



**T. C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA ÇEKUM LİGASYON VE
PERFORASYONU İLE OLUŞTURULMUŞ SEPSİS
MODELİNDE HİDROKSİKLOROKİN VE ÇİNKO
TEDAVİSİNİN ETKİSİ**

Dr. Bilgehan Ahmet CUMHUR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Mayıs 2023
İSTANBUL**



**T. C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA ÇEKUM LİGASYON VE
PERFORASYONU İLE OLUŞTURULMUŞ SEPSİS
MODELİNDE HİDROKSİKLOROKİN VE ÇİNKO
TEDAVİSİNİN ETKİSİ**

Dr. Bilgehan Ahmet CUMHUR

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Kurtuluş AÇIKSARI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Mayıs 2023
İSTANBUL**

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakóltesi'nde Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Yönetmeliğı hükümlerine göre uzmanlık eğitimi gören Dr. Bilgehan Ahmet CUMHUR'un hazırladığı ve jüri önünde savunduğı "SIÇANLARDA ÇEKUM LİGASYON VE PERFORASYONU İLE OLUŞTURULMUŞ SEPSİS MODELİNDE HİDROKSİKLOROKİN VE ÇİNKO TEDAVİSİNİN ETKİSİ" başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Kurtuluş AÇIKSARI
(İstanbul Medeniyet Üniversitesi)

(imza)

Üyeler

Prof. Dr. Behçet AL

(imza)

Doç. Dr. Ahmet AFACAN

(imza)

Dr. Öğr. Üyesi Gökem Alper SOLAKOĞLU

(imza)

Tarih: 14/06/2023

YAZAR BİLDİRİMİ

“SIÇANLARDA ÇEKUM LİGASYON VE PERFORASYONU İLE OLUŞTURULMUŞ SEPSİS MODELİNDE HİDROKSİKLOKİN VE ÇİNKO TEDAVİSİNİN ETKİSİ” isimli uzmanlık tezinde Dr. Bilgehan Ahmet CUMHUR;

- Bu tezin kabulünden önce nerede ve ne kadarının yayınlandığını “Bilgilendirme” bölümünde belirtmiştir.
- Tezin hazırlanmasında katkısı olanları “Bilgilendirme” bölümünde eksiksiz olarak belirtmiştir.
- Bu tez ile ilgili çıkar çatışması olup olmadığını “Bilgilendirme” bölümünde belirtmiştir.
- Tez içerisinde başkalarının yayınlanmış veya yayınlanmamış çalışmalarından yapılan alıntılar için gerekli kaynakları açıkça belirtmiştir.
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tırnak içerisine alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır.

Mayıs, 2023

BİLGİLENDİRME

- Bu tez daha önce herhangi bir yerde yayınlanmamıştır.
- Bu çalışmada adı geçen ilaç, tıbbi cihaz ve laboratuvar malzemelerinin üreticileri ile herhangi bir çıkar ilişkim yoktur.
- Bu çalışmaya ait herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Dr. Bilgehan Ahmet CUMHUR



TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, akademik çalışma yapılması yönüyle son derece destekleyici ve motive edici olan başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Behçet AL olmak üzere Doç. Dr Kurtuluş AÇIKSARI ve Dr. Öğr. Üyesi Gökem Alper SOLAKOĞLU'na

Asistanlık eğitimi süresince tecrübelerinden yararlandığım uzmanlarımıza

Değerli asistan arkadaşlarıma

Nöbet arkadaşlarım olan tüm sağlık personellerine teşekkür ederim

Dr. Bilgehan Ahmet CUMHUR

İÇİNDEKİLER

YAZAR BİLDİRİMİ	iii
BİLGİLENDİRME	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
RESİM LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. SEPSİS.....	2
2.2. ÇİNKO	3
2.3. HİDROKSİKLOROKİN.....	4
3. GEREÇ ve YÖNTEM	6
3.1. ARAŞTIRMA YERİ VE ZAMANI	6
3.2. ARAŞTIRMA TİPİ.....	6
3.3. ARAŞTIRMANIN UYGULAMASI.....	6
3.3.1. Deney hayvanları.....	6
3.4. DENEY PROTOKOLÜ	7
3.4.1. Sepsis modeli oluşturulması	7
3.5. DENEY GRUPLARI.....	7
3.6. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	8
3.7. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	9
3.7.1. Doku takibi	9
3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	11
4. BULGULAR.....	12
4.1. MİKROSKOPİK BULGULAR.....	12
4.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME.....	18

5. TARTIŞMA	22
6. SONUÇ	27
KAYNAKLAR	28
EKLER	
EK 1: ETİK KURUL ONAY FORMU	
EK 2: İNTİHAL RAPORU	



KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BUN	: Blood Urea Nitrogen (Kan Üre Azotu)
CLP	: Çekal Ligasyonu ve Ponksiyonu (CLP)
H&E	: Hematoxylin and Eosin (Hematoksilen–Eozin)
IFN	: Interferon
IL	: Interleukin (İnterlökin)
LPS	: Lipopolysaccharides (Lipopolisakkaritler)
MEWS	: Modified Early Warning Score (Değiştirilmiş Erken Uyarı Puanı)
MHC	: Major Histocompatibility Complex (Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi)
NEWS	: National Early Warning Score (Ulusal Erken Uyarı Puanı)
PAS	: Periodic Acid Schiff (Periyodik Asit Schiff)
PCT	: Procalcitonin (Prokalsitonin)
PMNL	: Polymorphonuclear Leukocyte (Polimorfonükleer lökosit)
qSOFA	: Quick Sequential Organ Failure Assessment (Hızlı Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi)
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türevleri)
SIRS	: Septic İnflammatory Response Syndrome (Septik İnflamatuar Cevap Sendromu)
SOFA	: Sequential Organ Failure Assessment (Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi)
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences (Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi)
TLR	: Toll Like Receptor (Toll Benzeri Reseptör)
TNF	: Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
WBC	: White Blood Cell (Beyaz Kan Hücresi)

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Hayvan sayıları.	6
Tablo 3.2. Tübüler alandaki parametreler için kullanılan skarlama.....	10
Tablo 3.3. İntertisyel alandaki parametreler için kullanılan skarlama.....	10
Tablo 4.1. H&E boyama sonuçları.....	17
Tablo 4.2. PAS boyama sonuçları.....	17
Tablo 4.3. Biyokimyasal parametreler istatistik sonuçları.	18
Tablo 4.4. Biyokimyasal parametreler istatistik sonuçları.	19
Tablo 4.5. Histolojik inceleme istatistik sonuçları.....	21



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Sepsis.	3
Şekil 4.1. Deney gruplarına ait örnek böbrek glomerüllerinin histolojik mikrografları ...	14
Şekil 4.2. Deney gruplarına ait örnek böbrek interstisyel dokusunun histolojik mikrografları	15
Şekil 4.3. Deney gruplarına ait örnek böbrek tübüllerinin histolojik mikrografları.....	16



RESİM LİSTESİ

Resim 3.1. Nekroze olmuş çekum.....	8
Resim 3.2. Kan örneklerinin toplanması.....	9
Resim 3.3. Organların çıkarılması	9



ÖZET

SIÇANLARDA ÇEKUM LİGASYON VE PERFORASYONU İLE OLUŞTURULMUŞ SEPSİS MODELİNDE HİDROKSİKLOROKİN VE ÇİNKO TEDAVİSİNİN ETKİSİ

Sepsis, her yıl milyonlarca insanı etkilemekte ve insidansı giderek artmaktadır. Çinko ve hidrosiklorokinin sepsiste savunma sistemine etkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olup birlikte verilmesi durumunda birbirinin etkilerini potansiyelize edip etmeyeceği henüz gösterilmemiştir. Çalışmada amacımız sepsiste birbirinden bağımsız organ hasarını azaltıcı etkisi gösterilmiş olan hidrosiklorokin ve çinkonun beraber verildiğinde organ hasarı üzerine etkilerinin gösterilmesidir.

Çalışmada n=6 olan 5 gruba eşit ayrılmış toplam n=30 adet sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar sepsis (Grup 1, kontrol), çinko+sepsis(Grup 2), hidrosiklorokin+sepsis(Grup 3), hidrosiklorokin+çinko+sepsis(Grup 4) ve serum fizyolojik tedavisi almış sham(Grup 5) olarak 5 gün boyunca her grubun belirtilmiş olan kendi ön tedavileri uygulanmış ve 6. günde çekum perforasyon ligasyon modeli ile sepsis oluşturulmuştur. 8. günde hayvanlar dekapite edilerek toplanan kanlarda IL-6, hemogram, CRP, Prokalsitonin düzeyleri çalışılmıştır. Hayvanların böbrek dokularında histolojik inceleme (tubular dilatasyon, tubular epiteliyal nekroz, cast oluşumu, glomerular vakuolasyon, bowman boşluğu dilatasyonu, glomerular atrofi, mononükleer lenfosit infiltrasyonu ve hemoraji mevcudiyeti ve derecesine göre puan verilerek) yapılmıştır.

Histolojik incelemede Grup 2, 3 ve 4'teki hayvanların doku tahribatının Grup 1'den anlamlı derecede düşük olduğu ($p<0.001$) tespit edilirken, tedavi alan 2, 3 ve 4'deki hayvanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmedi. Kanda WBC açısından yapılan incelemede Grup 1'in değerlerinin Grup 2, Grup 3 ve Grup 5'ten istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. WBC düzeylerinde Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Nötrofil sonuçları açısından yapılan incelemede Grup 2, Grup 4 ve Grup 1 arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenirken, Grup

4'ün Grup 5'ten anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. Ayrıca Grup 1, 2, 3 ve Grup 5 arasında da farklılık saptanmadı.

Daha önce yapılan çalışmalarda sepsiste olumlu etkileri gösterilmiş olan hidroksiklorokin ve çinkonun sepsis modelinde birlikte verilmesi durumunda hidroksiklorokinin çinkonun hücre zarında por oluşturarak hücre içi çinko konsantrasyonunu artırmasına rağmen sepsise bağlı organ hasarında bir değişikliğe yol açmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çinko, Hidroksiklorokin, Sepsis, Sıçan



ABSTRACT

THE EFFECT OF HYDROXYCHLOROQUINE AND ZINC THERAPY IN A MODEL OF SEPSIS CREATED BY CECAL LIGATION AND PERFORATION IN RATS

Sepsis affects millions of people every year, and its incidence continues to increase. The effects of zinc and hydroxychloroquine on the defense system in sepsis have been demonstrated in previous studies; however, it is yet to be shown whether their combination would potentiate each other's effects. The aim of our study is to demonstrate the effects of hydroxychloroquine and zinc, which have been shown to have independent organ damage-reducing effects in sepsis, on organ damage when administered together.

