T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA LPS İLE OLUŞTURULMUŞ SEPSİS MODELİNDE ASTAKSANTİNİN KARACİĞER DOKUSUNDA ANTİENFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Nurdan ÇOBANER

Anesteziyoloji ve Reanimasyon
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2017

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA LPS İLE OLUŞTURULMUŞ SEPSİS MODELİNDE ASTAKSANTİNİN KARACİĞER DOKUSUNDA ANTİENFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Nurdan ÇOBANER

Anesteziyoloji ve Reanimasyon
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Birgül YELKEN

ESKİŞEHİR
2017

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Nurdan ÇOBANER'e ait "Sıçanlarda LPS ile oluşturulmuş sepsis modelinde astaksantinin karaciğer dokusunda antienflamatuar etkilerinin araştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı Prof. Dr. Birgül YELKEN
Anesteziyoloji ve Reanimasyon A. D.

Üye Prof. Dr. Alper YOSUNKAYA
Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon A. D.

Üye Doç. Dr. Serdar EKEMEN
Anesteziyoloji ve Reanimasyon A. D.

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun …./…./…..
Tarih ve …. . ……. . . /…. ……. . Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Alpaslan BİRDANE
Rektör Yardımcısı
Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, iyi bir anestezi hekimi olarak yetişmemiz için destek veren sayın hocalarım Prof. Dr. Yılmaz ŞENTÜRK'e, Prof.Dr. Sacit GÜLEÇ'e, Prof. Dr. Ayten BİLİR'e, Doç. Dr. Serdar EKEMEN'e, Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇETİNKAYA'ya, Yrd. Doç. Dr. Sema ŞANAL BAŞ'a, Yrd. Doç. Dr. Yeliz KILIÇ'a ve emekli olan Prof. Dr. Cemil SABUNCU'ya ve Prof. Dr. Belkıs TANRIVERDİ'ye teşekkür ederim. Son olarak bu çalışmanın yapılmasında bana güvenen, desteklerini esirgemeyen ve sonuna kadar yanımda olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Birgül YELKEN'e teşekkürlerimi borç bilirim.

ÖZET

Çobaner, N. Sıçanlarda LPS ile oluşturulmuş sepsis modelinde astaksantinin karaciğer dokusunda antienflamatuar etkilerinin araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2017. Çalışmamızda astaksantinin (AST) sepsiste antienflamatuar etkinliğinin araştırılmasını ve antienflamatuar etkinliği kanıtlanmış olan deksametazon (DEKS) ile karşılaştırılmasını amaçladık. Çalışmamız, etik kurul onayı sonrasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi TICAM laboratuarında toplam 40 sıçan 5 gruba ayrılarak yapılmıştır. Birinci gruba sadece dimetilsülfoksit (DMSO), ikinci gruba lipopolisakkarit (LPS), üçüncü gruba AST, dördüncü gruba eş zamanlı olarak LPS ve AST, beşinci gruba eş zamanlı olarak LPS ve DEKS verilmiştir. Yirmi dördüncü saatte anestezi altında laparotomi sonrası karaciğer dokusu ve kan örnekleri alınmıştır. İstatistiksel değerlendirme için GrapPad Prism6 programı kullanıldı. DMSO grubuna göre AST ve DEKS+LPS gruplarında plazma TNF-alfa düzeyleri anlamlı düşük bulunmuştur. DEKS+LPS grubundaki TNF-alfa düzeyleri AST+LPS grubundaki değerlere göre anlamlı olarak daha fazla düşmüştür. Dokudaki TNF-alfa düzeylerinde LPS grubunda DMSO grubuna göre anlamlı yükseklik bulunmuştur, AST+LPS ve DEKS+LPS gruplarında ise LPS grubuna göre anlamlı olarak düşüklük bulunmuştur; ancak DEKS+LPS grubu ve AST+LPS grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Doku Nükleer Faktör-kappa B düzeyleri AST+LPS ve DEX+LPS gruplarında anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ancak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Karaciğer dokusundaki apoptotik hücre yüzdesi AST+LPS ve DEKS+LPS gruplarında LPS grubuna göre belirgin düşük bulunmuştur. Plazmada ve karaciğer dokusunda bakılan sitokin düzeylerinde AST grubunda olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Aynı zamanda deksametazon uygulaması ile karşılaştırıldığında farklılıklar olmakla birlikte benzer ölçüm değerleri de elde ettik. Apopitoz görülen hücre oranları değerlendirildiğinde anlamlı olarak AST'in etkin olduğu sonucuna ulaştık. Sepsis patogenezinin kompleks bir süreç olması nedeniyle iyi tasarlanmış daha fazla sayıda çalışma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: astaksantin, sepsis, deksametazon, antienflamatuar, karaciğer

ABSTRACT

Çobaner, N. Investigation of anti-inflammatory effects of astaxanthin in rat liver tissue in LPS induced sepsis. Eskişehir Osmangazi University Medical School, Department of Anesthesiology, Medical specialization thesis, Eskişehir, 2017. We aimed to investigate antiinflamatory effect of astaxanthin (AST) in sepsis and compare with dexamethasone (DEX) which antiinflamatory efficiency was proved. After local ethics commitee permitted the study was carried out at TICAM labarotory dividing 40 rats in five groups. In first group only dimetil sulphoksit (DMSO) was injected, in second group lipopolysakkarid (LPS) was injected, in third group AST was injected, in fourth group LPS and AST were injected, in fifth group LPS and DEKS were injected simultaneous to rats. At twenty forth hour, liver tissue samples were taken under anesthesia by laparotomy and blood samples were taken. GrapPad Prism6 programme was used for statistical analysis. In AST and DEKS+LPS groups plasma TNF-alfa levels were found significantly low comparing with DMSO group. TNF-alfa levels of DEKS+LPS group decreased more comparing with the AST+LPS group. Tissue TNF-alfa levels were found significantly high in LPS group comparing with the DMSO group, in AST+LPS and DEKS+LPS groups tissue TNF-alfa levels were found significanty low comparing with the LPS group but no significant difference was found between DEKS+LPS and AST+LPS groups. Tissue nuclear factor-kappa B levels were found significantly low in AST+LPS and DEX+LPS groups. But no significant difference found between two groups. Apoptotic cell percent of liver tissue was found significantly low in AST+LPS and DEKS+LPS groups comparing with the LPS group. Positive results of plasma and liver tissue cytocin levels were obtained in AST group. By the way, comparing with the DEX group there were some differences but we found similar resultsWhen the percent of cells which apopitosis seen was assesed; we found out that AST was significantly effective. Because of the complicated sepsis pathogenesis process, well designed more studies have to be done.

Key Words: astaxanthin, sepsis, dexomethasone, antienflamatory, liver

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sepsis	2
2.1.1. Tanım	2
2.1.2. Epidemiyoloji	2
2.1.3. Patofizyoloji	3
2.1.4. Organ tutulumu	5
2.1.5. Tedavi	7
2.2.Astaksantin	11
2.3. Deksametazon	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Deneklerin Hazırlanması Ve Operasyon Tekniği	13
3.2. Biyokimyasal Analizler	14
3.3. PCR Analizleri	14
3.4. Western Blot Analizleri	14
3.5. Karaciğer Dokularının İmmünohistokimyasal İncelenmesi	15
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	15
4. BULGULAR	17
4.1. ELISA Bulguları	17
4.2. PCR Bulguları	18
4.3. Western Blot Bulguları	21
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	22

Sayfa

5.TARTIŞMA 24

6.SONUÇ VE ÖNERİLER 28

KAYNAKLAR 29

SİMGELER VE KISALTMALAR

AST	Astaksantin
cmH_2O	Santimetre
CO_2	Karbondioksit
ÇODS	Çoklu organ disfonksiyon sendromu
DEKS	Deksametazon
dl	Desilitre
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECCO2R	Ekstrakorporeal karbondioksit uzaklaştırma
ECMO	Ekstrakorporeal membran oksijenasyonu
ELISA	Enzyme-linked İmmunoSorbent Assay
g	Gram
IL	İnterlökin
kg	Kilogram
LPS	Lipopolisakkarit
m^2	Metre kare
mg	Miligram
ml	Mililitre
mmHg	Milimetre civa
mmol	Milimol
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NaCl	Sodyum klorür
NF-kB	Nükleer faktör-kappa B
O_2	Oksijen
Ort	Ortalama
PCR	Polymerize chain reaction (polimerize zincir reaksiyonu)
SE	Standart error (standart hata)
SEM	Standart error mean (standart hata ortalaması)
ss	Standart sapma
TICAM	Tıbbi ve cerrahi deneysel araştırma merkezi
TLRs	Toll like receptors (örnek tanıma reseptörleri)
TNF	Tümör nekroz faktör

TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labelling
µg	Mikrogram
ẋ	Ortalama
α	Alfa
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Sayfa

