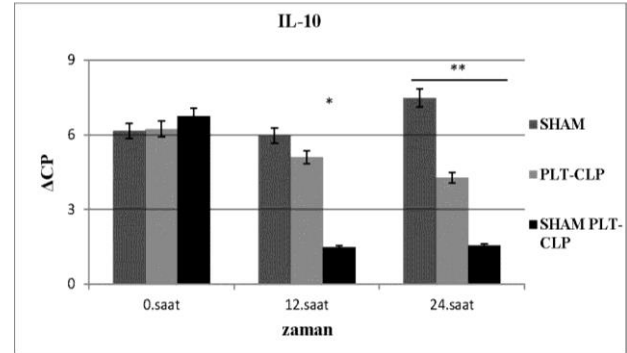
**Şekil 1.** Karaciğer TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi (\*:SHAM grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ , \*\*:SHAM grubu karşılaştırıldığında  $p < 0.01$ )



**Şekil 2.** Karaciğer IL-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi



**Şekil 3.** Karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi (\*:SHAM grubuna göre  $p < 0.05$ , \*\*:SHAM grubuna göre  $p < 0.01$ )



**Şekil 4.** Karaciğer IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ve grafiksel gösterimi (\*:SHAM grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ , \*\*:SHAM grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.01$ )

rastlanılmamıştır (Şekil 2).

Karaciğer IL-6 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin 24. saatte ortaya çıktığı görülmüştür (Şekil 3)

Karaciğer IL-10 gen ekspresyon seviyesi verileri incelendiğinde, en büyük değişimin SHAM PLT-CLP grubunda olduğu saptanmıştır (Şekil 4).

**Böbrek Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler:** Böbrek TNF- $\alpha$  gen ekspresyon değerleri açısından gruplarda saatlere göre anlamlı değişikliklere rastlanılmamıştır (Şekil 5).

**Böbrek IL-1 $\beta$  Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler:** Böbrek IL-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması yapıldığında, 0. Saatte SHAM grubu ve SHAM PLT-CLP grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır. PLT-CLP grubu 24. saat ve SHAM PLT-CLP grubu 24. saat gen ekspresyon verileri kıyaslandığında PLT-CLP grubu seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (Şekil 6).

Böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında saatlere göre anlamlı değişiklikler belirlenmemiştir (Şekil 7).

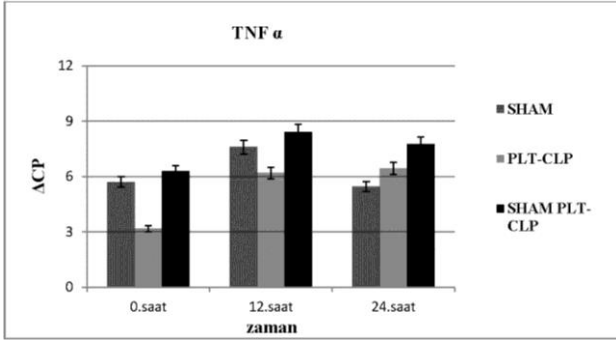
Böbrek IL-10 gen ekspresyon değerleri açısından gruplarda ortaya çıkan değişimler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır (Şekil 8).

## Tartışma

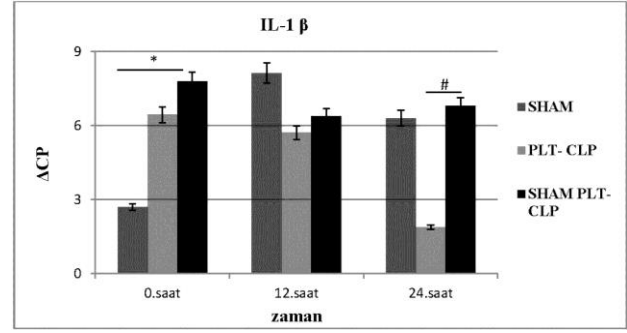
Bu çalışmada PLT sonrası CLP yapılan sıçanlarda kan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-10 düzeyleri ile bu sitokinlerin karaciğer ve böbrek dokusundaki gen ekspresyon değerleri ilk kez belirlenmiştir.