A total of n=30 rats, divided into five equally sized groups with n=6 in each group, were used in the study. Animals were treated for 5 days as sepsis (Group 1, control), zinc+sepsis (Group 2), hydroxychloroquine+sepsis (Group 3), hydroxychloroquine+zinc+sepsis (Group 4), and sham receiving saline treatment (Group 5). On the 6th day, sepsis was induced with the cecal ligation and puncture model following the specified pre-treatments of each group. On the 8th day, the animals were decapitated, and IL-6, hemogram, CRP, and procalcitonin levels were analyzed in the collected blood samples. Histological examination of the animals' kidney tissues was performed (tubular dilatation, tubular epithelial necrosis, cast formation, glomerular vacuolation, Bowman's space dilatation, glomerular atrophy, mononuclear lymphocyte infiltration, and the presence and degree of hemorrhage were evaluated and scored).

In the histological examination, it was determined that tissue destruction in Group 2, 3, and 4 animals was significantly lower than in Group 1 ($p<0.001$), while no statistically significant difference was observed among the treated animals in Groups 2, 3, and 4. The examination of WBC levels in the blood revealed that Group 1 had statistically higher values than Group 2, Group 3, and Group 5 ($p<0.05$). No significant difference was found in WBC levels between Groups 2, 3, 4, and 5. In the analysis of neutrophil results, there was no

significant difference between Group 2, Group 4, and Group 1, whereas Group 4 had significantly higher values than Group 5 ($p<0.05$). Additionally, no difference was detected between Groups 1, 2, 3, and 5.

In previous studies, hydroxychloroquine and zinc, which have demonstrated positive effects in sepsis, did not cause any change in organ damage due to sepsis when administered together in the sepsis model. This is in spite of hydroxychloroquine increasing the intracellular zinc concentration by forming pores in the cell membrane, in the presence of zinc.

Keywords: Zinc, Hydroxychloroquine, Zinc, Rat, Sepsis



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Önemli bir halk sağlığı problemi olan sepsis, her yıl milyonlarca insanı etkilemekte ve insidansı giderek artmaktadır (1).

Yaklaşık 60 yıl önce hidroksiklorokin bir antimalaryal ilaç olarak tanımlanmıştır. Daha yakın zamanlarda, hidroksiklorokin proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonu arttıran romatoid artrit ve sistemik lupus eritematoz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (2,3).

Çinko, temel bir eser elementtir (4,5). Çinko eksikliği, büyüme geriliği, dermatit ve hipogonadizm veya gecikmiş yara iyileşmesi, timik atrofi veya lenfopeni gibi semptomlar ve yüksek enfeksiyon insidansı ile sonuçlanabilir(6–8). Dışarıdan canlılara çinko verilmesi durumunda hücre içi çinko düzeyindeki artış dışarıdan verilen çinko miktarına göre çok düşük düzeydedir. Çinkonun hücre içine alımının hücre zarının yapısından dolayı sınırlandırılmaktadır. Hidroksiklorokin eklenmesi durumunda hücre içi çinko düzeyi yüksek oranda artmaktadır ki bu da hidroksiklorokin çinko iyonoforu olduğunu göstermektedir.

Çinko ve hidroksiklorokin sepsiste savunma sistemine etkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olup birlikte verilmesi durumunda birbirinin etkilerini potansiyelize edip etmeyeceği henüz gösterilmemiştir.

Çalışmada amaç sepsiste birbirinden bağımsız organ hasarını azaltıcı etkisi gösterilmiş olan hidroksiklorokin ve çinkonun beraber verildiğinde organ hasarına etkisinin nasıl olduğunun gösterilmesidir (9,10).

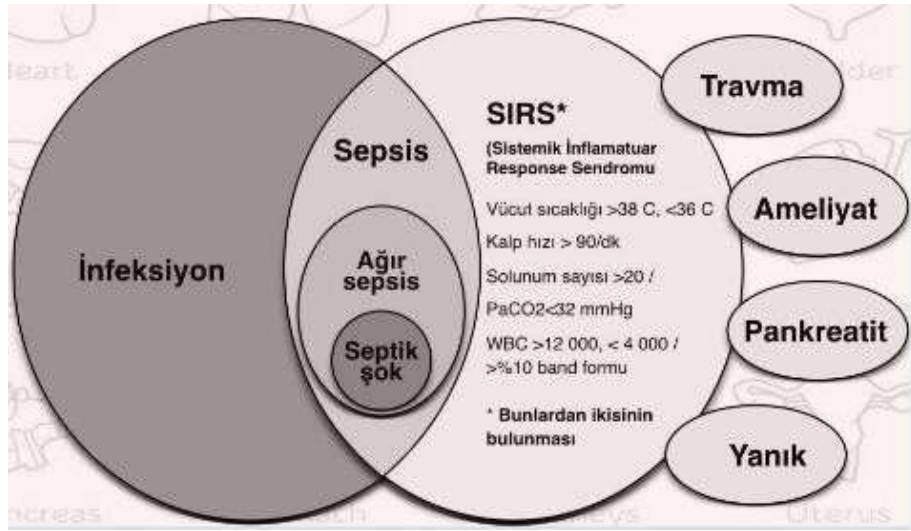
2. GENEL BİLGİLER

2.1. SEPSİS

Sepsis, bir enfeksiyonun vücudun kendi dokularına ve organlarına hasar verdiğinde ortaya çıkan yanıtta kaynaklanan, morbidite ve mortaliteyle sonuçlanan, mikrobiyal patojenlere karşı konağın sistemik bir yanıtıdır (11). 500.000'den fazla ciddi sepsis vakası ilkbahşvuruda ABD acil servislerinde yönetilmektedir ve acil serviste kalış süresi ortalama 5 saattir. Şiddetli sepsisin acil servis yönetiminin köşe taşları, zamanında tanı, uygun antibiyotiklerin erken uygulanması ve erken agresif kantitatif resüsitasyon içerir. Acil tıbbi hizmetler personelinin, akut yaşamı tehdit eden durumları doğru bir şekilde tanınması ve en uygun tıbbi bakım tesisine hızlı bir şekilde ulaştırmanın yanı sıra ilk resüsitasyon ve hava yolu yönetimi gibi potansiyel hayat kurtarıcı müdahaleler sağlaması gerekir (12,13).

Sepsis her yıl 50 milyona yakın insanı etkiler ve bunların %40'ından fazlası 5 yaşın altındaki çocuklardır. Sepsis her yıl 11 milyondan fazla ölüme neden olmaktadır (36). Sepsis taraması için sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) kriterleri, vital bulgular, enfeksiyon belirtileri, hızlı Sıralı Organ Yetmezliği Skoru (qSOFA) veya Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi (SOFA) kriterleri, Ulusal Erken Uyarı Puanı (NEWS) veya Değiştirilmiş Erken Uyarı Puanı (MEWS) gibi skorlamalar kullanılmaktadır (14).

Sepsis, bir enfeksiyon kaynağının varlığı ve bu enfeksiyona karşı iki veya daha fazla SIRS kriterinin varlığıyla ölçülen sistemik bir inflamatuvar yanıtın kanıtı olarak tanımlanır. Sepsisin klinik özellikleri SIRS kriterlerinden üçünü içerir; 100,4°F'den yüksek veya 96,8°F'den (>38,0°C veya <36,0°C) düşük bir sıcaklık taşikardi, dakikada 90 atımdan daha yüksek bir kalp hızı ve takipne, 20 nefes/dakikadan daha yüksek bir solunum hızı; sepsisin temel laboratuvar bulgusu lökosit sayısının 12 bin/mm³'ten büyük veya 4 bin/mm³'ten az veya immatür hücre sayısının %10'dan fazla olmasıdır ve dördüncü SIRS kriterini oluşturur. Olası septik şoku olan veya sepsis olasılığı yüksek olan yetişkinler için, antimikrobiyallerin hemen, ideal olarak tespitten sonraki 1 saat içinde verilmesini önerilmektedir (12).



Şekil 2.1. Sepsis.

Sepsis sendromu, inflamatuvar mediatörlerin salınımını tetikleyen ve konakta hücrel disfonksiyonu uyaran bakteriyel, fungal, viral ve paraziter enfeksiyonlardan kaynaklanabilmektedir (15). Sepsiste; reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türlerinin aşırı sistemik üretimi, plazmada görülen sayısız proinflamatuvar mediatör varlığı ile tanımlanan perinflamatuvar durum, monositlerde, makrofajlarda, polimorfonükleer nötrofiller ve endotel hücrelerinde artmış adezyon moleküllerinin yanı sıra, reaktif olan lökositlerde, sitokinlerde ve kemokinlerde reseptör artışı hem kemirgenlerde hem de insanlarda görülen ortak bulgulardır (4).

Güncel sepsis rehberi olan Surviving Sepsis Campaign 2021'e göre; Sepsis veya septik şok için tek bir tarama aracı olarak SIRS, NEWS veya MEWS'ye kıyasla qSOFA'nın kullanılmaması önerilmektedir.

Sepsis ve septik şok tıbbi acil durumlardır ve tedavi ve resüsitasyonun hemen başlaması önerilmektedir. Sepsis kaynaklı hipoperfüzyon veya septik şoklu hastalar için resüsitasyonun ilk 3 saati içinde en az 30 mL/kg intravenöz (IV) kristaloid sıvı verilmesi uygundur (14).

2.2. ÇİNKO

Çinko eksikliği, çoklu immünolojik değişikliklere neden olur (16). Çinkonun özellikle önemli bir etkisi, inflamatuvar sitokinlerin üretimini modülasyonudur (11). Ayrıca çinko, neredeyse tüm bağışıklık hücrelerinin çalışması için gereklidir. Örneğin, olgunlaşmamış T hücrelerinin farklılaşması çinkoya bağlıdır, çünkü T hücre farklılaşmasında rol oynayan bir hormon olan timulin bir ko-faktör olarak çinkoya bağlıdır(16–19). Öte yandan, çinko desteğinin Th hücre gelişimini desteklediği ve Th17

hücrelerinin olgunlaşmasını baskıladığı, dolayısıyla Th17 aracılı otoimmün hastalıklar üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (17–19). Moleküler düzeyde, çinkonun bazı işlevleri, bağışıklık hücrelerinde ikinci bir haberci olarak rolüyle ilişkilendirilmiştir. Hücre içi serbest çinko konsantrasyonundaki değişikliklerin bir "çinko sinyali" olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Hücre içi serbest çinko konsantrasyonundaki bu tür bir değişiklik, lipopolisakkarit (LPS) gibi Toll benzeri reseptör 4'e (TLR-4) veya karşılık gelen antijenlerin immünoglobulin E'ye olduğu gibi ilgili reseptörlerine bağlanmasıyla indüklenir. Farklı türdeki bağışıklık hücreleri, çinko kullanan reseptörlerin ekspresyonlarında farklılık gösterir; sonuç olarak çinko sinyalleri çeşitli olaylara aracılık eder, örneğin monositler tarafından proinflamatuvar sitokinlerin oluşumu (20), dendritik hücrelerin yüzeyinde majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerin sunumu (21), nötrofil granülositler tarafından hücre dışı nötrofil tuzaklarının oluşumu (22) veya T hücrelerinin çoğalması (23) çinko durumlarından etkilenir. Bir yandan bir eksiklik Th1 ve Th2 hücrelerinin değişen oranlarına, olgunlaşmamış T hücrelerinin apoptoz oranının artmasına ve sonuç olarak T hücrelerinde toplamda bir azalmaya neden olur (24–27). Öte yandan, çinko desteğinin düzenleyici T hücre gelişimini desteklediği ve Th17 hücrelerinin olgunlaşmasını baskıladığı, dolayısıyla Th17 aracılı otoimmün hastalıklar üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (17,19,23).