2.1. Astaksantinin kimyasal yapısı 11

4.1. Western Blot bulguları 21

4.2. IL-1 alfa antikoru Western Blot ekspresyon grafiği 22

4.3. TUNEL reaksiyonu ile belirlenmiş apoptotik hücreler 23

TABLOLAR

Sayfa

4.1.Tüm gruplarda TNF-alfa ölçümlerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri. 17
4.2. Grupların kendi aralarında TNF-alfa üzerinden karşılaştırılması (p değeri) 18
4.3. Tüm gruplarda TNF-alfa ölçümlerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri 18
4.4. Grupların kendi aralarında TNF-alfa üzerinden karşılaştırılması (p değeri) 19
4.5. Tüm gruplarda IL-6 ölçümlerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri 19
4.6. Grupların kendi aralarında IL-6 üzerinden karşılaştırılması (p değeri) 20
4.7. Tüm gruplarda NF-kB ölçümlerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri 20
4.8. Grupların kendi aralarında NF-kB üzerinden karşılaştırılması (p değeri) 21
4.9. Gruplardaki apoptotik reaksiyonların yüzde olarak karşılaştırılması 22

1. GİRİŞ

Sepsis dünyada yoğun bakım ünitelerine en sık kabul edilme nedenleri arasındadır. Son 20 yılda ABD'de sepsis insidansı 3 kat artmıştır ve ölüm nedenleri arasında 10. sıradadır (1,2). Tıbbi teknoloji alanındaki ilerlemeler, immünsüpressif ilaçların artan kullanımı ve populasyon yaşının ilerlemesi, sepsis insidansındaki bu hızlı artışa katkıda bulunmaktadır (1,2). Septik hastaların hastanede kalış süreleri genellikle uzamıştır, yoğun bakım ünitelerinden nadiren 2-3 haftadan önce ayrılırlar. Bu nedenle sepsis, tüm dünyada sağlık sistemi için önemli bir yük olmaktadır (2).

Hücre duvarı bileşenleri ve salgılanan proteinler doğmalık immün sistemi aktive eden en önemli mikroorganizma kaynaklı ürünlerdir. Gram-negatif hücre duvarının büyük çoğunluğunu oluşturan ve sepsiste ortaya çıkan en önemli bakteri ürünleri lipopolisakkarit (LPS) veya bakteri endotoksinidir (3). Hücre duvarı yapısında bulunan lipid bileşenlerinden Lipid A doğmalık immün sistemin çeşitli yolaklarını aktive eder (4). Bu yüzden LPS, sepsis modelli hayvan çalışmalarında sık kullanılan bir ajandır.

Septik hastalarda, tümör nekrotizan faktör (TNF-alfa) ilk salınan proinflamatuar sitokindir ve bunu interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) salınımı izler. TNF-alfa ve IL-1 en önemli proinflamatuar sitokinlerdir, biyolojik olarak yakın ilişkilidirler, sinerjik hareket ederler ve sepsisin klinik bulgularından büyük oranda sorumludurlar (3). Bu nedenle sepsis çalışmalarında parametre olarak sıkça tercih edilirler.

Astaksantin (AST) ve deksametazon (DEKS) antienflamatuar etkinlikleri nedeniyle bu çalışmada yer almış maddelerdir. DEKS'un antienflamatuar özelliği önceki çalışmalarla ispatlanmıştır ve AST'nin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

Literatür incelendiğinde AST'nin antienflamatuar etkinliğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur fakat sepsis modelinde karaciğer dokusunda antienflamatuar etkinlikle ilgili çalışmalar sınırlıdır.

Bu çalışmanın amacı sepsiste astaksantinin antienflamatuar etkinliğinin araştırılması ve antienflamatuar etkinliği kanıtlanmış olan deksametazon ile etkinliklerinin karşılaştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

2.1.1. Tanım

Sepsis, Yunanca'da "çürüme, kokuşma" anlamına gelen "sepsin" kökünden gelir (5) ve son güncellemelerden sonra enfeksiyona karşı bozulmuş konak yanıtının neden olduğu hayatı tehdit eden organ disfonksiyonu olarak tanımlanmıştır (6).

Sepsis patojen ve konak faktörleri ile şekillenen (cinsiyet, yaş, komorbidite, genetik, çevre vb) bir sendromdur; bozulmuş konak cevabı ve organ disfonksiyonu varlığıyla enfeksiyondan ayrılır (6).

Altta yatan dolaşımsal ve hücresel/metabolik anormalliklerin mortaliteyi önemli ölçüde arttıracak kadar ciddi olduğu septik şok sepsisin bir alt kümesidir. Yeni tanımlamaya göre septik şoklu hastalar ortalama arter basıncını 65 mmHg basıncın üzerinde tutabilmek için vazopressör gereksinimi olan inatçı hipotansiyon ve yeterli volüm resüsitasyonuna rağmen serum laktat düzeyinin >2 mmol/L (18 mg/dl) olması ile belirlenmektedir. Bu kriterler varlığında hastane mortalitesinin %40'ın üzerinde olduğu bildirilmektedir (6).

2.1.2. Epidemiyoloji

Sepsis insidansı her yıl %1,5 oranında artış göstermektedir (2). İnsidanstaki bu artış populasyonun yaşlanmasına bağlanmaktadır. Çünkü populasyonun yaşlanması; zayıflayan immün sisteme sahip, dirençli patojenlerle maruz kalan, cerrahi girişimleri uzun süren ve yüksek riskli olan hasta sayısının artması anlamına gelmektedir (1). Organ yetmezliğiyle seyreden sepsis ileri yaşta, erkek cinsiyette ve siyah ırkta daha sık görülmektedir (1,2). Vücutta enfeksiyonun en yaygın olduğu yerler solunum sistemi, dolaşım sistemi ve genitoüriner sistemdir (5). 1980'li yıllardan önce gram-negatif bakteri en sık etken olmasına rağmen yıllar geçtikçe gram-pozitif bakteriler lehine bir artış bildirilmektedir ve bugün gram-pozitif

bakteriler baskın olan patojenlerdir. Fungal patojenlerin sebep olduğu olduğu sepsis insidansı 1990'lı yıllardan itibaren artış göstermektedir (1).

Mortalite yaşla ve sorunlu organ sayısıyla orantılı şekilde bir artış göstermektedir. Zamanla, sepsisli hastalarda hastanede kalış süresi azalmış ve taburcu etme sayısı artmıştır. Yüksek mortalite ve morbiditeye sebep olmasına ek olarak, sepsisin kayda değer bir ekonomik kayıba da neden olduğu görülmektedir (1).

2.1.3. Patofizyoloji

Çok sayıda mikrobiyal ve konakçı faktörü arasında etkileşim içeren sepsis, patogenezi çok karmaşık bir olaydır (3). Sepsisin erken fazındaki konak yanıtının önemli komponentleri immün sistem, enflamatuar kaskat aktivasyonu ve hemostazdaki değişikliklerdir. Sepsisin daha geç fazında ise organ yetmezliği, immünsüpresyon ve apoptozis önemli patofizyolojik rollere sahiptir. Konağa ait şiddetli sepsis riskindeki artış virülan faktörler, yüksek enfektif yük ve antibiyotiklere dirençle ilişkilidir. Literatürde konak yanıtının genetik polimorfizmden etkilenebildiği öne sürülmektedir. Böylece niçin bazı hastaların belirli bir patojenle sepsise yakalandığı ve diğerlerinin yakalanmadığı açıklanabilmektedir (5).

Sepsisin Erken Fazında İmmün Sistemin Rolü

Enfeksiyona immün yanıt iki yolun aktivasyonuyla gerçekleşmektedir: doğmalık immün sistem ve kazanılmış immün sistem. Doğmalık immün sistemin amacı enfeksiyöz bir karşılaşma sonrasında ilk dakikalardan saatlere kadar korunma sağlamaktır. Başlangıçta spesifik olmayan bir yanıt olduğu düşünülmesine rağmen, araştırmalar doğuştan immün sistemin örnek tanıma reseptörleriyle (Toll-like receptors, TLRs) patojenleri ayırt ettiğini ispatlamıştır. TLRs'in mikroorganizmalarda bağlandığı korunumlu yapılar organizmaların genel gruplarını gösterir ve saptanmaktan kaçmak için mikroorganizmalarca kolaylıkla değiştirelememektedir (7). TLRs'in mikroorganizmalar tarafından aktivasyonu; hem TNF-alfa, IL-1beta ve nükleer faktör kB (NF-kB) gibi proenflamatuar sitokinlerin

hem de IL-10 gibi antienflamatuar sitokinlerin üretimini arttıran sinyal yolaklarını uyarmaktadır (7,8). TLR aktivasyonu reaktif nitrojen üretimi gibi mikrobiyal öldürücü mekanizmaların artışıyla da sonuçlanmaktadır (9). TLRs doğmalık immün cevabın başlamasında merkezi bir rol oynamakta ve kazanılmış immün cevabın da önemli bir düzenleyicisi olmaktadır. Bu proteinlerin ve fonksiyonlarının tanınması sepsis patofizyolojisiyle ilgili bilgilerimizi genişletmiş ve terapötik müdahalelerde yeni bir hedef sağlamıştır (10).