PLT operasyonu melatonin yoksunluğu oluşturmak amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Operasyon ile pineal bez çıkarılmakta ve melatoninin esas salgılanma kaynağı olan bez ortadan kaldırılmaktadır. Bu çalışmada literatür bilgisi dikkate alınarak PLT sonrası 30 gün beklenmiş ve SHAM CLP veya CLP işlemleri uygulanmıştır (9).

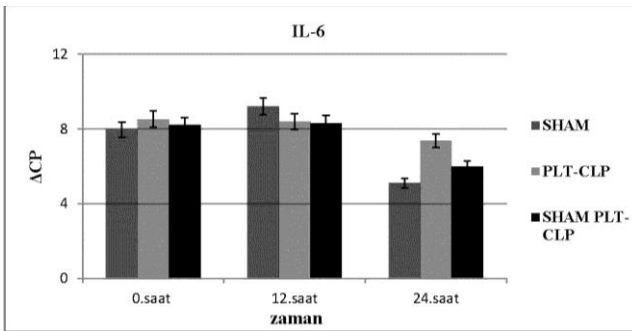
Sepsis enfeksiyona karşı verilen sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizma ve



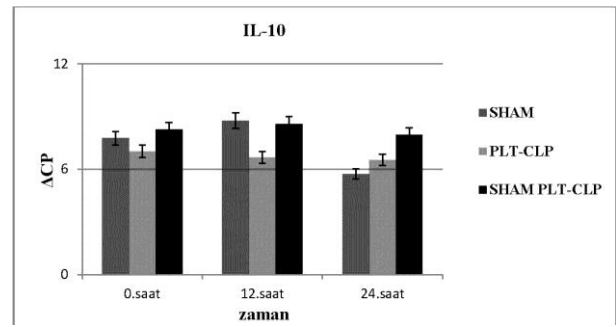
Şekil 5. Böbrek TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi



Şekil 6. Böbrek IL-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi (\*:SHAM grubu ile kıyaslandığında  $p<0.05$ , #: PLT-CLP grubu ile SHAM PLT-CLP grubu kıyaslandığında  $p<0.05$ )



Şekil 7. Böbrek IL-6 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi



Şekil 8. Böbrek IL-10 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi

konakçı ile karşılaşılması sonrasında doğal bağışıklık süreçleri başlayarak mononükleer hücreler tarafından proinflatuar sitokinlerin salgılanması uyarılır. Bu amaçla IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler salgılanır (4,5).

İnflatuar süreçler ve melatonin ilişkisi son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bu amaçla birçok in vivo çalışma yapılmış olup melatoninin yeni doğanlarda septik şoka karşı faydalı etkilerinin olduğu belirtilmiştir (12). Melatoninin bu etkisi nedeni ile ileride insanlarda septik şokun tedavisinde yardımcı bir ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırılması öngörülmüştür.

Melatonin ve sepsis üzerine etkilerini incelemek için deney hayvanı çalışmaları yapılmaktadır (13,14). Yukarıda belirtilen her iki çalışmada da dışarıdan ilave melatonin verilmesinin proinflatuar/antiinflatuar sitokin düzeyleri üzerine etkilerinin araştırıldığı görülmektedir. Yapılan literatür incelemesinde, melatonin yoksunluğu oluşturulan çalışmalara rastlanılamamıştır. Ancak melatonin reseptör antagonisti uygulanarak yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan iki tanesinde sepsis modeli oluşturulmuş ve MT1 ve MT2 reseptör antagonisti olarak luzindol kullanılarak melatoninin etkileri araştırılmıştır (13,15). Bu çalışmaların çıkış noktası daha çok sezonal ışık

düzeylerindeki değişimlerin immun fonksiyonlar üzerine etkilerini araştırmak olmuştur. Kısa ve uzun günlerin immun işlevleri etkilediğine dair veriler bulunmaktadır (16). Bizim yapmış olduğumuz araştırmada ise gün değişimlerinin yanı sıra uzun süreli melatonin salgılanmasını baskılayacak sürekli ışık vb. bir etkiye maruz kalmanın sepsis üzerine proinflatuar/antiinflatuar sitokinler yönünden nasıl bir etki oluşturacağına araştırılması hedeflenmiştir.