Yüksek afiniteli immünoglobulin E-reseptöründe bulunur. Çinko sinyalleri monositler tarafından proinflamatuvar sitokinlerin oluşumu (20), dendritik hücrelerin yüzeyinde MHC-II moleküllerin sunumu (21), nötrofil granülositler tarafından hücre dışı nötrofil tuzaklarının oluşumu (22) veya T hücrelerinin çoğalması gibi çeşitli olaylara aracılık eder (23). Ülkemizde de sağlam çocuklarda bile demir, çinko ve A vitamini eksikliğinin önemli boyutlarda olduğu görülmektedir (28).

Bazı çalışmalar, çinkonun daha düşük ölüm oranı ve yenidoğanların daha iyi nörolojik gelişimi şeklinde yararlı bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, takviyenin çinko grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yaratmadığı, hatta zararlı bir etki gösterdiğini de göstermiştir (28) .

2.3. HİDROKSİKLOROKİN

Hidroksiklorokin'in normal insan kan hücreleri, tarafından LPS kaynaklı TNF-a salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (2,3). Hem klorokin hem de hidroksiklorokin zayıf bazlardır ve asidik organellerde birikirler; Her iki ilaç da B, T ve diğer bağışıklık hücrelerinde Toll benzeri reseptör ve cGAS/STING sinyali yoluyla MHC II ekspresyonunu,

antijen sunumunu ve başışıklık sistemi aktivasyonunu inhibe edebilir (9). Her iki ilacın başlıca önerilen immünomodülatör mekanizmaları şunlardır: sitokin üretiminin inhibisyonu, düşük kemokin seviyeleri, mikro RNA ekspresyonunun inhibisyonu, azalmış TH17 ile ilişkili sitokinler, IFN- α ve IL-2 ve IL-10'un yukarı regüle seviyeleri, sitotoksik T hücresi ve kendi kendine reaktif CD4 + lenfosit aktivitelerinin inhibisyonu. Sonuç olarak, KRS'de rol alan IL-1, IL-6, IFN- γ ve TNF- α gibi proinflatuar sitokinlerin üretimini azaltabilirler (9). Hidroksiklorokin, HMGB1 salınımını inhibe ederek, bir hayvan öldürücü endotoksemi ve in vivo sepsis modelinde ölümcül sepsis ve sistemik inflamasyon için terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (28).

Çalışmamızın amacı sepsis durumunda hücre içi çinko miktarının hidroksiklorokin tedavisine sekonder artması sonrası sepsisin organ hasarına etkisinin nasıl olduğunu göstermektir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMA YERİ VE ZAMANI

Bu çalışma protokolü için Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır (ACU-HAYDEK 2021/32 karar sayılı 18.05.2021 tarihli). Çalışma yine Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri laboratuvarında yapılmıştır. Çalışma finansal olarak İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

3.2. ARAŞTIRMA TİPİ

Araştırma deneysel olarak yapıldı.

3.3. ARAŞTIRMANIN UYGULAMASI

3.3.1. Deney hayvanları

Bu deneysel araştırma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapıldı. Bu araştırma süresince Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesinde yer alan etik ilkelere uyuldu. Çalışmada toplam n=45 adet her iki cinsiyetten eşit sayıda erkek Sprague-Dawley sıçanlar (250-300 gr) kullanıldı. Sıçanlar ısı ($22\pm1^{\circ}\text{C}$), nem (%65–70) ve ışık kontrolü sağlanmış ortamda 130 mg/kg çinko standart pellet sıçan yemi ile beslendi ve deney süresince ışık döngüsü 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı (29).

Sıçanlar her grupta 9 sıçan olacak şekilde 5 gruba randomize edildi.

Tablo 3. 1. Hayvan sayıları.

Deney ve kontrol grupları	Hayvan adedi (n)
Grup 1- Sepsis	9
Grup 2- Sepsis + Çinko (40 mg/kg Çinko Klorür – orogastrik yolla)	9
Grup 3- Sepsis + Hidroksiklorokin (200mg/kg – orogastrik yolla)	9
Grup 4- Sepsis+Çinko+Hidroksiklorokin (orogastrik yolla 40 mg/kg Çinko Klorür ve 200mg/kg Hidroksiklorokin)	9
Grup 5- Sham (Kontrol)	7
Kullanılan toplam hayvan sayısı:	43

3.4. DENEY PROTOKOLÜ

3.4.1. Sepsis modeli oluşturulması

Bu model hazırlanırken işlemden 15 dk önce 50 mcg/kg asetaminofen intraperitoneal olarak uygulanmıştır (30). Sepsis modeli yapılırken genel anestezi altında (ketamin 100 mg/kg ve xylazine 3 mg/kg intraperitoneal) sıçanların abdomen orta üst hattında insizyon ile açılmış ve periton kesi ile geçilerek çekuma ulaşılmıştır (29). Çekum 2-0 ipek sütür ile 1 cm distalden bağlanarak 21-gauge iğne ile 2 yerden perfore edilmiştir. Bu işlem sonrası çekum minimal bir bası ile fekal içeriğin çekum çevresine bulaşması sağlandıktan sonra çekum eski anatomik pozisyonuna getirilerek abdomendeki insizyon suture edilmiştir. Sonrasında cerrahi sırasında hayvanların kaybettiği sıvı 30cc/kg olacak şekilde hayvanlara subkutan enjekte edilmiştir. Sham grubunda ise çekuma ulaşıldıktan sonra perforasyon oluşturulmadan çekum anatomik pozisyonuna getirilerek abdomen kapatılmıştır.

3.5. DENEY GRUPLARI

Grup 1 (Sepsis, n=9): 5 gün boyunca standart pellet yem ve su verilen 9 adet sıçanda 6. günde sepsis oluşturuldu ve 8. Günde genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

Grup 2 (Sepsis+Çinko, n=9): 5 gün boyunca standart pellet yem, su, 12 saat ara ile sabah ve akşam 40 mg/kg Çinko Klorür – orogastrik tüp ile verilen 9 adet sıçanda 6. günde sepsis oluşturuldu, son tedavi 7. Gün akşam verildi ve 8. gün sabah genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

Grup 3 (Sepsis+Hidroksiklorokin, n=9): 5 gün boyunca standart pellet yem, su, 12 saat ara ile sabah ve akşam 200mg/kg hidroksiklorokin–orogastrik tüp ile verilen 9 adet sıçanda 6. günde sepsis oluşturuldu, son tedavi 7. Gün akşam verildi ve 8. gün sabah genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

Grup 4 (Sepsis+Hidroksiklorokin+Çinko, n=9): 5 gün boyunca standart pellet yem, su, 12 saat ara ile sabah ve akşam 40 mg/kg Çinko Klorür + 200mg/kg hidroksiklorokin–orogastrik tüp ile verilen 9 adet sıçanda 6. günde sepsis oluşturuldu, son tedavi 7. Gün akşam verildi ve 8. gün sabah genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

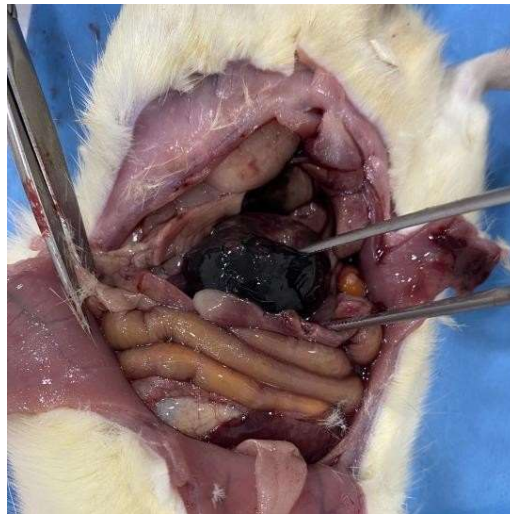
Grup 5 (Sham,n=7): 5 gün boyunca standart pellet yem ve su verilen 7 adet sıçan 6. günde genel anestezi altında (ketamin 100 mg/kg ve xylazine 3 mg/kg intraperitoneal) sıçanların abdomen orta üst hattında insizyon ile açılmış ve periton kesi ile geçilerek çekuma

ulaşılmıştır. Çekumda ligasyon perforasyon yapılmadan periton ve abdomen orta hat suture edilerek kapatıldı.

Tüm sıçanlar 8. gün genel anestezi altında (ketamin 100 mg/kg ve xylazine 3 mg/kg intraeritoneal) dekapitasyon ile sakrifiye edildi. 8. günde yapılan sakrifikasyona kadar ölen olan hayvanlar (sepsis grubundan 1, hidroksiklorokin grubundan 1, çinko grubundan 1 ve çinko+hidroksiklorokin grubundan 1 hayvan) çalışmadan çıkarılmıştır.

3.6. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Deney periyodunun sonunda sıçanlar genel anestezi altında giyotin vasıtasıyla dekapitasyon ile sakrifiye edilerek hemen 8-10 cc kan kardiyak ponksiyon ile toplandı (29,31). Sıçanlardan toplanan kan hemogram tüpü (mor renkli) ve stt jelli (sarı kapaklı- Serum separatör tüp (SST) santrifüj ile serumu kandan ayıracak jel içermektedir) tüp ile + 4 derecelik soğutuculu kaplar ile İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarına getirildi ve hemogram hemen çalışıldı, diğer parametreler santrifüj sonrası eksi 80 derecede muhafaza edildi. Burada ticari kitler yardımıyla IL-6, hemogram, CRP, Prokalsitonin düzeyleri çalışıldı. Böbrek,kalp,akciğer,dalak ve karaciğer dokuları histolojik inceleme için çıkartıldı. Böbrek,kalp,akciğer,dalak ve karaciğer doku örnekleri, %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 72 saat fikse edildi. Fiksasyonu takiben dokular, yükselen etil alkol serisi (%70, %90, %96, %100) ile dehidratasyon ve ksilenle saydamlaştırma aşamalarından geçirildi. Dokular daha sonra parafine gömüldü. Mikrotom ile 5 µm kalınlığında alınacak olan kesitler sıcak su banyosuna aktarıldı. Daha sonra doku bloklarından elde edilecek olan kesitler histolojik boyamalar için lamlara alındı.