Kazanılmış immün sistem, doğmalık immün sistem tarafından başlatılan cevabı daha spesifik olacak şekilde arttırmaktadır. İki tip lenfosit, B hücre ve T hücre, kazanılmış immün cevapta önemli bir rol oynamaktadır. Kazanılmış immün sistem cevapları T ve B hafıza lenfositleri aracılığıyla kaydedilir ve aynı patojene tekrar maruz kalma durumunda cevabın daha hızlı olmasını sağlamaktadır. Yardımcı T hücreleri ise 2 tiptir: tip 1 yardımcı T hücreleri ve tip 2 yardımcı T hücreleri. Genel olarak, tip 1 yardımcı T hücreleri proenflamatuar sitokinleri (TNF-alfa ve IL-1beta), tip 2 yardımcı T hücreleri antienflamatuar sitokinleri (IL-4 ve IL-10) salgılamaktadır (11). B lenfositler immünglobulinlerin salınmasından sorumlu olmaktadır. Bu immünglobulinler spesifik antijenlere bağlanarak onları tanır ve diğer immün hücrelerce (doğal öldürücü hücreler ve nötrofiller) imhayı edilmesini kolaylaştırır. Diğer birçok hücre tipi de kazanılmış immün cevapta görev almaktadır (5).

Enflamasyonun Rolü

Sepsis yıllarca kontrol edilemeyen enflamatuar cevabın bir sonucu olarak kabul görmüştür. Bu yaklaşım insandaki hastalığı tam olarak yansıtmayan enflamasyon modelli geniş çaplı hayvan deneylerine dayandırılmıştır (5). Bununla birlikte, insanda sepsis gözlemlerinde çoğu hasta proenflamatuar ve antienflamatuar kaskatların her ikisinin de aktivasyonunu içeren kompleks bir konakçı cevabına sahiptir. Şiddetli enflamasyondan erken ölüm bir kural değildir ve ölen çoğu hastada hastalık sürecinde immünsüpresyon, apopitoz, çoklu organ yetmezliğine bağlı komplikasyonlar gelişmektedir. Proenflamatuar sitokinler, antienflamatuar sitokinler ve sitokin inhibitörleri arasındaki etkileşim; konağın sepsise cevabını etkileyen dinamik bir süreçtir. TNF-alfa ve IL-1beta gibi proenflamatuar sitokinler sepsisin

erken döneminde artar ve enflamatuar kaskatta sinerjistik etkilere sahiptir (12). Proenflamatuar sitokinler monosit, makrofaj ve nötrofilleri aktive eder; nötrofil marjinasyonunu stimüle etmekte ve glukoneogenezisi arttırmaktadır. Ayrıca ateş, hipotansiyon, azalmış intravasküler volümle seyreden kapiller kaçak ve miyokardiyal depresyon gibi klinik anormalliklerin gelişiminde önemli bir role sahiptir (5). Antienflamatuar sitokinlerin sepsisteki rolü henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Güncel bilgiler antienflamatuar fenotipte bir değişikliğin ve temel immün hücrelerin apopitozun sepsis nedenli çoklu organ yetmezliği ve ölüme neden olabileceğini ileri sürmektedir (13,14).

Enflamasyon konağın sepsise cevabında önemli bir rol oynamaktadır. Spesifik proenflamatuar sitokinleri engelleyen temel terapötik stratejilerin bu yanıtı düzenlemede yetersiz olduğu ortadadır. Proenflamatuar ve antienflamatuar cevaplar arasındaki karmaşık ilişkiyle ilgili bilgiler arttıkça, hastaların sonuçlarının değerlendirilmesi ve düzenlenmesi konusunda daha başarılı olunabilecektir (5).

Sepsis ve Apopitoz

Sepsis patogenezinde hücre ölümlerinde apopitozun önemli bir rol oynadığını gösteren bulgular giderek artmaktadır (15). Deneysel sepsis modellerinde, LPS ve TNF-alfa gibi pek çok proenflamatuar mediatörün endotel ve diğer çeşitli hücre tiplerinde apopitoza neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çoklu organ yetmezliği nedeniyle kaybedilen hastalarda, lenfositler ve intestinal epitel hücrelerinde de yaygın apopitoz olduğu bildirilmiştir (16,17).

Bağışıklık sistemi hücrelerinin kaybı ile beraber apopitozun artışı, sepsis sırasındaki immünsüpreyonun apopitoz sebepli olabileceğini düşündürmüştür (18).

2.1.4. Organ Tutulumu

Sepsisin yaygın bir komplikasyonu olan çoklu organ disfonksiyonu sendromu (ÇODS); sepsisteki bir hastada sırayla ya da aynı anda iki ya da daha fazla organ sisteminin yetmezliğe girmesiyle meydana gelmektedir. Sepsisli hastalarda beyin,

kalp, akciğer, böbrek ve karaciğer gibi birçok organ etkilenebilmektedir. Bu organlar sıklıkla primer hasar yerinden uzaktadır ve organ yetmezliğinin gelişimi komplike etkileşimlere ve patofizyolojik olaylara cevap olarak meydana gelmektedir. ÇODS önemli ölçüde mortalite artışına katkıda bulunmaktadır. Çalışmalar sepsisli hastalardaki mortalite artışıyla organ yetmezliğinin şiddet ve sayısının paralel olduğunu göstermektedir (5).

Erken dönemdeki organ disfonksiyonunun teşhisi son derece önemlidir. Çünkü erken müdahale sonuçları etkileyebilir. ÇODS için tedavinin köşe taşları altta yatan nedene yönelik uygun tedaviye ve organa spesifik erken dönem destek tedavisine dayanmaktadır. Enfeksiyon kontrolüne yönelik tedavilerin erken uygulanması, hemodinamik destek ve konak cevabının düzenlenmesi organ disfonksiyonunun gelişiminde kilit noktalardır (19).

Karaciğer Disfonksiyonu

Karaciğer portal dolaşım için hem mekanik hem de immünolojik bir filtredir ve major bir sitokin kaynağı olarak da kabul edilebilmektedir. Aminotransferaz ve bilirubin seviyelerindeki bir artışa sıkça rastlanmakta fakat hepatik yetmezlik nadir görülmektedir. Son zamanlarda, subklinik karaciğer hasarı tehlikeli hastalıklar içinde tanımlanmıştır (20).

Karaciğer sinüzoidlerindeki mikrosirkulatuar değişiklikler, nötrofil sekestrasyonu, platelet aktivasyon ve adezyonu bilinen hepatik disfonksiyon parametrelerinin başlıca tetikleyicileri olduğu ileri sürülmüştür. Kolestazis, steatozis, hepatosellüler hasar, bozulmuş hücresel yenilenme ve bozulmuş hepatik mitokondriyal solunum klinik septik hepatik disfonksiyona dahil edilen faktörlerdir (20).

2.1.5. Tedavi

Sepsisli hastaların tedavisi için mevcut olan strateji enfeksiyon kaynağını tedavi etmeye veya ortadan kaldırmaya, antimikrobiyal ilaçların zamanında ve uygun kullanımına, hemodinamik optimizasyona ve diğer organ destekleyici fizyolojik önlemlere dayanmaktadır. Spesifik proenflamatuar medyatörlere karşı geliştirilen yeni ilaçlarla proinflamatuar yanıtın baskılanmasına yönelik girişimler başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Ancak aktive protein C ve glukokortikoidler (ılımlı dozda) gibi immünmodülatörlerin şiddetli sepsisteki hastaların sonuçlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (3).

Sepsisli hastalarda erken tanı ve tedavi ardışık organ yetersizliğini azaltmakta ve sağ kalımı arttırmaktadır (3,19). Güncel klavuzlar sepsisteki hastaya yaklaşımda zamanlamanın önemini vurgular nitelikte önerilerde bulunmuştur (21,22).

Başvuruyu takip eden ilk 3 saatte yapılması gerekenler şunlardır (21,22):

- Serum laktat ölçümleri
- Antibiyotik uygulanması öncesi kan kültürlerinin alınması
- Geniş spektrumlu antibiyotik başlanması
- Hipotansiyon ya da laktat yüksekliği (≥4mmol/L) varlığında 30 ml/kg kristalloid başlamak

Başvuruyu takip eden ilk 6 saatte yapılması gerekenler şunlardır (21,22):

- Sıvı tedavisinine cevap vermeyen hipotansiyon varlığında 65 mmHg ve üzerinde bir ortalama arteriyel basınç sağlamak için vazopressör başlamak
- Sıvı tedavisine dirençli hipotansiyonda veya laktat yüksekliğinde (≥4 mmol/L) hacim durumunu ve doku perfüzyonunu yeniden değerlendirmek (fizik muayene, santral venöz basınç ölçümü, yatak başı kardiyak ultrason, pasif bacak kaldırmaya cevap)
- Yükseliş varsa tekrarlayan laktat ölçümleri

Enfeksiyon Kaynağının Saptanması ve Ortadan Kaldırılması

Mümkün olan en kısa sürede enfeksiyon kaynağının saptanması ve ortadan kaldırılması sepsisin önemli ama bir o kadar da zorlayıcı özelliklerindendir. Hastaların büyük çoğunluğu enfeksiyon kaynağı olarak genellikle pulmoner, genitoüriner, intraabdominal veya intravenöz bir katatere sahiptir. Hastaların % 75'inden etyolojik bir ajanın izole edilebildiği son çalışmalarla gösterilmiştir ve dağılım Gram-pozitif ve Gram-negatif organizmalar arasında eşittir (3).

Kaynağın ortadan kaldırılması enfekte kataterlerin çekilmesi, intraabdominal enfeksiyonlarda gerekirse cerrahi kontrol veya perkütan direnajla mümkündür (3).