TNF- $\alpha$  yönünden bakıldığında; CLP yapılan her iki gruba ait veriler hem SHAM grubunun hem de grubun kendi 0. saat değerleri ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artışlar ortaya çıktığı görülmüştür. IL-1 $\beta$  seviyeleri hem PLT hem de PLT yapılmayan ancak CLP yapılan her iki grup açısından incelendiğinde CLP sonrası değerlerde istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu belirlenmiştir. Diğer bir proinflatuar sitokin olan IL-6 değerleri açısından elde edilen sonuçlar TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  sonuçlarına benzemekle beraber bazı farklılıklar da ortaya çıkmıştır. Fink ve ark., (13) yapmış oldukları çalışmada, CLP uygulamasından sonra TNF- $\alpha$  seviyesinin arttığını belirlemişlerdir. Huang ve Li (17) tarafından sıçanlar üzerinde yürütülen bir çalışmada ise benzer veriler elde edilmiş olup, CLP sonrası TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir.

Sıçanlar üzerinde yürütülen bir başka çalışmada ise deneysel CLP modeli oluşturulmuş ve plazmada IL-1 $\beta$  düzeyleri ile karaciğer ve akciğer histopatolojik olarak incelenmiştir. Melatonin verilerek CLP sonrası 3. ve 6. saatlerdeki IL-1 $\beta$  seviyeleri incelendiğinde melatoninin IL-1 $\beta$  düzeylerini azalttığı anlaşılmıştır. CLP grubundan daha düşük belirlenen IL-1 $\beta$  düzeylerinin SHAM grubuna göre ise daha yüksek seyrettiği anlaşılmıştır (18).

Sepsiste karaciğer en çok etkilenen organlardan birisi olarak bilinmektedir. Bu nedenle deneysel sepsis çalışmalarında karaciğer, incelenen başlıca organ olarak dikkat çekmektedir. Sepsiste karaciğer hasarı görülme oranının % 34.7 gibi yüksek bir değere ulaştığı söylenmektedir (19). Karaciğerin sepsisteki önemi ve sitokinlerle olan karşılıklı etkileşimine dair literatür bilgileri dikkate alınarak bu çalışmada karaciğer sitokinlerinin gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Karaciğer IL-1 $\beta$  yönünden mRNA ekspresyonlarında azalmalar ortaya çıkmış olmasına rağmen istatistiksel anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Hem PLT hem de SHAM PLT gruplarında sepsis sonrası IL-1 $\beta$  ekspresyon düzeyleri 12. ve 24. saatlerde SHAM grubuna göre düşük seyretmiştir. TNF- $\alpha$  gen ekspresyonu değerlerinde ise 12. saatte PLT-CLP, 24. saatte ise SHAM PLT-CLP grubundaki değerlerin SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. CLP yapılan her iki gruptaki değerlerin birbirlerine yakın olduğu ve SHAM grubuna göre daha düşük olduğu anlaşılmıştır. Bir diğer proinflatuar sitokin olan IL-6 karaciğer gen ekspresyonu değerlerine bakıldığında SHAM PLT grubunda 12. ve 24. saatlerde anlamlı azalmalar ortaya çıkmıştır.

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-10 olarak tüm parametrelerin karaciğer gen ekspresyonu verileri açısından değerlendirildiğinde sepsisin daha önemli olduğu, melatonin yoksunluğunun bu parametreleri etkilemediği anlaşılmaktadır. Literatür bildirimlerinde yer alan çalışmalarda melatonin yoksunluğundan ziyade dışarıdan ilave melatonin verilerek TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-10 düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. Melatoninin ilave olarak verilmesi ile yoksunluğunun oluşturulması arasında immün sisteme olan etkileri yönünden farklar bulunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar melatonin yoksunluğunun sepsiste karaciğer TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-10 gen ekspresyonu düzeyleri üzerine anlamlı etkiler oluşturmadığını göstermektedir. Diğer taraftan Cai ve ark. (20) sıçanlarda CLP yöntemi kullanarak oluşturdukları sepsiste NO metabolizmasını etkileyen bir ajan olarak sitrullini kullanmışlardır. Sitrullin uygulanan grupta en yüksek artışlar sepsis sonrası 12. ve 24. saatlerde ortaya çıkmışken CLP grubunda en yüksek artışlar 6. saatte gözlenmiştir. Bizim

çalışmamızda ise 6. saat verileri alınmamıştır. Dolayısı ile sepsis sonrası TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-10 değişimlerinin 12. saatten önce ortaya çıktığı ve buna bağlı olarak elde edilen sonuçlara ulaşıldığı düşünülebilir.