Resim 3.1. Nekroze olmuş çekum.



Resim 3.2. Kan örneklerinin toplanması.



Resim 3.3. Organların çıkarılması.

3.7. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

3.7.1. Doku takibi

%10 luk nötral formalin solüsyonu içerisinde fikse edilmiş dokular, 5 saat çeşme suyu altında yıkandı. 1 gece %70 alkolde bekletildi. Ertesi gün 1 saat %80 alkol, 1 saat %90 alkol, 30 dk lık 2 periyot halinde %96 lık alkol ve 30 dk lık 2 periyot halinde %100 alkolden geçirildi. 15 dk lık 2 periyot halinde ksilen bekletildi. 45 dk eritilmiş parafin ve ksilen karışımında bekletildi. 2 saat eritilmiş parafinde bekletildi. Daha sonra dokular parafin bloklar halinde gömüldü. Dokular PAS ve hematoksilin-Eozin ile boyandı(32,33).

Bakılan parametreler:

1) Glomerüler alan;

Glomerüler alandaki hücreler en az 0 en fazla 40 olacak şekilde sayılacaktır. Bowman boşluğunda artma: Böbrek korteksindeki glomerüllerin bowman boşluğunda hacimsel artış aranmıştır (34).

Glomerül atrofisi: Böbrek glomerüllerinde bowman boşluğundaki hacimsel artış ile birlikte kapiller damar yumağında hacimsel azalış aranmıştır (34).

Glomerülde vakuolizasyon: Böbrek glomerüllerinde kapiller nekroza işaret eden vakuollerin belirmesi aranmıştır (34).

Glomerüler alandaki hücreler en az 0 en fazla 40 olacak şekilde sayılacaktır.

2) Tübüler alan;

Tablo 3.2. Tübüler alandaki parametreler için kullanılan skorlama.

Kesitte görülen hücre sayısı	
1 veya 2	Az
3 veya 4	Orta
5 ve üzeri	Çok

Tubular dilatasyon: Böbrek tubuluslerinde hacimsel artış aranmıştır (35).

Tubulopitelyal nekroz: böbrek tübüllerinde genişleme ile birlikte, vakuolizasyon aranmıştır (36).

Cast formasyonu: böbrek tübüllerinde protein presipitasyonu ile oluşan cast formasyonu aranmıştır (36).

3) İnterstisyel alan;

Tablo 3.3. İnterstisyel alandaki parametreler için kullanılan skorlama.

Kesitte görülen hücre sayısı	
1 veya 2	Az
3 veya 4	Orta
5 ve üzeri	Çok

İnterstisyel hemoraji: Böbrek interstisyumunda eritrosit varlığı aranmıştır (36).

Mononükleer infiltrasyon: böbrek interstisyumunda lenfosit ve monosit varlığı aranmıştır (35).

Boyanmış olan kesitler doku hasarının derecesini belirlemeye yönelik olarak tübüler ve glomerüler dejenerasyon, iltihabi hücre infiltrasyonu ve vazokonjesyon dereceleri 0 ila 5 arasında (0: hasar yok; 1: az derecede hasar; 2: orta derecede hasar; 3: orta derecede hasar, 4: orta derecede hasar 5: yoğun hasar) bazında skorlandı.

Glomerülde vakuolizasyon, Bowman boşluğunda artma, Glomerül atrofisi kesitte en düşük 0, en fazla 40 tane olacak şekilde sayıldı.

3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (Statistical Package for Social Sciences) (for Windows; version 18.0) (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm veriler açısından gruplar arası farklılık Kruskal Wallis testi ile incelendi. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için *post hoc 97 multiple comparison testi* (Conover 1980) yapıldı. Yapılan istatistiki analizlerden elde edilen sonuçlardan $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) ve $P < 0.001$ (***) olan değerler önemli kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. MİKROSKOPİK BULGULAR

Kontrol grubuna ait kesitlerin morfolojik görüntüleri normal histolojik yapıda gözlendi. Sepsis grubunda ise ciddi glomerüller ve tübüler hasar görüldü.

Tubular dilatasyon (resim 6) açısından yapılan incelemede kontrol, hidrosiklorokin, çinko ve hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grup sepsis grubundan anlamlı derecede düşük olduğu ($p<0.001$) tespit edilirken, hidrosiklorokin, çinko ve hidrosiklorokin ile birlikte çinko verilen grup arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmedi. Ayrıca kontrol, hidrosiklorokin, çinko ve grupları arasında da anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir.

Tubular epiteliyal nekroz (resim 6) açısından yapılan incelemede ise kontrol, hidrosiklorokin, çinko grupları arasında istatistiksel bir fark olmadığı ayrıca bu üç grubun sepsis grubundan anlamlı oranda daha düşük olduğu tespit edildi. Hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grubu sayısal olarak sepsis grubundan daha az olsa da aralarında anlamlı bir farklılık olmadı görüldü.

Cast oluşumu (resim 6) açısından kontrol hidrosiklorokin, çinko ve hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grup arasında farklılık olmadığı, bu gruplardan kontrol, çinko ve hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grupların sepsis grubundan istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlendi. Hidrosiklorokin grubu sayısal olarak sepsis grubundan daha az olsa da aralarında anlamlı bir farklılık olmadı görüldü.

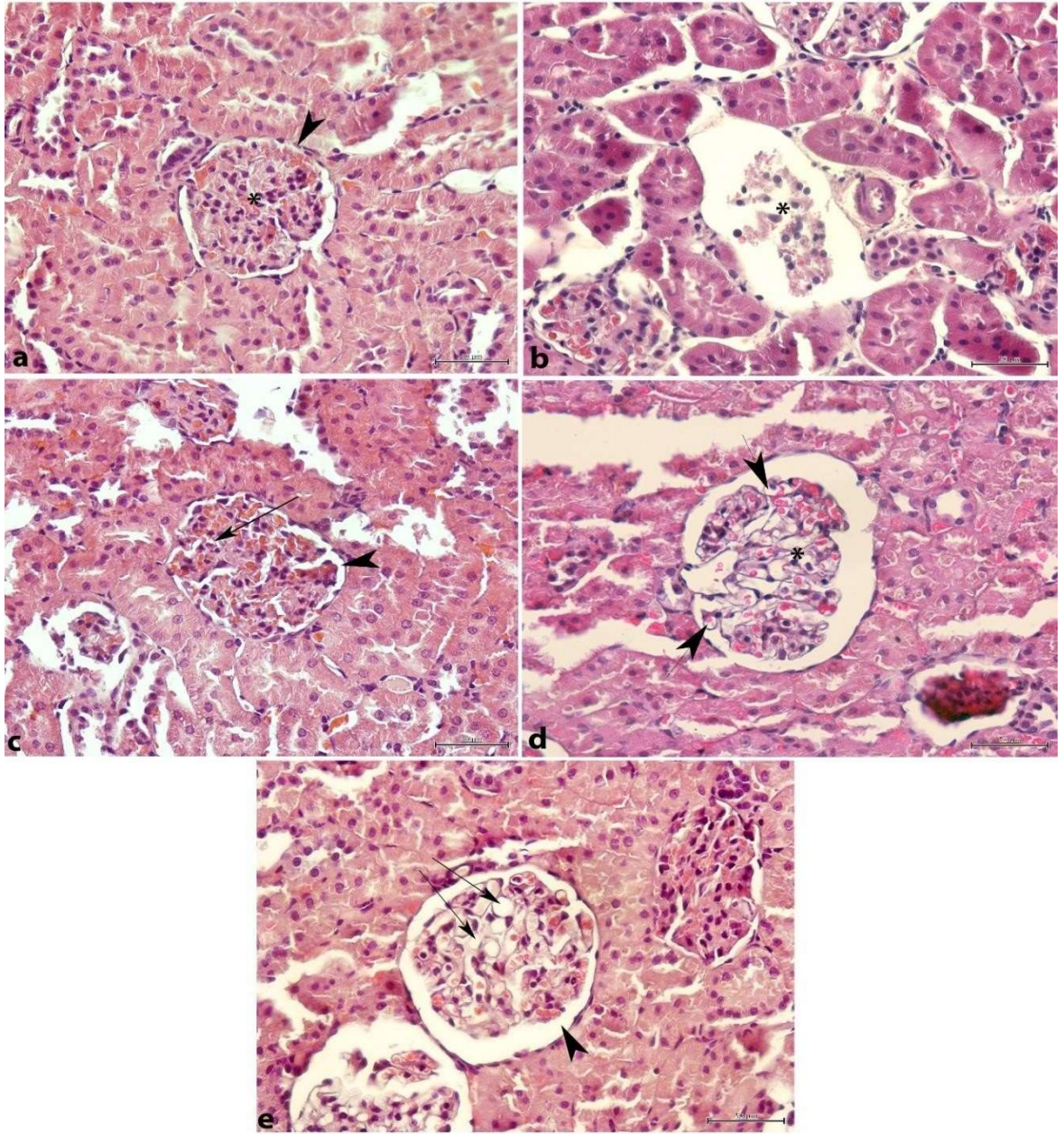
Glomerular vakuolasyon (resim 4) açısından yapılan incelemede kontrol ve hidrosiklorokin grupları ile Sepsis, çinko ve hidrosiklorokin ile birlikte çinko verilen grup arasında farklılık bulunmamıştır. Tedavi gruplarından sadece hidrosiklorokin grubu sepsis grubundan anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur.

Bowman boşluğu dilatasyonu (resim 4) açısından ise sepsis grubu kontrol grubundan sadece sayısal olarak yüksek ($p>0.05$) olsa da aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Hidrosiklorokin, çinko ve hidrosiklorokin ile birlikte çinko grupları sepsis grubundan istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur.

Glomerular atrofi (resim 4) bakımından kontrol, hidroksikolorokin, çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grup arasında farklılık olmadığı, bu gruplardan kontrol, Hidroksikolorokin, çinko ve gruplarının sepsis grubundan istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlendi. Hidroksikolorokin grubu sayısal olarak sepsis grubundan daha az olsa da aralarında anlamlı bir farklılık olmadı görüldü.