Antimikrobiyal Tedavi

Sepsiste enfeksiyon yeri ve etken organizmanın belirlenemediği zamanlar sıktır. Böyle durumlarda antimikrobiyal tedavi enfeksiyonun en yoğun olduğu bölge ve en sık olası etken dikkate alınarak ampirik olarak başlanmalıdır. Ampirik antimikrobiyal tedaviye başlamadan önce kültür örnekleri alınmış ve duyarlılık testleri yapılmış olmalıdır. Gözlemsel çalışmalarda hastaneye başvurudan sonraki ilk 4-8 saat içinde antimikrobiyal tedaviye başlamanın mortaliteyi azalltığı gösterilmiştir (23).

Hemodinamik Destek

Hemodinamik destek genel olarak iki şekilde sağlanır: sıvı tedavisi (intravasküler hacmin arttırılması) ve vazopressör tedavi (3, 23).

Sepsiste sıvı tedavisinin ilk amacı intravasküler sıvı açığının kapatılmasıdır (23). Bu açığın kapatılması kardiyak fonksiyonlarda ve sistemik oksijen sunumunda belirgin düzelme sağlayarak doku perfüzyonunu arttırır (3).

Verilen sıvı miktarının ortalama arteryel kan basıncı, kalp hızı ve idrar debisi gibi klinik gözlemler dikkate alınarak titre edilmesi önerilir (24), fakat verilmesi

gereken sıvı, kristalloid veya kolloid seçimi halen tartışmalı bir konudur (23). İlk tercih kristalloidlerdir, en sık kullanılan da normal salindir. Ancak aşırı yüklenmelerde salin infüzyonunun hiperkloremik metabolik asidoza neden oluğu görülmüştür. Kolloid sıvılar diğer bir seçenektir. Bu solüsyonlar büyük oranda intravasküler alanda kalırlar ve transfüzyondan sonra uzun bir süre ozmotik gradienti korurlar (3). Yüksek miktarda kristalloid ihtiyacı olan hastalarda albümin de önerilmektedir (22).

Sıvı tedavisi devam ederken normal hemodinaminin ve perfüzyonun sağlanamadığı durumlarda vazopressör tedavi ihtiyacı doğabilir. Günümüzde ilk tercih edilen ajan norepinefrindir (22). Dopaminin pozitif inotrop ve kronotrop etkileri nedeniyle miyokard oksijen ihtiyacını arttırması, onu daha az tercih edilen bir ajan kılmıştır. Göz önünde bulundurulması gereken diğer ajanlar ise dobutamin (kötü sol ventrikül kontraktilitesi ve düşük kalp debisi) ve vazopressindir (dirençli hipotansiyon) (3,22).

Destekleyici Tedaviler

Sepsis tedavisinde sonuçları iyileştirmek için çeşitli ilave tedaviler önerilmiştir fakat bu konuda bir fikir birliği bulunmamaktadır (23).

Steroidler: Kortikosteroid tedavisi mortalite konusundaki şüpheli yararları olmakla birlikte 50 yılı aşkın süredir çeşitli dozlarda kullanılmaktadır (25). Bu sebeple sepsiste steroid başlanması hep tartışmalı bir konu olmuştur. Güncel klavuzlar yeterli sıvı tedavisine rağmen vazopressör tedavi ihtiyacı olan sepsisli hastalarda intravenöz kortikosteroid kullanımını önermektedir (22).

Kan glukozu kontrolü: Sepsisli hastalarda hiperglisemi sıklığının %40'ın üstünde olduğu tahmin edilmektedir. Bu durumun zayıf immün cevap, artmış kardiyovasküler olaylar, trombozis, geç kalınmış tedavi gibi olumsuz durumların artışıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Yoğun insülin tedavisi olarak tanımlanan kan glukoz düzeyinin 80-110 mg/dL arasında olmasının mortaliteyi, enfeksiyon hızını, hastanede kalış süresini ya da renal replasman ihtiyacını azalttığına dair kanıt

bulunmamaktadır. Üstelik hipoglisemi riskinde artış söz konusu olmaktadır. Kritik hastalarda son günlerde önerilen kan glukoz düzeyi 140-200 mg/dL arasıdır (26).

Kan ürünleri desteği: Doku hipoperfüzyonu düzeltilmişse ve miyokardial iskemi, şiddetli hipoksemi, akut kanama ya da iskemik koroner arter hastalığı gibi problemler yoksa kan transfüzyonu için hemoglobin konsantrasyonu 7 g/dL'nin altına düşünceye kadar beklenmelidir (hedef hemoglobin değeri: 7-9 g/dL). Platelet desteği belirgin kanama yoksa < 10 000/mm^3, ciddi kanama riski söz konusu ise < 20 000/mm^3 olduğu durumunda uygulanmalıdır. Aktif kanama, cerrahi veya invaziv girişimlerde >50 000/mm^3 platelet sayısı gerekmektedir (22).

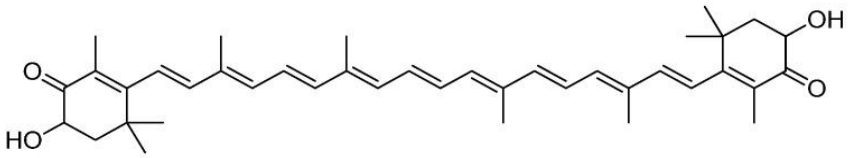
Derin ven trombozu için profilaksi: Şiddetli sepsisteki hastalarda günde iki kez düşük molekül ağırlıklı heparin kullanılarak derin ven trombozu profilaksisi önerilmektedir (22).

Ekstrakorporeal kan temizleme teknikleri: Kan temizleme tekniklerinin kritik hastalardaki çoklu kullanımları "çoklu organ desteği tedavisi" olarak adlandırılan yeni tedavi stratejilerinin gelişimini mümkün kılmıştır. Henüz yüksek volüm hemofiltrasyonun yararlı etkilerini gösteren geniş, çok merkezli, randomize, kontrollü çalışmalar olmasa bile insanlardaki ön çalışmalar ve preklinik hayvan çalışmaları verileri bu girişimi desteklemektedir. Birleşik plazma filtrasyon adsorbsiyonu, polimiksin-B hemoperfüzyonu ve yüksek geçirgenli membranlar sepsiste kullanılan diğer destekleyici tedavi yöntemlerindendir. (27)

Koruyucu akciğer stratejileri, $ECCO_2R$ ve ECMO: Düşük tidal hacimli ventilasyon (plato basıncı < 30 cmH_2O, 6 mL/kg) genel olarak iyi tolere edilir ve ventilatör ilişkili akciğer hasarına karşı koruma sağlayabilmektedir. Koruyucu akciğer stratejileri başarısız olduğu zaman ekstrakorporeal CO_2 uzaklaştırma ($ECCO_2R$) ve venö-venöz ekstrakorporeal membran oksijenasyonu (ECMO) gibi çeşitli teknolojiler kaydadeğer geçici gelişmeler göstermektedir. (28)

2.2. Astaksantin

Karotenoidler 700'den fazla yağda çözünen pigment çeşidinin oluşturduğu bir ailedir ve sadece fitoplankton, alg, bitkiler ve sınırlı sayıda mantar ve bakteri tarafından üretilir. Astaksantin en yaygın karotenoidlerden biridir ve kabuklu deniz canlılarının, somon balığının kırmızı pigmentinde bulunur (29). Antioksidan, antitümör, antienflamatuar, antidiyabetik, hepatoprotektif ve immünmodülatör etkileri içeren çeşitli farmakolojik özellikler sergilemektedir (29,30,31). Üstelik karakteristik özelliklerinden birisi yüksek derecede güvenli olmasıdır (30). AST'in kimyasal yapısı şekil 2.1'de görülmektedir.



Şekil 2.1. Astaksantinin kimyasal yapısı (32).

Yapılan çalışmalar astaksantinin reaktif oksijen radikallerinin uyardığı NF-kB aktivasyonunun inhibisyonuyla enflamasyonu azalttığını göstermiştir (33). AST ayrıca özel kültürlerde üretilen mononükleer hücreleri LPS'nin uyardığı enflamasyondan ve oksidatif stresten koruyan terapötik özelliklere de sahiptir (34).

2.3. Deksametazon

Glukokortikoidler septik şok da dahil bir çok enflamatuar hastalığın tedavisinde antienflamatuar bir ilaç olarak kullanılmıştır. Sitokin, kemokin ve adezyon molekülleri gibi bir çok proenflamatuar medyatör ekspresyonunu baskılamak için spesifik glukokortikoid reseptörleriyle etkileşime girmektedir (35,36,37). Bu etkiler özellikle proenflamatuar moleküllerin transkripsiyonunun durdurulması (NF-kB üzerinden transdüksiyon inhibisyonuna bağlı) ve anneksin-1,

IL-10 ve NF-kB inhibitörü gibi antienflamatuar medyatörlerin gen ekspresyonlarının uyarılması gibi çeşitli mekanizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir (35).