Böbrek TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-10 gen ekspresyonu değerlerinde verilerin tümü açısından herhangi bir istatistiksel anlamlı değişiklik belirlenmemiştir. Bu durum sepsisten böbreklerin sepsis sonrası 12. ve 24. saatlerde ya hiç etkilenmediğini ya da böbreklerin söz konusu sitokinler açısından sepsiste söz konusu saatler içerisinde herhangi bir yanıt oluşturmadığını düşündürülebilir. Böbrek işlevlerini ortaya koyan farklı herhangi bir parametre belirlenmediğinden elde edilen sonuçların yukarıdaki hangi hipoteze göre değişmediğini söyleyebilmek mümkün gözükmemektedir.

Yoğun bakım ünitelerinde yatan uyanık hastalar ile sepsis nedeni ile hayati tehlikesi olup uyutulmak zorunda olun hastalarda bozulan sirkadiyen ritmin melatonin üzerinden sepsisi nasıl etkileyebileceği konusu bilim adamlarının dikkatini çekmiştir (7). Nitekim Li ve ark.,(21) yoğun bakım ünitelerinde yatan septik hastalarda TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyeleri ile melatonin salgılanma ritmi arasında bir ilişki belirlemişlerdir.

Farelerde yapılan bir çalışmada ise CLP işleminden sonra melatonin verilen grupta TNF- $\alpha$  seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (22). Yine, An ve ark., (23) sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada CLP sonrası serum TNF- $\alpha$  düzeylerinde ortaya çıkan anlamlı artışların CLP sonrası melatonin verilen grupta azalma gösterdiğini belirlenmiştir.

Melatonin antiinflatuar bir molekül olarak bilinir. Bu etkisini oksidatif doku hasarını azaltmanın yanında seçici olarak kronik yangıyı azaltıcı özellikleri ile de gerçekleştirdiği belirtilmektedir (24,25).

Bu çalışmada melatonin ilavesinden ziyade melatonin yoksunluğu oluşturmak amacı ile PLT yapılan sıçanlar kullanılmıştır. Kan TNF- $\alpha$  düzeylerine bakıldığında en yüksek artışın PLT grubunda CLP sonrası 12. saatte ortaya çıktığı görülmüştür. Bu sonuç melatonin yoksunluğunun TNF- $\alpha$  seviyelerinde anlamlı bir artışa yol açtığını göstermekte ve literatür bilgileri ile örtüşmektedir. Ancak 24. saatte TNF alfa seviyeleri SHAM grubundaki değerlerine yaklaşmıştır. Oysa aynı saatte PLT yapılmayan CLP grubunda TNF- $\alpha$  seviyeleri daha da artış göstermiştir. Bu farklılığın nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde PLT-CLP grubunda yangısel süreçlerin PLT yapılmayan CLP grubuna göre daha önce ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada gerek SHAM grubunda ve gerekse SHAM PLT grubunda pineal bez çıkarılmadan sepsis

modeli gerçekleştirilmiştir. PLT grubunda ise pineal bez çıkarılmıştır. Dolayısı ile belirlenen sitokinler veya CLP sonrası ortaya çıkan ancak bu çalışmada düzeyleri belirlenmeyen tüm diğer sitokinler ile melatonin sekresyonu açısından gruplar arasında bir farklılık ortaya çıkmış olabilir.