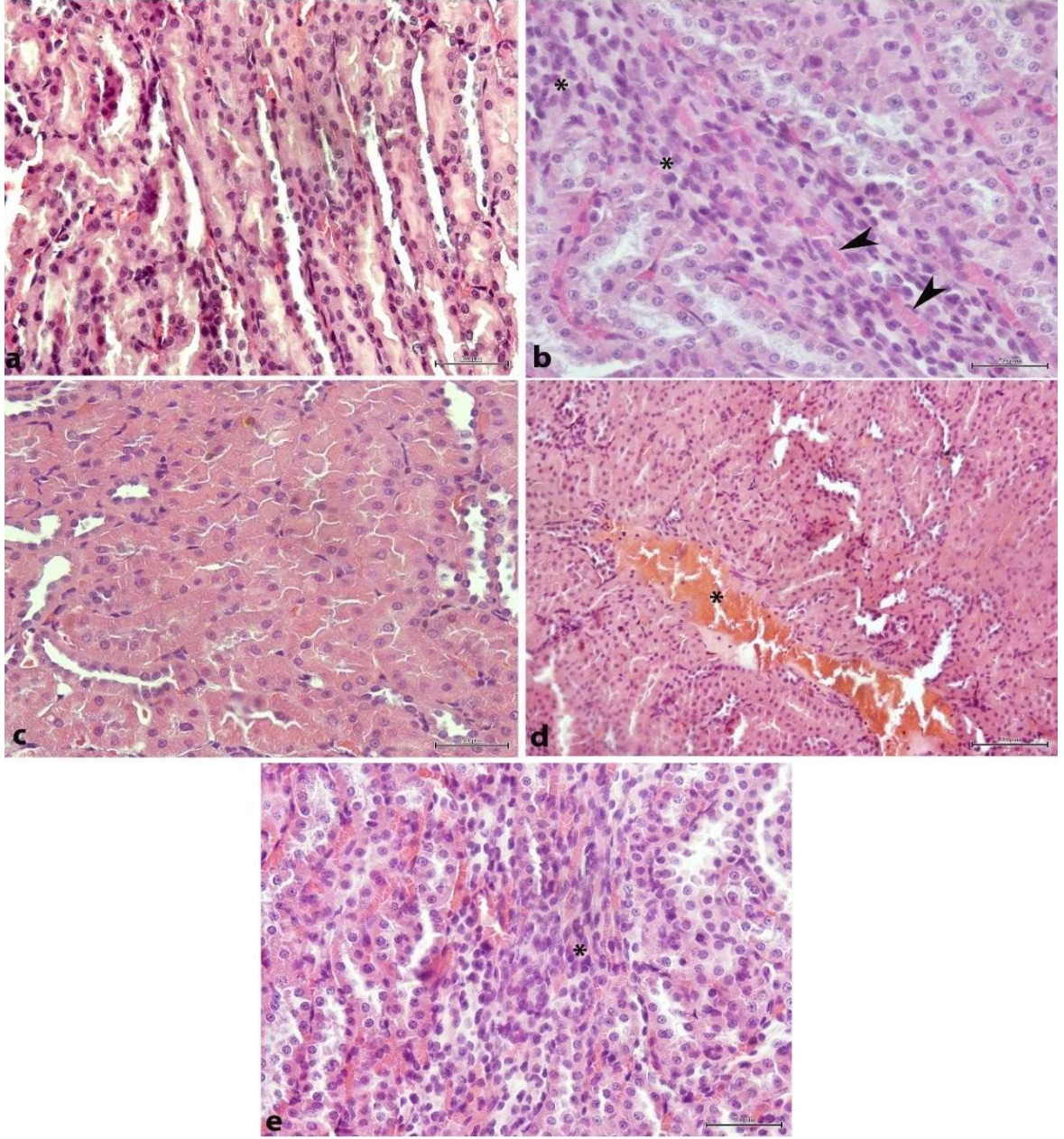
Mononükleer Lenfosit İnfiltrasyonu (resim 5) açısından yapılan incelemede kontrol, Hidroksikolorokin, çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grup arasında farklılık olmadığı ve bu grupların sepsis grubundan anlamlı oranda daha düşük olduğu tespit edildi.

Hemoraji (resim 5) bakımından ise hidroksikolorokin, çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grubun kontrol gurubu ile benzer olduğu belirlenirken, tedavi gruplarından sadece hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grubun sepsis, hidroksikolorokin, çinko gruplarından anlamlı seviyede daha düşük olduğu görüldü.



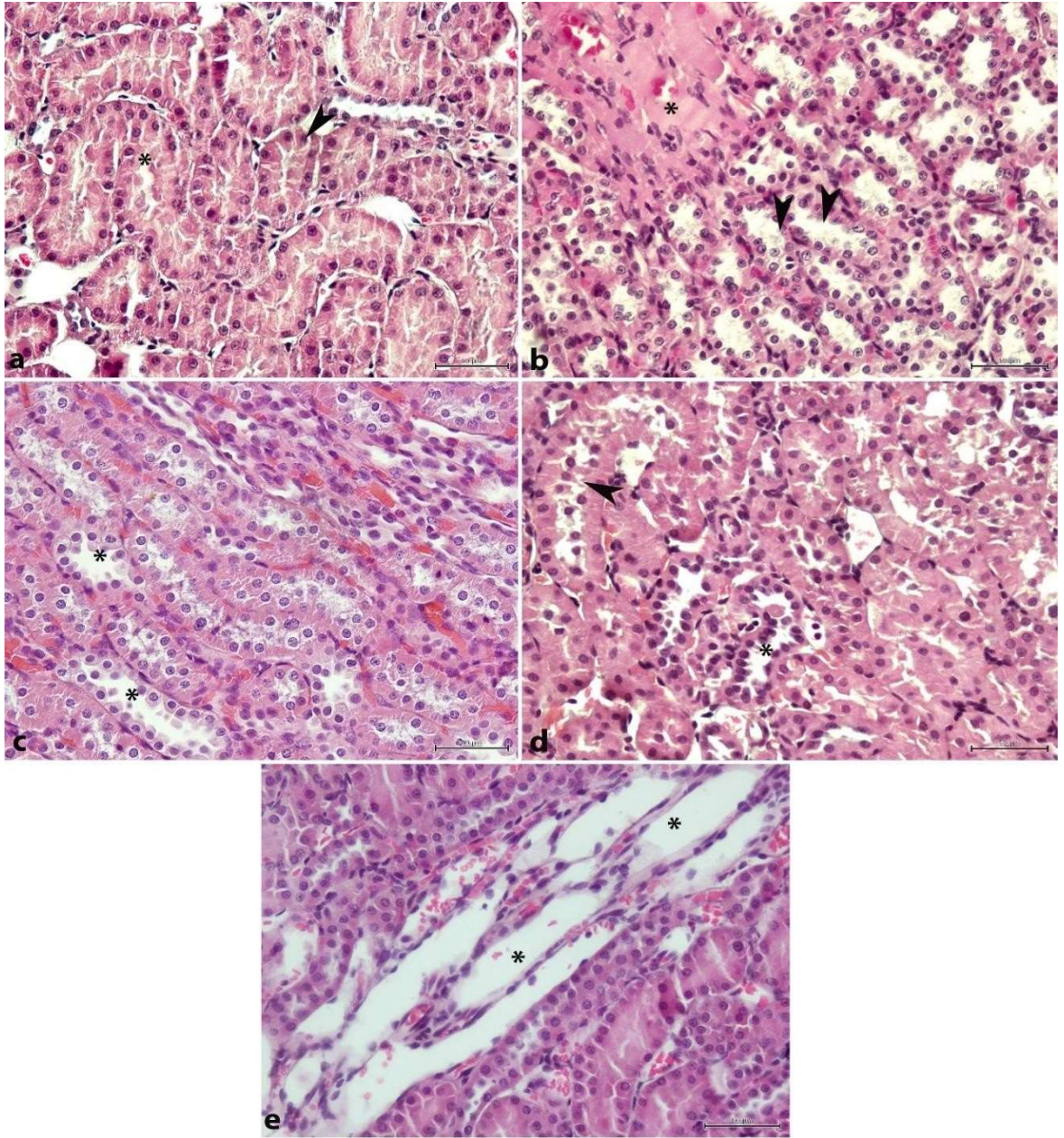
Şekil 4.1. Deney gruplarına ait örnek böbrek glomerüllerinin histolojik mikrografları.

a: kontrol grubundaki H&E boyamalı böbrek glomerülü olup yıldız işareti sağlıklı glomerülü, ok başı ise bowman kapsülünü göstermektedir. *b:* Sepsis grubundaki H&E boyamalı böbrek glomerülünü göstermekte olup yıldız işareti glomerüler atrofiyi ve bowman kapsülü genişlemesini göstermektedir. *c:* Çinko grubundaki H&E boyamalı böbrek glomerülü olup ok başı bowman kapsülü genişlemesini ok işareti ise glomerüler vakuolizasyonu göstermektedir. *d:* Hidroksiklorakin grubundaki H&E boyamalı glomerülü göstermekte olup ok işareti glomerüler vakuolizasyonu yıldız ise glomerüler atrofiyi göstermektedir. *e:* Hidroksiklorokin ile birlikte çinko verilen gruptaki H&E boyamalı böbrek glomerülünü göstermekte olup ok işaretleri vakuolizasyonu, ok başı ise bowman kapsülü genişlemesini göstermektedir.



Şekil 4.2. Deney gruplarına ait örnek böbrek interstisyel dokusunun histolojik mikrografları.

a: Kontrol grubu H&E boyamalı normal böbrek interstisyum dokusu b: Sepsis grubunda H&E boyamalı böbrek dokusunun interstisyumu olup ok başı kanama, yıldız işareti mononükleer infiltrasyonu göstermektedir. c: Çinko grubu H&E boyamalı normal böbrek interstisyumu d: Hidroksiklorokin grubunda H&E boyamalı interstisyumu olup yıldız işareti kanamayı göstermektedir. e: Hidroksiklorokin ile birlikte çinko verilen grubun H&E boyamalı İnterstisyumu olup yıldız işareti mononükleer infiltrasyonu göstermektedir.



Şekil 4.3. Deney gruplarına ait örnek böbrek tübüllerinin histolojik mikrografları.

a: Kontrol grubuna ait H&E boyamalı böbrek dokusuna ait olup yıldız işareti sağlıklı böbrek tübülünü göstermektedir. b: Sepsis grubuna ait H&E boyamalı böbrek tübülü olup yıldız işareti cast formasyonunu ok işaretleri tübüler dilatasyon ve nekrozu göstermektedir. c: Çinko grubuna ait H&E boyamalı böbrek tübülü olup yıldız işareti tübüler dilatasyonu göstermektedir.

Tablo 4.1. H&E boyama sonuçları.

	Tübüler			Glomerüller			İnterstisyel	
	Tubuler Dilatasyon	Tubuloepithelial Necrosis	Cast formasyonu	Glomerülde Vakuolizasyon	Bowman Boşluğunda Artma	Glomerulus Atrofisi	Mononükleer İnfiltrasyon	Hemoraji
Grup 1 Sepsis (Kontrol)	56	23	8	20	39	24	17	31
Grup 2 Sepsis+Çinko	18	3	0	14	3	1	8	13
Grup 3 Sepsis+Hidroksiklorokin	24	6	2	4	18	9	7	21
Grup 4 Sepsis+Çinko+Hidroksiklorokin	22	11	1	29	9	4	7	2
Grup 5 Sham	12	0	3	10	31	5	3	16
Toplam		179			220		125	

Tablo 4.2. PAS boyama sonuçları.