Deksametazon immünsüpresif ve antienflamatuar bir ajan olarak yaygın kullanılan sentetik bir glukokortikoiddir. Son zamanlarda, birçok araştırmacı deksametazonun NF-kB aktivasyonunu baskılayabildiğini kanıtlamıştır. Bununla birlikte, bu çalışmalar makrofaj ve lenfosit gibi enflamatuar hücrelerle sınırlı kalmaktadır (38).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 15.06.2016 tarih 409-2 kayıt numaralı onayı sonrasında başlandı. Çalışmamızda kullanılan deney hayvanları Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TİCAM) temin edildi. Ortalama ağırlıkları 260-320 gram olan 40 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan randomize olarak eşit sayıda (n = 8) 5 gruba ayrıldı. Sıçanlar deney süresince 12'şer saatlik aydınlık-karanlık ışıklandırması olan ısısı (20-22 ^{o}C) ve nemi (% 45-% 50) otomatik olarak ayarlanan odalarda yaşatıldı. Bu süreçte tüm sıçanlar şeffaf kafeslerde tutuldu, standart sıçan yemi (pellet yemi) ve çeşme suyu ile beslendi.

3.1. Deneklerin Hazırlanması ve Operasyon Tekniği

Denekler araştırma başlangıcına kadar; en az 3 gün süreyle, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda barındırılarak ortama adaptasyonları sağlandı, standart gıda ile beslendi ve su kısıtlaması uygulanmadı. Tüm denekler deneyden 12 saat önce aç bırakıldı ve sadece su içmelerine izin verildi.

Çalışmaya alınan denekler dimetil sülfoksit (DMSO) grubu (n = 8), LPS grubu (n = 8) , AST grubu (n = 8), AST+LPS grubu (n = 8) ve DEKS+LPS grubu (n = 8) olarak beş gruba ayrıldı. İlk gün DMSO grubuna intraperitoneal olarak 0,2 ml dimetil sülfoksit; LPS grubuna intradermal olarak 200 µg/0,2 ml dozunda Salmonella typhimurium lipopolisakkariti; ASTgrubuna intraperitoneal olarak 0,2 ml hacimde 100 mg/kg dozunda, dimetil sülfoksit içinde çözünmüş olarak astaksantin; AST+LPS grubuna diğer gruplarla aynı şekilde astaksantin ve lipopolisakkarit; DEKS+LPS grubuna intraperitoneal olarak 0,2 ml hacimde 1 mg/kg dozunda deksametazon verildi.

Yirmi dördüncü saatin sonunda intraperitoneal olarak 50 mg/kg tiyopental sodyum ile anestezi sağlandıktan sonra supin pozisyonda laparotomi yapıldı. Örnekleme için karaciğer sağ lob ve 2 mL intrakardiyak kan alındı. İşlem sonrasında dekapitasyon yoluyla ötenazi uygulandı.

Alınan doku örneklerinin bir kısmı immünohistokimyasal analizler için %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde saklandı, bir kısmı da polimerize zincir reaksiyonu (PCR) ve Western blot analizleri için önce sıvı azot içerisinde şok donduruldu, sonra - 80 derecede uzun dönem muhafaza edildi.

3.2. Biyokimyasal Analizler

Plazmada TNF-alfa ölçümü eBioscience marka Human TNF-alpha Platinum Elisa kiti ile yapıldı (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar pg/ml olarak verildi.

3.3. PCR Analizleri

Karaciğer dokusundan izole edilen total mRNA'lardan hedef mRNA'lar olan TNF-alfa, IL-6, NF-kB mRNA'larının relatif rakamsal değerlerini tespit etmek için gerçek zamanlı reverse-transkriptaz PCR tekniği kullanıldı.

Tripüre içinde saklanan dokulardan total RNA kloroform yöntemiyle izole edilmiştir. RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla izole edilen bu total RNA'dan 1,5 µl Nanodrop kullanılarak (Thermo Scientific, USA) 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

Çalışmanın sonuçları LightCycler® Nano Software'den alınan değerler relatif kuantifikasyon yöntemiyle değerlendirildi.

3.4. Western Blot Analizleri

Tüm gruplardan alınan karaciğer örnekleri, IL-1alfa ekspresyonuna Western blot yöntemi ile ölçüldü. Karaciğer örnekleri küçük parçalara ayrıldı ve 2,5 katı kadar lizis tamponu eklenip oda sıcaklığında 5 dakika beklendi. Daha sonra örnekler homojenizatöre kondu, 4^{o}C'de 14000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda sitozolik proteinlerin bulunduğu üstteki süpernatan alındı, daha sonra nandropta (Thermo) protein konsantrasyonu ölçüldü. 30 µg protein % 10'luk SDS jel içerisine elektroforez yöntemi ile ayrılması için kondu, ardından PVDF membrana

transfer edildi. Membranlar % 5'lik BSA (Bovine serum albümin) olan bloklama tamponu ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklandı. Daha sonra gece boyunca 4 °C'de uygun primer antikorlar ile inkübe edildi. Membranlar 10 dakika boyunca 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra uygun sekonder antikorlar ile inkübasyon yapıldı, immünreaktif bantlardaki proteinlerin ekspresyon seviyeleri görüntüleme sistemiyle gözlenir hale getirildi. Görüntü sonuçlarının analizleri Image J 1.49v ile yapıldı.

3.5. Karaciğer Dokularının İmmünohistokimyasal İncelenmesi

Sıçanlardan alınan karaciğer dokuları 48 saat süreyle %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletildi. Fiksasyon işleminden sonra uygun takip işlemleri yapılarak parafin bloklar hazırlandı. Her bir gruba ait parafin bloktan 4 µm kalınlığında 6'şar kesit alındı. Kesitlerdeki apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla "terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labelling" (TUNEL) yöntemi uygulandı. Kesitler, grupların dağılımı ile ilgili bilgisi olmayan tek bir histolog tarafından değerlendirildi. Her kesitten rastgele 10 farklı alan incelendi. İncelenen her alandaki apoptotik hücrelerin sayısı bilgisayar ile desteklenmiş Olympus BX51 mikroskobu ve BAB Bs200pro software ile değerlendirildi.

Karaciğerden alınan doku örneklerine DNA kırıklarının oluşmasıyla meydana gelen apoptotik hücreleri incelemek amacıyla TUNEL yöntemi uygulandı. Rastgele seçilip değerlendirilen alanlardaki apoptotik hücre sayısı ve reaksiyon şiddeti yüzde (%) olarak belirlendi.

3.6. İstatiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için GrapPad Prism6 programı kullanıldı. Gruplar önce Shapiro-Wilk Normality Test kullanılarak normal dağılım gösterip göstermediğine göre analiz edildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar Dunn testi ile değerlendirildi.

P değeri 0.05’den küçük olanlar anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama (ẋ), ±standart hata (±SE) olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

Sepsis modeli oluşturularak 24. saatin sonunda kan ve doku örnekleri alınan 40 sıçanın çalışma sonuçları aşağıdadır:

4.1. ELISA Bulguları

TNF-alfa Düzeyleri

TNF-alfa düzeyi açısından gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde; LPS grubu ile karşılaştırıldığında DEKS+LPS grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,05$); diğer tedavi grubu olan AST+LPS grubunda da bir düşüş sağlanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$). Tedavi grupları, AST+LPS ve DEKS+LPS grupları kendi arasında karşılaştırıldığında DEKS+LPS grubundaki düşüşte anlamlı bir fark bulunmuştur. ($p < 0,05$)

Tablo 4.1.Tüm gruplarda TNF-alfa ölçümlerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.

	ẋ (ort±ss)	**SEM**
DMSO	35,47±4,53	2,02
LPS	38,44±7,95	3,24
AST	24,42±1,72	0,77
AST+LPS	33,96±4,39	1,66
DEKS+LPS	25,05±4,24	1,60

Tablo 4.2. Grupların kendi aralarında TNF-alfa üzerinden karşılaştırılması (p değeri).

Gruplar	**p değeri**
DMSO vs LPS	0,8642
DMSO vs AST	0,0150
DMSO vs AST+LPS	0,9853
DMSO vs DEKS+LPS	0,0129
LPS vs AST	0,0009
LPS vs AST+LPS	0,5112
LPS vs DEKS+LPS	0,0006
AST vs AST+LPS	0,0259
AST vs DEKS+LPS	0,9995
AST+LPS vs DEKS+LPS	0,0219

4 .2. PCR Bulguları

TNF-alfa Düzeyleri

TNF-alfa düzeyi açısından gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde; LPS grubu ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarının her ikisinde de, AST+LPS ve DEKS+LPS, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p > 0,05$)

Tablo 4.3. Tüm gruplarda TNF-alfa ölçümlerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.

	ẋ (ort±ss)	**SEM**
DMSO	1,25±1,18	0,48
LPS	13,33±7,65	3,82
AST	0,94±0,54	0,22
AST+LPS	5,99±4,92	2,01
DEKS+LPS	2,64±1,89	0,66

Tablo 4.4. Grupların kendi aralarında TNF-alfa üzerinden karşılaştırılması (p değeri).