Bu sonuçlara göre herhangi bir şekilde melatonin yoksunluğu oluşan insanlarda sepsise yaklaşım ve tedavi yöntemleri uygulanırken; (1) sepsisin daha hızlı gelişebileceği, (2) karaciğerin sepsise diğer insanlara göre ilk 12. saat içerisinde daha hızlı yanıt verebileceği, (3) karaciğer sepsis yanıtında melatonin yoksunluğu kadar sepsisin de etkili olduğu, (4) böbreklerin ilk 24 saat içerisinde karaciğere göre daha az etkilenebileceği gibi bulguların da dikkate alınmasını da fayda olacağı düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(13): 2001-2018.
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis: current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(3): 259-272.
- Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis. *Trends Microbiol* 2011; 19(4): 198-208.
- Hack, CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* 1997; 66: 101-195.
- Poll T, Malefyt RT, Coyle SM and. Lowry SF. Antiinflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *J Infect Dis* 1997; 175(1): 118-122.
- Wei Y, Shan L, Qiao L, Liu R, Hu Z, Zhang W. Protective effects of Huang-LianJie-Du-Tang against polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats. *Evid Based Complement Alternat Med* doi: 10.1155/2013/909624, 2013.
- Mundigler G, Delle-Karth G, Koreny M, Zehetgruber M, Steindl-Munda P, Ferti Siostrzonek P. Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30(3): 536-540.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7): 1303-1310.
- Canpolat S, Sandal S, Yılmaz B, Yaşar A, Kutlu S, Baydas G, et al. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur J Pharmacol* 2001; 428(1): 145-148.
- Xu L, Bao HG, Si YN, Han L, Zhang R, Cai MM, et al. Effects of adiponectin on acute lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis rats. *J Surg Res* 2013; 183(2): 752-759.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
- Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, et al. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res* 2001; 50(6): 756-760.
- Fink T, Glas M, Wolf A, Kleber A, Reus E, Wolff M, et al. Melatonin receptors mediate improvements of survival in a model of polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 2014; 42(1): 22-31.
- Chen HH, Chang CL, Lin KC, Sung PH, Chai HT, Zhen YY, et al. Melatonin augments apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell treatment against sepsis-induced acute lung injury. *Am J Transl Res* 2014; 6(5): 439-458.
- Zhou MO, Jiao S, Liu Z, Zhang ZH, Mei YA. Luzindole, a melatonin receptor antagonist, inhibits the transient outward K<sup>+</sup> current in rat cerebellar granule cells. *Brain Res* 2003; 970(1-2): 169-177.
- Champney TH, Allen GC, Zannelli M, Beausang LA. Time-dependent effects of melatonin on immune measurements in male Syrian hamsters. *J Pineal Res* 1998; 25(3): 142-146.
- Huang R, Li M. Protective effect of Astragaloside IV against sepsis-induced acute lung injury in rats. *Saudi Pharm J* 2016; 24(3): 341-347.
- Wu JY, Tsou MY, Chen TH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res* 2008; 45(1): 106-116.
- Kobashi H, Toshimori J, Yamamoto K. Sepsis-associated liver injury: incidence, classification and the clinical significance. *Hepatology Research* 2013; 43(3): 255-266.
- Cai B, Luo YL, Wang SJ, Wei WY, Zhang XH, Huang W, et al. Does citrulline have protective effects on liver injury in septic rats. *BioMed Res Int*. 2016. doi: 10.1155/2016/1469590.
- Li CX, Liang DD, Xie GH, Cheng BL, Chen QX, Wu SJ, et al. Altered melatonin secretion and circadian gene expression with increased proinflammatory cytokine expression in early-stage sepsis patients. *Mol Med Rep* 2013; 7(4): 1117-1122.



22. Volt H, García JA, Doerrier C, Díaz-Casado ME, Guerra-Librero A, López LC, Escames G, et al. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res* 2016; 60(2): 193-205.
23. An R, Zhao L, Xu J, Xi C, Li H, Shen G, et al. Resveratrol alleviates sepsis-induced myocardial injury in rats by suppressing neutrophil accumulation, the induction of TNF- $\alpha$  and myocardial apoptosis via activation of Sirt1. *Mol Med Rep* 2016; 14(6): 5297-5303.
24. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Guerrero JM, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res* 2005; 39(4): 400-408.
25. Shang Y, Xu SP, Wu Y, Jiang YX, Wu ZY, Yuan SY, et al. Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chin Med J* 2009; 122(12): 1388-1393.