	Tübüler			Glomerüller			İnterstisyel	
	Tubuler Dilatasyon	Tubuloepithelial Necrosis	Cast formasyonu	Glomerülde Vakuolizasyon	Bowman Boşluğunda Artma	Glomerulus Atrofisi	Mononükleer İnfiltrasyon	Hemoraji
Grup 1 Sepsis	38	16	-	-	32	9	-	-
Grup 2 Sepsis+Çinko	21	4	-	-	18	4	-	-
Grup 3 Sepsis+Hidroksiklorokin	11	4	-	4	-	-	-	-
Grup 4 Sepsis+Çinko+Hidroksiklorokin	22	9	-	-	19	5	-	-
Grup 5 Sham	15	2	0	0	16	1	0	0
Toplam		142		108			0	

Oluşturulan Sepsis modelinde tubuloepitelyal nekroz 20 Kat, Mononükleer İnfiltrasyon 11 kat, Tubuler dilatasyon yaklaşık 3,5 kat, Hemoraji yaklaşık 3,5 kat, Tübüler cast oluşumu yaklaşık 2,95 kat, Glomerüller Atrofi yaklaşık 2,9 kat, Glomerüller Vakuolizasyon yaklaşık 2 kat, Glomerül boşluğunda artış yaklaşık %33 kat artmıştır. Bu sonuçlar göre hemoraji ve mononükleer infiltrasyon bulguları inflamasyon olduğunu ve sepsis modelimizin başarılı olduğunu göstermektedir. Tübül ve glomerülleri karşılaştırdığımızda tübüllerin sepsiste öncelikle etkilendiği düşünülmektedir. Tübülün

sepsisten etkilenmeside beklenildiği şekilde olmuş olup, öncelikle tübüler hücreler nekroza uğramış, nekroz sonrasında hücreler öldüğü için tübüller de genişleme ve dilatasyon olmuş ancak tübül tek başına epitel hücresinde oluşmadığı için scaffoldu (yani iskeleti nispeten daha iyi korunmuştur. Ancak cast oluşumundan anlayacağımız üzere iskeleti korunmayan ve yapısı geri dönülmez şekilde bozulan tübüllerde mevcuttur. Septisemide toksin ve mikroorganizmaların ilk temasta bulunduğu yer glomerüllerdir, dekapitasyon süresi göz önüne alındığında inflamasyonun biraz daha geç evresinde glomerüler hasarın histopatolojisi değerlendirmiş gibi gözükmemektedir. Burada beklenen glomerüllerde vakuolizasyon bowman boşluğunun artması ve atrofiydi sonuçlar tam tersini göstermektedir. Sepsisin glomerülleri etkilemesi ile böbrekte hasar olmuş, hayvanlar kurbanı edildiğinde artık sepsisin etkinliği glomerülden tübülusa kaymış gibi görünmektedir. Çinkonun etkinliği hidroksiklorokinde fazla olmuş olup özellikle her üç tedavi şeklide tübüluslardaki irreversible hasarı önlemişlerdir. Bu cast oluşumunun azalmasından anlaşılmaktadır. Glomerüllerdeki Vakuolizasyon, Bowman boşluğunda artma ve atrofi sıralaması en güzel tedavi gruplarımızda görülüyor. Sepsiste olay atrofi boyutundayken Hidroksiklorokin+Çinkoda vakuolizasyon evresinde kalmış tek başına Çinkoda ise bowman boşluğunda artma yaşanmıştır

Glomerüle etkin Tedavi sıramız: Çinko = Çinko + Hidroksiklorokin> Hidroksiklorokin

Tübüle etkinlik sıramız ise tedavide: Çinko> Hidroksiklorokin > Hidroksiklorokin + Çinko şeklindedir.

Her üç tedavide mononükleer infiltrasyonu baskılamış bu da inflamasyonun kontrollü devam etmesini ve hasarın büyümesinin önlenmesini sağlamıştır.

4.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Tablo 4.3. Biyokimyasal parametreler istatistik sonuçları.

Groups	n	Wbc ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	Neutrophils ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	Lymphocytes ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)
Grup 1 Sepsis	6	6.73 $\pm$ 0.86 ^a	2.58 $\pm$ 1.18 ^{ab}	3.13 $\pm$ 0.62 ^a
Grup 2 Sepsis+Çinko	6	3.93 $\pm$ 0.14 ^c	1.58 $\pm$ 0.13 ^{ab}	2.07 $\pm$ 0.17 ^{ab}
Grup 3 Sepsis+Hidroksiklorokin	6	3.67 $\pm$ 0.54 ^c	1.88 $\pm$ 0.55 ^b	1.40 $\pm$ 0.21 ^b
Grup 4 Sepsis+Hidroksiklorokin+Çinko	6	4.58 $\pm$ 0.48 ^{ac}	3.42 $\pm$ 0.46 ^a	1.46 $\pm$ 0.42 ^b
Grup 5 Sham-Kontrol	6	4.20 $\pm$ 0.88 ^c	1.08 $\pm$ 0.25 ^b	2.70 $\pm$ 0.61 ^{ab}
p		* (0.023)	* (0.037)	* (0.039)

Wbc açısından yapılan incelemede sepsis oluşturulan gruptakilerden hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grubun sayısal olarak yüksek olduğu belirlense de aralarındaki farkın anlamlı olmadığı, ancak sepsis grubunun hidrosiklorokin, çinko ve sham gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. Hidrosiklorokin, çinko, hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grup ve Sham grupları arasında ise farklılık bulunmamıştır.

Nötrofil açısından yapılan incelemede Çinko, hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grup ve Sepsis grupları arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenirken, hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grubun sham grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. Ayrıca hidrosiklorokin, çinko, sepsis ve sham grupları arasında da farklılık bulunmamıştır.

Lenfosit açısından yapılan incelemede ise sepsis grubunun hidrosiklorokin ve hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen gruptan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlenirken, çinko, sepsis ve sham grupları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Bununla birlikte hidrosiklorokin grubu, çinko grubu, hidrosiklorokin ile beraber çinko verilen grup ve Sham grupları arasında da istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. Biyokimyasal parametreler istatistik sonuçları.

Gruplar	n	IL-6 ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	PCT ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)
Grup 1-Sepsis	6	95.04 $\pm$ 5.85 ^{ab}	1314.82 $\pm$ 51.90
Grup 2-Çinko	6	68.91 $\pm$ 3.18 ^c	1232.48 $\pm$ 77.41
Grup 3-Hidrosiklorokin	6	67.08 $\pm$ 3.59 ^c	1161.83 $\pm$ 76.88
Grup 4-Hidrosiklorokin+Çinko	6	80.15 $\pm$ 4.07 ^{bc}	1184.08 $\pm$ 63.00
Grup 5-Sham (Kontrol)	6	102.40 $\pm$ 9.25 ^a	1392.93 $\pm$ 68.99
P		*** (0.000)	NS (0.130)

IL-6 açısından yapılan incelemede sepsis ve sham grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi. Sepsis ve hidrosiklorokin ile birlikte çinko verilen grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi. Ancak sepsis grubunun hidrosiklorokin ile birlikte çinko verilen grup arasında, sham grubunun da hidrosiklorokin, çinko ve hidrosiklorokin ile birlikte çinko verilen gruptan anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$).

PCT açısından yapılan incelemede Sepsis ve Sham grubu Hidrosiklorokin, Çinko ve hidrosiklorokin ile birlikte çinko verilen gruptan sayısal olarak yüksek olsa da gruplar arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Histoloji ve biyokimyasal sonuçlara birlikte bakıldığında sepsisin başarılı bir şekilde oluşturulduğu histolojik bulgular ve biyokimyasal parametrelerden wbc, nötrofil ve lökosit artışından anlaşılmaktadır. Ancak biyokimyasal parametrelerden IL-6 ve PCT düzeyleri histolojik bulgular ve diğer biyokimyasal parametrelerden farklı olarak sepsis ve diğer tedavi grupları arasında beklenen istatistiksel anlamlı farklılık göstermemiştir. Histolojik bulgularda tedavi grupları daha az doku hasarına sahip iken PCT düzeyinde gruplar arasında öngörülenden farklı olarak istatistiksel farklılık saptanamamıştır.



Tablo 4.5. Histolojik inceleme istatistik sonuçları.

Grup	n	TubDil ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	TubEpNec ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	Cast ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	GloVac ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	BowBoş ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	GloAtr ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	MonInf ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	Hem ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)
Grup 1 Sepsis	6	7.83±0.84 ^a	3.25±0.41 ^a	1.38±0.32 ^a	3.50±0.46 ^a	5.92±0.57 ^a	2.92±0.60 ^a	2.88±0.40 ^a	4.75±0.90 ^a
Grup 2 Sepsis+Çinko	6	3.25±0.41 ^{bc}	0.58±0.29 ^{bd}	0.00±0.00 ^c	2.57±0.43 ^a	1.75±0.49 ^b	0.42±0.19 ^b	1.14±0.40 ^b	2.86±0.74 ^{ac}
Grup 3 Sepsis+Hidroksiklorokin	6	2.92±0.63 ^{bc}	0.91±0.39 ^{bc}	0.38±0.18 ^{ac}	0.90±0.23 ^b	2.81±0.35 ^{bc}	1.10±0.31 ^{ab}	1.00±0.33 ^b	3.25±0.53 ^{ac}
Grup 4 Sepsis+Çinko+Hidroksiklorokin	6	3.67±0.36 ^b	1.67±0.38 ^{acd}	0.17±0.17 ^c	4.83±0.60 ^a	2.33±0.36 ^{bc}	0.75±0.18 ^b	1.00±0.45 ^b	0.00±0.00 ^b
Grup 5 Sham- Kontrol	6	2.25±0.25 ^c	0.17±0.11 ^b	0.25±0.13 ^{bc}	0.83±0.27 ^b	3.92±0.48 ^{ac}	0.50±0.19 ^b	0.25±0.13 ^b	1.33±0.41 ^{bc}
p		***	***	**	***	***	**	**	***

5. TARTIŞMA

Önemli bir halk sağlığı problemi olan sepsis, her yıl milyonlarca insanı etkilemekte ve insidansı giderek artmaktadır (1). İstatistiksel olarak, küresel sepsis insidansı 10.000 kişide 43,7'dir ve bunların tahminen %70'i ensefalopati, %47,5'i böbrek hasarı ve %37,3'ü septik şok ile komplikedir ve yıllık ölüm oranı %40'tır. Sepsis, enfeksiyöz bir ajana orantısız vücut tepkisinden kaynaklanan organ disfonksiyonunu temsil eder ve en yaygın organ hasarı, %50'ye varan oranda akut böbrek hasarıdır. Bu bilgi ile, Dünya Sağlık Örgütü sepsisi küresel hastalık kontrolü için bir öncelik haline getirdi. Son zamanlarda, sepsis mortalitesinin azaltılmasının yönetimi, genellikle sıvı resüsitasyonu ve antibiyotikler uygulamasıdır, ancak uygun uygulama dozu, tatmin edici olmayan etkinlik ve yüksek ikincil hastalık riski gibi sorunlar da mevcuttur (37).