Gruplar	**p değeri**
DMSO vs LPS	0,0002
DMSO vs AST	0,9999
DMSO vs AST+LPS	0,1930
DMSO vs DEKS+LPS	0,9525
LPS vs AST	0,0002
LPS vs AST+LPS	0,0330
LPS vs DEKS+LPS	0,0006
AST vs AST+LPS	0,1473
AST vs DEKS+LPS	0,9058
AST+LPS vs DEKS+LPS	0,4511

İnterlökin-6 Düzeyleri

İnterlökin-6 düzeyi açısından gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. LPS grubu ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarının her ikisinde de, AST+LPS ve DEKS+LPS, bir düşüş görülmüş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi grupları kendi arasında karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p > 0,05$)

Tablo 4.5. Tüm gruplarda IL-6 ölçümlerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.

	ẋ (ort±ss)	**SEM**
DMSO	0,33±0,19	0,09
LPS	0,29±0,15	0,06
AST	0,22±0,19	0,06
AST+LPS	0,10±0,06	0,02
DEKS+LPS	0,017±0,21	0,08

Tablo 4.6. Grupların kendi aralarında IL-6 üzerinden karşılaştırılması (p değeri).

Gruplar	**p değeri**
DMSO vs LPS	0,9970
DMSO vs AST	0,8636
DMSO vs AST+LPS	0,2912
DMSO vs DEKS+LPS	0,5897
LPS vs AST	0,9650
LPS vs AST+LPS	0,4142
LPS vs DEKS+LPS	0,7582
AST vs AST+LPS	0,6970
AST vs DEX+LPS	0,9692
AST+LPS vs DEKS+LPS	0,9605

NF-kB Düzeyleri

NF-kB düzeyi açısından gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde; LPS grubu ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarının her ikisinde de, AST+LPS ve DEKS+LPS, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,05$). Tedavi grupları kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p > 0,05$)

Tablo 4.7. Tüm gruplarda NF-kB ölçümlerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.

	ẋ (ort±ss)	**SEM**
DMSO	1,03±0,27	0,09
LPS	1,03±0,27	0,11
AST	0,50±0,08	0,02
AST+LPS	0,02±0,01	0,005
DEKS+LPS	0,024±0,023	0,008

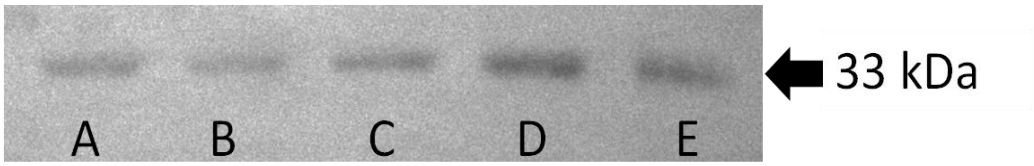
Tablo 4.8. Grupların kendi aralarında NF-kB üzerinden karşılaştırılması (p değeri).

Gruplar	**p değeri**
DMSO vs LPS	> 0,9999
DMSO vs AST	< 0,0001
DMSO vs AST+LPS	< 0,0001
DMSO vs DEKS+LPS	< 0,0001
LPS vs AST	< 0,0001
LPS vs AST+LPS	< 0,0001
LPS vs DEKS+LPS	< 0,0001
AST vs AST+LPS	< 0,0001
AST vs DEKS+LPS	< 0,0001
AST+LPS vs DEKS+LPS	> 0,9999

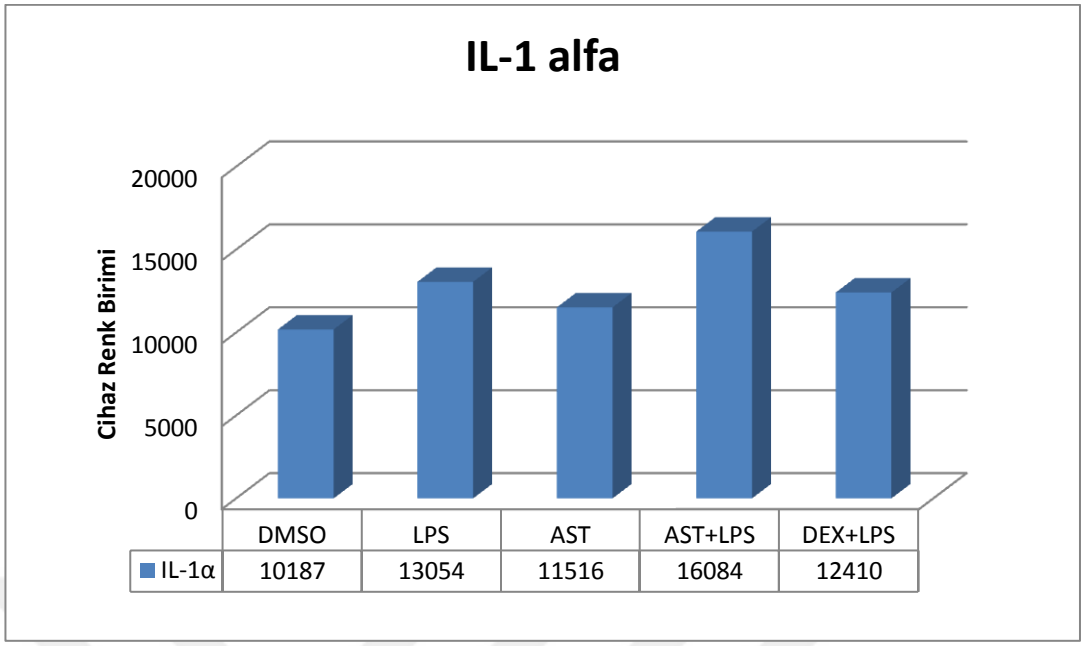
4.3. Western Blot Bulguları

IL-1 Alfa Düzeyleri

IL-1 alfa'nın Western blot sonuçlarına bakıldığında LPS grubunda DMSO grubuna göre IL-1 alfa ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. AST+LPS uygulanan grupta, DMSO grubuna göre IL-1 alfa seviyesinde herhangi bir düşüşe neden olmaması, AST'nin LPS'nin neden olduğu sepsiste etkin olamadığını göstermiştir. DEKS+LPS grubunda ise IL-1 alfa ekspresyonu düşmüştür.



Şekil 4.1. Western blot bulguları: A: DMSO grubu, B: LPS grubu, C: AST grubu, D: AST+LPS grubu, E: DEKS+LPS grubu



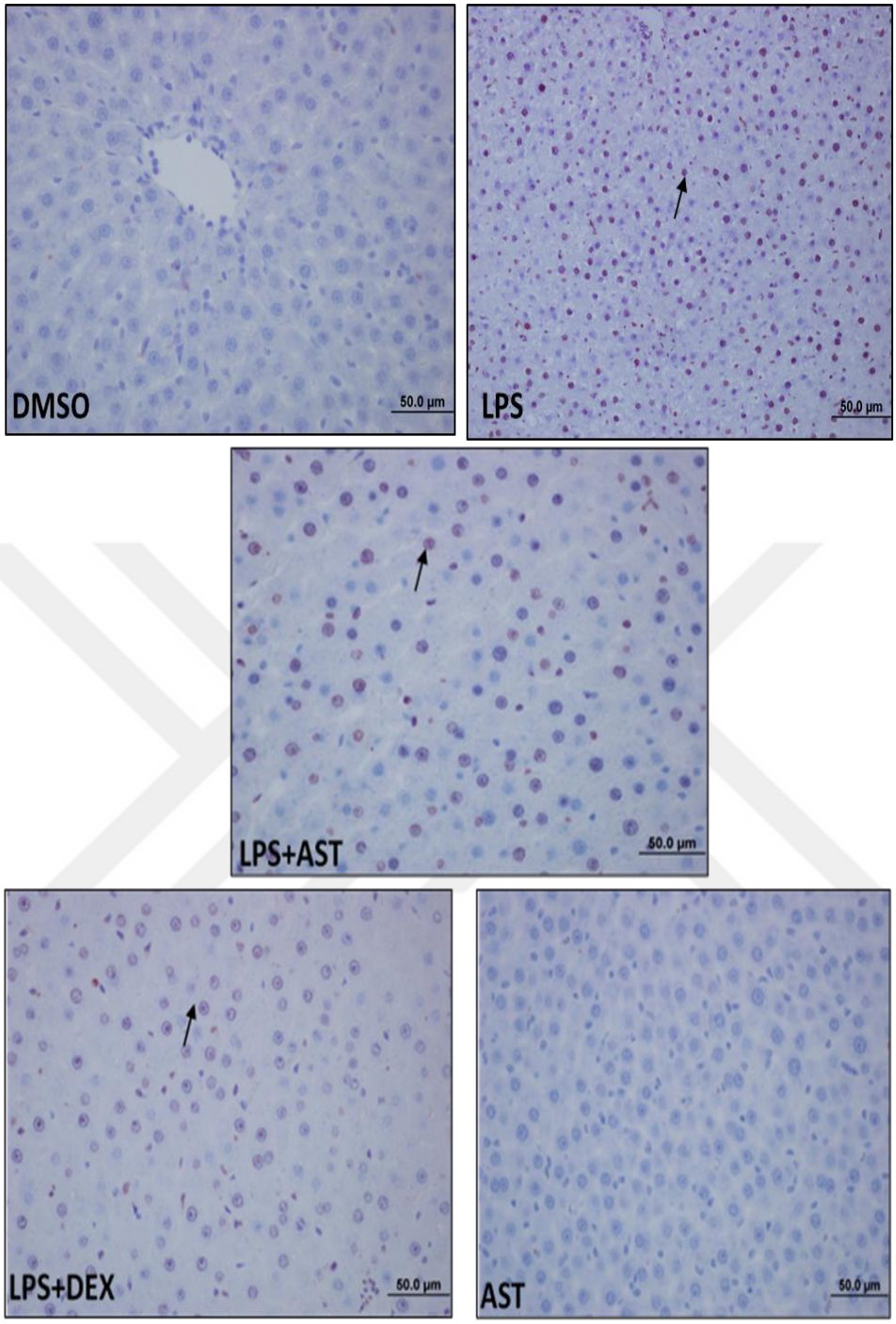
Şekil 4.2. IL-1 alfa antikoru Western Blot ekspresyon grafiği

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

DMSO grubuna ait doku örneklerinde TUNEL negatif reaksiyon görülürken LPS grubunda pozitif reaksiyon veren apoptotik hücreler gözlenmiştir. AST+LPS ve DEKS+LPS gruplarında ise apoptotik hücre ve reaksiyon şiddeti LPS grubuna göre belirgin düşüş göstermektedir. AST grubunda ise apoptotik hücreye rastlanmamıştır.

Tablo 4.9. Gruplardaki apoptotik reaksiyonların yüzde olarak karşılaştırılması

	DMSO	**LPS**	**AST**	**AST+LPS**	**DEKS+LPS**
Apoptotik hücre yüzdesi (%)	0	36,32	0	12,10	9,36



Şekil 4.3. TUNEL reaksiyonu ile belirlenmiş apoptotik hücreler (400x, ⟶)

5. TARTIŞMA

Dünya nüfusunun gittikçe yaşlandığı bugünlerde ölüm nedenleri arasında 10. sırada olan sepsis çeşitli risk faktörlerinin artması nedeniyle muhtemelen ilerleyen yıllarda daha öncelikli ölüm nedenlerinden biri olacaktır. Tedavisi konusunda her ne kadar kanıta dayalı tıbbi yaklaşımlar çerçevesinde klavuzlar ışığında protokoller geliştirilmiş olsa da küratif bir yaklaşım bulunmamaktadır. Günümüz tedavi yöntemlerinin çoğu destek ve semptomatik yaklaşım yöntemleridir. Sepsisin birçok faktörden oluşan birbirini tetikleyen fizyopatolojik yolağında herhangi bir basamağı engelleyerek sürecin ilerlemesine müdahale edilebilir. Bu fizyopatolojik süreçlerdeki değişikliklere yönelik deneysel çalışmalar sürmektedir. Biz de, bu süreçlerden bir kısmına dahil olan enflamatuar sitokinler üzerinden antienflamatuar etkisi olabileceğini düşündüğümüz astaksantin maddesinin etkilerini araştırmayı amaçladık.

Sepsis sürecinin incelendiği birçok çalışmada artışı tespit edilen sitokinlerden biri olan TNF-alfa çalışmamızda değerlendirildi. Plazma TNF-alfa düzeylerini ELİSA yöntemiyle, karaciğer hücrelerindeki TNF-alfa düzeylerini ise polimerize zincir reaksiyonu (PCR) ile değerlendirdik. Kontrol grubu olarak kabul edilen DMSO grubuna göre AST ve DEKS+LPS gruplarında plazma TNF-alfa düzeyleri anlamlı düşük bulundu. Benzer sonuçları bulunan Zhou ve arkadaşlarının (39) yaptığı çalışmada sepsis modeli oluşturulan sıçanlarda çoklu organ hasarına karşı astaksantinin koruyucu etkilerini incelemişler ve astaksantini peritonit modeli olması için uygulanan çekal ligasyon ve yaralama cerrahisi öncesi 7 gün boyunca oral yoldan vermişlerdir. Çalışmalarının sonucunda peritonit oluşturulan grupta 1. saatte TNF-alfa düzeyi artıp 3. saatte maksimum olurken, astaksantin verildikten sonra peritonit oluşturulan grupta daha az yükseklik olmuştur. Çalışmamızdaki gruplardan olan DEKS+LPS grubundaki TNF-alfa düzeyleri AST+LPS grubundaki değerlere göre anlamlı olarak daha fazla düşmüştür. Astaksantinin LPS varlığında TNF-alfa düzeylerini düşürme etkisi deksametazon kadar etkili bulunmamıştır. İntradermal LPS enjeksiyon yönteminin kullanıldığı Ohgami ve arkadaşlarının (29) yaptığı çalışmada LPS ile indüklenen humor aköz içerisindeki TNF-alfa düzeyleri astaksantin eklenen gruplarda astaksantin dozuna bağımlı olarak düşme eğiliminde

bulunmuştur. Hatta antienflamatuar etkinliği kanıtlanmış olan prednizolonun uygulandığı gruptaki TNF-alfa düzeyleri ile aynı sonuçlara intravenöz 100 mg/kg astaksantin uygulanan grupta ulaşılmıştır. Karaciğerde PCR yöntemiyle değerlendirdiğimiz TNF-alfa düzeyleri incelendiğinde LPS grubunda DMSO grubuna göre anlamlı yükseklik bulunmuştur. AST+LPS ve DEKS+LPS gruplarındaki TNF-alfa düzeyleri LPS grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ancak DEKS+LPS grubu ve AST+LPS grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Plazmada iki grup arasında anlamlı fark varken karaciğerde deksametazon ve astaksantin etkinliği LPS verilen sıçanlarda benzer bulunmuştur. Protein sentezinin ilk olarak gerçekleştiği organın karaciğer olduğu düşünülürse astaksantin etkinliğinin 24 saatten daha uzun bir sürede karaciğerdekine benzer şekilde plazmada da deksametazonla benzer düzeye ulaşabileceği düşünülebilir.

Karaciğerde enflamatuar süreçte etkin olduğu bilinen IL-1 alfa düzeyini çalışmamızda western blot yöntemiyle değerlendirdik. DEKS+LPS grubunda IL-1 alfa düzeyi LPS grubuna göre az da olsa bir düşüş göstermiştir. Ancak AST+LPS grubunda düşüş görülmemiştir. Bu bağlamda deksametazonun astaksantine göre sepsis modelinde IL-1 alfa üzerinde daha etkin olduğunu söyleyebiliriz. IL-1'in subgrupları olan IL-1 alfa ve IL-1 beta farklı çalışmalarda değişik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bazı çalışmalarda plazmada IL-1 beta düzeyi ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Zhou ve arkadaşlarının (39) yaptığı çalışmada serum IL-1 beta düzeyleri ELISA yöntemi ile değerlendirilmiş olup peritonit oluşturulan ve astaksantin tedavisi uygulanan grupta peritonit oluşturulan fakat tedavi edilmeyen gruba göre anlamlı olarak daha az yükselmiştir. Ayrıca bu çalışmada IL-6 konsantrasyonlarında da anlamlı düşük sonuçlar bulunmuştur.

Bazı kaynaklarda bir antienflamatuar sitokin olarak kabul edilen IL-6 nötrofillerden elastaz salınımını arttırarak nötrofillerin sitotoksik potansiyelini arttırdığı için daha çok enflamatuar bir sitokin olarak kabul görür (40). PCR tekniğiyle karaciğer dokusunda değerlendirdiğimiz IL-6 düzeyleri açısından hiçbir grupta anlamlı bir fark bulunmadı. Nagai ve arkadaşlarının (41) koroidal neovaskülarizasyonu önleyici olarak astaksantinin antienflamatuar etkilerini araştırdıkları çalışmalarında astaksantin verilen grupta IL-6 düzeyleri endotelyal hücrelerde azaldığı sonucuna ulaşmışlardır.

NF-kB heterodimer veya homodimerlerden oluşmuş bir transkripsiyon faktörüdür ve sitoplazmada inhibitör kB proteinlerine bağlı olarak sekestre halde bulunur. TNF-alfa, IL-1 ve daha birçok sitokin NF-kB sentezini indükleyerek kendi kaskatlarını başlatırlar ve sürdürürler (42). Suzuki ve arkadaşlarının (42) yaptığı çalışmada immünhistokimyasal olarak yaptıkları incelemede gözün çeşitli bölgelerinden alınan kesitlerdeki NF-kB (+) hücrelerin sayısını karşılaştırmışlardır. Astaksantinle tedavi edilen grupta LPS enjekte edilmiş olan ancak tedavi edilmeyen gruba göre NF-kB (+) hücre oranı anlamlı oranda düşüktür. Ayrıca bu çalışma astaksantinin in vivo olarak NF-kB sentezini suprese ettiğini gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışmanın ışığında astaksantinin NF-kB düzeylerini düşürerek TNF-alfa ve IL-1 beta düzeyini de düşürdüğü sonucuna ulaşılabilir. Nagai ve arkadaşlarının (41) yaptığı çalışmada in vivo ve in vitro olarak astaksantinin etkilerini incelerken NF-kB düzeylerinin astaksantin uygulanan in vivo çalışmada daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da karaciğer hücrelerinde PCR yöntemiyle bakılan NF-kB düzeyleri AST+LPS ve DEX+LPS gruplarında anlamlı olarak düşük bulundu. Ancak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Bu sonuçlar doğrultusunda astaksantin ve deksametazonun NF-kB düzeyleri üzerinde benzer etkinliği olduğu söylenebilir.