İntraabdominal sepsisin klinik seyrini yakından taklit eden sıçan çekal ligasyonu ve ponksiyonu (CLP) modeli septik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (38). Çalışmamız da CLP modeli ile oluşturulmuş bir abdominal sepsis modelidir. Çalışmamızda abdomen açılarak çekum perfore edilmiş, sonrasında çekum minimal bir bası ile fekal içeriğin çekum çevresine bulaşması sağlanarak sepsis oluşturulmuştur (10,29,39,39).

Artan bazı güncel kanıtlar, aynı zamanda otofajinin farmakolojik bir inhibitörü olan antiinflamatuvar ve antimalaryal ilaç hidroksiklorokin'in idrar akış hızında, glomerüler filtrasyon hızında ve sodyum atılımında önemli bir uyarıcı olarak böbrek fonksiyonunu etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bazı proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığı ancak non-lizozomotropik mekanizma ile anti-inflamatuvar etki gösterdiği gösterilmiştir. IL-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)-a, hücre adezyon-molekül ekspresyonunda artış, oksidatif stres gelişimi akut böbrek hasarı sırasında meydana gelen değişikliklerden sadece birkaçıdır. Hidroksiklorokin tedavisinin insan monositleri ve T hücrelerinde IL-1 ve IL-6 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bazı yeni araştırmalar, hidroksiklorokin uygulamasının böbrek fonksiyonundaki düşüşü ve tipik serum pro-inflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler TNF-a ve IL-10 üretimini azalttığını göstermektedir. Her şeyden önce, hidroksiklorokin farmakokinetik profili, ilacın böbreğe kolayca ulaştığını varsaymamızı sağlar. Mevcut kanıtlar, sıçanlarda akut veya kronik olarak uygulanan hidroksiklorokin böbrek hücrelerinde birikmesi nedeniyle, böbrek fonksiyonunu etkileyebileceğini düşündürmektedir (40). Son

kanıtlar, hidroksiklorokin lipopolisakkarit (LPS) veya CpG oligonükleotit (CpG ODN) ile stimülasyondan sonra makrofajlar veya monositler tarafından proinflamatuvar sitokin üretimini inhibe ettiğini göstermiştir. İn vivo olarak, hidroksiklorokin proinflamatuvar sitokin salınımını azaltarak fareleri ölümcül LPS veya CpGODN dozlarından korumuştur. Ayrıca, hidroksiklorokin fareleri sepsis kaynaklı akut böbrek hasarından korumuş ve serum inflamatuvar sitokin düzeylerini düşürmüştür (41). Hidroksiklorokin LPS ile indüklenen böbrek hasarındaki nefroprotektif etkileri, inflamatuvar yanıtın inhibisyonuna bağlanabilir. Hidroksiklorokin böbrek hasarının tedavisinde rol oynayabilir, ancak bunu doğrulamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Hidroksiklorokin tedavisi, sıçanlarda doku nekroz faktörü alfa (TNF-a), interlökin-6 (IL-6), IL-18, BUN ve kreatinin değerlerini önemli ölçüde azalttı. Hidroksiklorokin grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, böbrek hasarı olan sıçanlarda yüksek mobilite grubu protein 1 ve böbrek hasarı molekülü-1 seviyelerinde de önemli düşüşler vardı (42).

Çinkonun bağışıklık sistemi için gerekliliği 1960'lardan beri bilinmektedir ve bu bilgi o zamandan beri genişlemektedir. İmmün sistem için önemi çeşitli farklı mekanizmalara dayanmaktadır, bağışıklık sisteminin işlevselliğini ve özellikle enflamatuvar süreçlerde bağışıklık cevabı için esastır. Serum çinko konsantrasyonundaki bir düşüşün de bağışıklık hücrelerinin sayısını ve olgunlaşmasını etkilediği gösterilmiştir. Bir fare çinko eksikliği modeli kullanılarak, lenfopoezin aşağı regülasyonu ve miyelopoezin yukarı regülasyonu bulundu. Bununla birlikte, takviyenin çinko grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yaratmadığı da gözlemlendi. Bunların birçoğunda, sepsis indüksiyonundan önce çinko takviyesi, kontrol grubuna kıyasla daha iyi hayatta kalma, daha düşük serum proinflamatuvar sitokin konsantrasyonları, daha düşük bakteri yükü veya daha iyi pulmoner fonksiyon gibi yararlı etkiler göstermiştir. Sepsisin ayırt edici özelliği olan ve sepsis sırasında konağın enfeksiyona karşı düzenleme bozukluğunda önemli bir faktör olan proinflamatuvar sitokinlerin ve SIRS'nin aşırı üretimi gibi çinko eksikliğinin diğer semptomları da sepsis sırasında bulunmuştur (43). Klinik ve deneysel kanıtlar, çinkonun akut sistemik hastalık veya major cerrahi işlemlerden sonra erken yanıt ve iyileşmede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Sepsis, travma ve hemorajik şoka yanıt olarak plazma çinko seviyeleri düşerken çinko, karaciğer ve dalak gibi metabolik ve immünolojik olarak aktif organlarda birikmektedir. Şiddetli Zn eksikliğinin iyileşmeyi geciktirdiği ve majör cerrahi, peritonit veya sepsis sonrası mortaliteyi arttırdığı iyi bilinmektedir. Bulgularımız, hafif çinko kısıtlamasının dahi lokal doku yaralanması veya manipülasyonuna karşı bölgesel inflamatuvar yanıtları değiştirebildiğini gösterdi. Sitokinlerin dördü ile ilgili olarak, çinko

eksikliği olan diyetle beslenen fareler için sepsisin akut fazında, TNF-a, IL-6 ve IL-10 tepkilerinin amplifikasyonu ile önemli ölçüde farklı tepkiler gözlemlendi (44).

Yaptığımız deneysel çalışmada alınan böbrek preparatlarında incelediğimiz kesitlerden Tubular dilatasyon, Tubular epitelial nekroz, Cast oluşumu, Bowman boşluğu dilatasyonu, Glomerular atrofi, Mononükleer Lenfosit İnfiltrasyonu açısından yapılan incelemede kontrol, Hidroksikolorokin, çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko gruplarının sepsis grubundan beklendiği üzere anlamlı derecede düşük olduğu ($p<0.001$) tespit edilirken, Hidroksikolorokin, çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko grupları arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmedi. Glomerular vakuolasyon açısından yapılan incelemede kontrol ve hidroksiklorokin grupları ile Sepsis, çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko arasında farklılık bulunmamıştır. Tedavi gruplarından sadece hidroksiklorokin grubu sepsis grubundan anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur.

TNF ve IL-6, enfeksiyona karşı immünolojik yanıtın aracıları olarak görev yapan sitokinlerdir ve potansiyel olarak sepsisin biyobelirteçleri olarak yararlı olabilir. Tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökin-6 (IL-6), SIRS üreten üç proinflamatuvar sitokin ve ayrıca C-reaktif protein (CRP), potansiyel biyobelirteçler olarak araştırıldı. IL-6, özellikle otoimmün romatizmal bozuklukların tanı ve tedavisinde potansiyel klinik kullanımları için incelenmiştir. IL-6 sepsis için spesifik değildir, sepsisin bir biyobelirteç olarak rolü tanısal değil prognostik olabilir. Bir dizi çalışma, septik hastalarda artan IL-6 düzeylerinin artan mortalite ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Kemokinler, adaptif bağışıklık sistemini organize etmedeki rolleri nedeniyle biyobelirteç olarak kullanılabilen başka bir sitokin grubudur. Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın yüksek seviyeleri, kemik iliğinde polimorfonükleer lökositlerin (PMN'ler) artan üretimine yol açar. Serum prokalsitonin ve interlökin-6 sepsisin tanısal belirteçleri olarak bildirilmiştir (38).

Lökositler, esas olarak periferik kan mononükleer hücreleri, makrofajla aktive edilen adipositler ve endotelial hücreler potansiyel olarak in vivo tiroid dışı ProCT üretimine katkıda bulunabilir ve enfekte dokuda parankimal hücreleri toplayarak dolaşımdaki ProCT ve NPCT'deki belirgin artışa katkıda bulunabilir. Sepsisin zararlı bir biyobelirteci olarak yararlılığı geniş çapta kabul görmekte ve ProCT ve NPCT'nin proinflamatuvar etkilerinin CALCR/CALCRL üzerindeki etkisiyle ilişkili olabileceği öne sürülse de ProCT'nin inflamatuvar yanıtın bir aracısı olarak tam rolü ve işlevi hala tartışılmaktadır (13). Çalışmamızda hayvanlardan alınan kan örneklerinden çalışılan parametrelerden

Wbc, açısından yapılan incelemede Sepsis oluşturulan gruptakilerden hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grubun sayısal olarak yüksek olduğu belirlense de

aralarındaki farkın anlamlı olmadığı, ancak Sepsis grubunun Hidroksiklorokin, Çinko ve Sham gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. Hidroksiklorokin, Çinko, hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grup ve Sham grupları arasında ise farklılık bulunmamıştır.

Nötrofiller, bakterilerin yayılmasını ve yayılmasını sınırlamada önemli bir rol oynar ve vücudun ilk savunma hattını temsil eder, nd PMN'nin enfeksiyon bölgesine migrasyonu sepsiste enfeksiyonun kontrolünde önemlidir. Periferik kandaki PMN sayısındaki değişiklik de sepsiste önemli bir parametredir (13).

Nötrofil açısından yapılan incelemede Çinko, hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grup ve Sepsis grupları arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenirken, hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grubunun Sham grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. Ayrıca Hidroksiklorokin, Çinko, Sepsis ve Sham grupları arasında da farklılık bulunmamıştır.