Sepsis sürecinde bağışıklık sistemi hücrelerinde kayıp ve apopitozda artış olduğu bilinmektedir (18). Çalışmamızda TUNEL boyama yöntemiyle incelenen karaciğer örneklerinde DMSO ve AST gruplarında negatif reaksiyon görülürken LPS grubunda pozitif reaksiyon veren apoptotik hücreler gözlenmiştir. AST+LPS ve DEKS+LPS gruplarında ise apoptotik hücre ve reaksiyon şiddeti LPS grubuna göre belirgin düşüş göstermektedir. Bu bulgular göstermiştir ki deksametazon ve astaksantin apopitozu anlamlı ölçüde azaltmaktır. İn vivo bir çalışma olması sebebiyle klinik pratikte anlamlı sonuçları olabileceği şeklinde umut verici bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Otsuka ve arkadaşlarının (30) yaptığı çalışmada astaksantin verildikten sonra aşırı ışığın hasar oluşturduğu retinal hücrelerde TUNEL yöntemiyle apopitoz değerlendirilmiş olup %28 gibi bir oranda daha az apopitoz olduğu görülmüştür. Astaksantinin intraserebroventriküler uygulandığı subaraknoid hemoraji oluşturulan ve erken beyin hasarı üzerine etkilerinin incelendiği Zhang ve

arkadaşlarının (43) çalışmasında da TUNEL yöntemiyle apopitoz değerlendirme sonuçlarında değişik dozlara cevaben azalmış apopitoz oranı tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sepsiste terapötik etkinliği olabileceğini düşündüğümüz astaksantinin antienflamatuar etkinliğini incelediğimiz çalışmamızda LPS ile sepsis modeli oluşturduğumuz çalışmada sıçanların karaciğer dokusunda ve plazmada çeşitli enflamatuar sitokin düzeylerini ve apopitozu değerlendirdik. Plazma TNF-alfa ve karaciğer dokusunda değerlendirilen IL-1 alfa, IL-6, TNF-alfa, NF-kB düzeylerinde astaksantin uygulamasının olumlu sonuçlarını elde ettik. Aynı zamanda deksametazon uygulaması ile karşılaştırıldığında farklılıklar olmakla birlikte benzer ölçüm değerleri de elde ettik. Apopitoz görülen hücre oranları değerlendirildiğinde anlamlı olarak astaksantinin etkin olduğu sonucuna ulaştık. Sonuç olarak sepsis sürecinde antienflamatuar etkinliğin değerlendirilebilmesi için farklı dozlarda astaksantin uygulamaları yapılması gerektiği, 24. saatle birlikte farklı zamanlarda değerlendirme yapılması gerektiği kanaatine ulaştık. Sepsis patogenezinde rol alan enflamatuar ve antienflamatuar etkenlerin kompleks bir etkileşimi olması nedeniyle bu süreçte etkili olabileceği düşünülen moleküllerin sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için çok fazla faktörün kayıtlarının tutulabildiği iyi standardize edilmiş çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al: The epidemiyology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546-1554.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome andassociated costs of care. Crit Care Med 2001;29:1303-1310.
3. Irwin RS, Rippe JM. Sepsis yönetimi (çeviri:S. Çakar Turhan). Tulunay M, Cuhruk H (Ed.) Yoğun Bakım Tıbbı Ankara: Güneş tıp kitabevleri 2014;163:1855-1869.
4. Medzhitov R, Janeway CJr: Innate immunity. N Engl J Med 2000;343:338-344.
5. Zanotti-Cavazzoni SL, Dellinger RP, Parillo JE. Ciritical Care Medicine. In:Dellinger RP, Parillo JE (Ed.) Severe sepsis and Multiple Organ Dysfuction 4th ed. Elsevier Saunders Philadephia 2014;25:365-378.
6. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al: Assessment of Clinical Criteria for Sepsis For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) JAMA 2016;315(8):801-810.
7. Underhill DM, Ozinsky A: Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Current opinion in immunology. 2002;14:103-110.
8. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, et al.: Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med. 2004;351:327-336.
9. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al.: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science. 1999;285:732-736.
10. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ: The toll of innate immunity on microbial pathogens. N Engl J Med. 1999;340:1834-1835.
11. Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature. 1996;383:787-793.

12. Zanotti S, Kumar A, Kumar A: Cytokine modulation in sepsis and septic shock. Expert Opin Investig Drugs. 2002;11:1061-1075.

13. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med. 2003;348:138-150.

14. Remick DG: Pathophysiology of sepsis. Am J Pathol. 2007;170:1435-1444.

15. Dhnainaut JF, Yan BS, Cariou A, Mira JP. Soluble thrombomodulin, plasma-derived unactivated protein C and recombinant human activated protein C in sepsis. Crit Care Med 2002; 345:408-416.

16. Giamarellos-Bourboulis E, Routsi C, Plachouras D et al. Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock. Critical Care 2006; 10/3.

17. Hotchkiss R, Osmon S, Chang KC et al. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. The Journal of Immunology 2005; 174:5110-5118.

18. Çağatay AA. Sepsis gelişimini kolaylaştıran faktörler ve sepsis patogenezi. ANKEM Derg 2006; 20: 43-46

19. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al.: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med. 2001;345:1368-1377.

20. Canabal JM, Kramer DJ: Management of sepsis in patients with liver failure. Curr Opin Crit Care. 2008;14:189-197.

21. Surviving Sepsis Campaign Bundles. Revised April 2015. Retrieved on 11/25/15.

22. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med 2013; 41:580–637.

23. Bertsen AD, Soni N. Oh's Intensive Care Manual. In:A Raffaele De Gaudio (Ed.) Severe Sepsis 7th ed. Elsevier London, United. 2014;69:716-723.

24. Wilkes NJ, Woolf R, Mutch M, et al: The effects of balanced versus saline-based hetastarch and crystalloid solutions on acid-base and electrolyte status and gastric mucosal perfusion in elderly surgical patients. Anesth Analg. 2001; 93:811-816.

25. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE: Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock. A systematic review. JAMA. 2009;301:2362-2375.

26. Afshari A: A critical and evidence based glance at some of the major publications in critical care 2011. Trends Anaesth Crit Care. 2012; 2:1-4.

27. Rimmelé T, Kellum JA: High-volume hemofiltration in the intensive care unit. A blood purification technique. Anesthesiology. 2012;116:1377-1387.

28. Gattinoni L, Carlesso E, Langer T: Towards ultraprotective mechanical ventilation. Curr Op Anaesthesiol. 2012;25:14-17.

29. Ohgami K, Shiratori K, Kotake S et al: Effects of astaksantin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Jun;44(6):2694-701.

30. Otsuka T, Shimazawa M, Nakanishi T et al: Protective effects of a dietary carotenoid, astaksantin, against light-induced retinal damage. J Pharmacol Sci. 2013;123(3):209-18. Epub 2013 Oct 22.

31. Uchiyama K, Naito Y, Hasegawa G et al: Astaksantin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. Redox Rep. 2002;7(5):290-3.

32. Curek GD, Cort A, Yucel G et al: Effect of astaksantin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. Toxicology. 2010 Jan 12;267(1-3):147-53.

33. Lee SJ, Bai SK, Lee KS et al: Astaksantin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. Mol Cells. 2003 Aug 31;16(1):97-105.

34. Franceschelli S, Pesce M, Ferrone A et al: Astaksantin treatment confers protection against oxidative stress in U937 cells stimulated with lipopolysaccharide reducing O2- production. PLoS One. 2014 Feb 10;9(2):e88359.

35. Li L, Whiteman M, Moore PK et al: Dexamethasone inhibits lipopolysaccharide-induced hydrogen sulphide biosynthesis in intact cells and in an animal model of endotoxic shock. J Cell Mol Med. 2009 Aug;13(8B):2684-92.

36. Korhonen R, Lahti A, Hämäläinen M et al: Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. Mol Pharmacol. 2002 Sep;62(3):698-704.

37. Lasa M, Brook M, Saklatvala J et al: Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. Mol Cell Biol. 2001 Feb;21(3):771-80.

38. Wang Z, Kang JS, Li Y et al: The effects of dexamethasone on rat brain cortical nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in endotoxic shock. Toxicol Appl Pharmacol. 2006 Aug 1;214(3):263-9.

39. Zhou L, Gao M, Xiao Z et al: Protective effect of astaksantin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. Journal of Surgical research. 2015; 195:559-567.

40. Panacek E, Kaul M: IL-6 as a marker of excessive TNF-alfa activity in sepsis. Sepsis 1999; 3: 65-73.

41. Izumi-Nagai K, Nagai N, Ohgami K et al: Inhibition of choroidal neovascularization with an anti-inflammatory carotenoid astaksantin. Invest ophthalmol Vis Sci. 2008;49:1679-1685.

42. Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K et al: Suppressive effects of astaksantin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF-kB signaling pathway. Experimental Eye Research 2006; 82:275-281.

43. Zhang XS, Zhang X, Zhou ML et al: Amelioration of oxidative stres and protection against early brain injury by astaksantin after experimental subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg 2014; 121:42-54.