Lymphocytes açısından yapılan incelemede ise Sepsis grubunun Hidroksiklorokin ve Hidroksiklorokin+Çinko gruplarından anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlenirken, Çinko, Sepsis ve Sham grupları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Bununla birlikte Hidroksiklorokin, Çinko, hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grup ve Sham grupları arasında da istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Parankimal hücreler (karaciğer, akciğer, böbrek, adipositler ve kas dahil) sepsiste en büyük doku kütlelerini ve dolaşımdaki ProCalcitonin'in başlıca kaynağını sağlar. ProCalcitonin'in enflamatuvar salınımı, doğrudan mikrobiyal toksinler (örn., endotoksin) yoluyla veya dolaylı olarak humoral veya hücre aracılı bir konak cevabı ile (örn., IL-1 β , TNF- α ve IL-6) indüklenebilir. Bununla birlikte, mikrobiyal enfeksiyon altında nöroendokrin olmayan dokularda sentezlenen ProCT'nin işlevi şu anda belirsizdir. Bu mekanizmaların ayrıntıları bilinmemektedir ve sepsiste yüksek konsantrasyonlarda dolaşan NPCT'nin patofizyolojik rolü de dahil olmak üzere daha fazla çalışmayı hak eden birkaç cevaplanmamış soru vardır (13). Sepsiste yükselen CRP, IL-8 ve TNF- α gibi halihazırda kullanılan SIRS belirteçleri, diğer birçok inflamasyon sırasında da yükselir. PCT, sepsisi SIRS'den hızlı ve güvenilir bir şekilde ayırt edebilen değerli bir belirteç gibi görünmektedir (45).

PCT açısından yapılan incelemede Sepsis ve Sham grubu Hidroksiklorokin, Çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grup sayısal olarak yüksek olsa da gruplar arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Yaptığımız çalışmada PCT açısından yaptığımız incelemede tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır. Başta sham ve sepsis grubu olmak üzere anlamlı hiçbir farkın olmaması ticari kit veya biyokimya cihazı ile alakalı teknik sorunları düşündürmektedir.

IL-6 açısından yapılan incelemede Sepsis ve Sham grupları ile Sepsis ve hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi. Ancak Sepsis grubunun Hidroksiklorokin ve Çinko gruplarından, Sham grubunun da Hidroksiklorokin, Çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grubun anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$).

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer biyokimyasal sepsis marker olan IL-6 sonuçlarında yine PCT düzeylerinde olduğu gibi sepsis ve sham grupları arasında anlamlı farklılık saptanamamıştır. Bu durum ön planda ticari kit ve biyokimya cihaz sorunu düşündürmektedir. Diğer gruplarda ise; Sepsis grubunun Hidroksiklorokin ve Çinko gruplarından, Sham grubunun da Hidroksiklorokin, Çinko ve hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen grubundan anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$).

6. SONUÇ

Daha önce yapılan çalışmalarda sepsiste olumlu etkileri gösterilmiş olan hidroksiklorokin ve çinkonun sepsis modelinde beraber verilmesi durumunda hidroksiklorokin çinkonun hücre zarında por oluşturarak hücre içi çinko konsantrasyonunu artırmasına rağmen sepsise bağlı organ hasarında bir değişikliğe yol açmamaktadır.

Çinko, Hidroksiklorokin ve hidroksiklorokin ile beraber çinko verilen gruplardaki tedavilerinin sepsis durumunda böbre organ hasarını önlemede aralarında fark yoktur.



KAYNAKLAR

1. Wang J, Wang H, Zhu R, Liu Q, Fei J, Wang S. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. *Biomaterials*. 2015;53:475-83.
2. Fox RI. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin Arthritis Rheum*. Ekim 1993;23(2 Suppl 1):82-91.
3. Wallace DJ. Antimalarial agents and lupus. *Rheum Dis Clin North Am*. Şubat 1994;20(1):243-63.
4. Ward PA, Bosmann M. A historical perspective on sepsis. *Am J Pathol*. Temmuz 2012;181(1):2-7.
5. Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med*. Ekim 1961;31:532-46.
6. Evans GW. Zinc and its deficiency diseases. *Clin Physiol Biochem*. 1986;4(1):94-8.
7. Prasad AS, Meftah S, Abdallah J, Kaplan J, Brewer GJ, Bach JF, vd. Serum thymulin in human zinc deficiency. *J Clin Invest*. Ekim 1988;82(4):1202-10.
8. King LE, Frentzel JW, Mann JJ, Fraker PJ. Chronic zinc deficiency in mice disrupted T cell lymphopoiesis and erythropoiesis while B cell lymphopoiesis and myelopoiesis were maintained. *J Am Coll Nutr*. Aralık 2005;24(6):494-502.
9. Schrezenmeier E, Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*. Mart 2020;16(3):155-66.
10. Canzoniero LMT, Manzerra P, Sheline CT, Choi DW. Membrane-permeant chelators can attenuate Zn²⁺-induced cortical neuronal death. *Neuropharmacology*. Eylül 2003;45(3):420-8.
11. Fan SL, Miller NS, Lee J, Remick DG. Diagnosing sepsis - The role of laboratory medicine. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 01 Eylül 2016;460:203-10.
12. Perman SM, Goyal M, Gaieski DF. Initial Emergency Department Diagnosis and Management of Adult Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. Aralık 2012;20(1):41.
13. Tavares E, Maldonado R, Miñano FJ. Immunoneutralization of endogenous aminoprocaltitonin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats. *Am J Pathol*. Kasım 2014;184(11):3069-83.
14. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, vd. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. Kasım 2021;47(11):1181-247.
15. Sagy M, Al-Qaqa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2013;43(10):260-3.
16. King LE, Fraker PJ. Zinc Deficiency in Mice Alters Myelopoiesis and Hematopoiesis. *J Nutr*. Kasım 2002;132(11):3301-7.
17. Rosenkranz E, Maywald M, Hilgers RD, Brieger A, Clarner T, Kipp M, vd. Induction of regulatory T cells in Th1-/Th17-driven experimental autoimmune encephalomyelitis by zinc administration. *J Nutr Biochem*. Mart 2016;29:116-23.
18. Kitabayashi C, Fukada T, Kanamoto M, Ohashi W, Hojyo S, Atsumi T, vd. Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. *Int Immunol*. Mayıs 2010;22(5):375-86.
19. Lee H, Kim B, Choi YH, Hwang Y, Kim DH, Cho S, vd. Inhibition of interleukin-1 β -mediated interleukin-1 receptor-associated kinase 4 phosphorylation by zinc leads to repression of memory T helper type 17 response in humans. *Immunology*. Aralık 2015;146(4):645-56.
20. Haase H, Ober-Blöbaum JL, Engelhardt G, Hebel S, Heit A, Heine H, vd. Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 01 Kasım 2008;181(9):6491-502.
21. Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, vd. Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat Immunol*. Eylül 2006;7(9):971-7.

22. Hasan R, Rink L, Haase H. Zinc signals in neutrophil granulocytes are required for the formation of neutrophil extracellular traps. *Innate Immun.* Haziran 2013;19(3):253-64.
23. Kaltenberg J, Plum LM, Ober-Blöbaum JL, Hönscheid A, Rink L, Haase H. Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells. *Eur J Immunol.* Mayıs 2010;40(5):1496-503.
24. Fraker PJ, King LE. A distinct role for apoptosis in the changes in lymphopoiesis and myelopoiesis created by deficiencies in zinc. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* Aralık 2001;15(14):2572-8.
25. Prasad AS. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J Infect Dis.* Eylül 2000;182 Suppl 1:S62-68.
26. King LE, Osati-Ashtiani F, Fraker PJ. Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice. *J Nutr.* Mayıs 2002;132(5):974-9.
27. Beck FW, Prasad AS, Kaplan J, Fitzgerald JT, Brewer GJ. Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans. *Am J Physiol.* Haziran 1997;272(6 Pt 1):E1002-1007.
28. Shukla P, Rao GM, Pandey G, Sharma S, Mittapelly N, Shegokar R, vd. Therapeutic interventions in sepsis: current and anticipated pharmacological agents. *Br J Pharmacol.* Kasım 2014;171(22):5011-31.
29. Ozdemir Kumral ZN, Cumhuri A, Oluk AI, Hoscan A, Onem I, Contuk G, vd. Nesfatin-1 ameliorates sepsis-induced remote organ injury: The role of oxidant-antioxidant status and neutrophils. *Clin Exp Health Sci* [İnternet]. 24 Kasım 2017 [a.yer 31 Mayıs 2023]; Erişim adresi: <http://clinexphealthsci.com/eng/makale/474/96/Full-Text>
30. Waite ME, Tomkovich A, Quinn TL, Schumann AP, Dewberry LS, Totsch SK, vd. Efficacy of Common Analgesics for Postsurgical Pain in Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS.* Temmuz 2015;54(4):420-5.
31. Benyshek DC, Johnston CS, Martin JF. Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. *Diabetologia.* Mayıs 2006;49(5):1117-9.
32. Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, vd. Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat Immunol.* Eylül 2006;7(9):971-7.
33. Koca U, Olguner ÇG, Ergür BU, Altekin E, Taşdoğan A, Duru S, vd. The Effects of Dexmedetomidine on Secondary Acute Lung and Kidney Injuries in the Rat Model of Intra-Abdominal Sepsis. *Sci World J.* 2013;2013:1-11.
34. Mu L, Hu G, Liu J, Chen Y, Cui W, Qiao L. Protective Effects of Naringenin in a Rat Model of Sepsis-Triggered Acute Kidney Injury via Activation of Antioxidant Enzymes and Reduction in Urinary Angiotensinogen. *Med Sci Monit.* 11 Ağustos 2019;25:5986-91.
35. Çavuşoğlu T, Savran Y, Uyanıkgil Y, Gülle K, Acara AÇ, Yiğittürk G, vd. Sepsis Kaynaklı Deneysel Sıçan Böbrek Hasarı Modeli Üzerine Oksitosin Etkisi: Histolojik ve Biyokimyasal Bir Çalışma. *SDÜ Sağlık Bilim Derg.* 26 Nisan 2017;1-1.
36. Başol N, Erbaş O, Çavuşoğlu T, Meral A, Ateş U. Beneficial effects of agomelatine in experimental model of sepsis-related acute kidney injury. *Ulus Travma Ve Acil Cerrahi Derg Turk J Trauma Emerg Surg TJTES.* Mart 2016;22(2):121-6.
37. Li J, Zhao J, Chai Y, Li W, Liu X, Chen Y. Astragalus polysaccharide protects sepsis model rats after cecum ligation and puncture. *Front Bioeng Biotechnol.* 20 Ekim 2022;10:1020300.
38. Zhai X, Yang Z, Zheng G, Yu T, Wang P, Liu X, vd. Lactate as a Potential Biomarker of Sepsis in a Rat Cecal Ligation and Puncture Model. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:1-9.
39. Ding WQ, Yu HJ, Lind SE. Zinc-binding compounds induce cancer cell death via distinct modes of action. *Cancer Lett.* 28 Kasım 2008;271(2):251-9.
40. Todorovic Z, Medic B, Basta-Jovanovic G, Radojevic Skodric S, Stojanovic R, Rovcanin B, vd. Acute Pretreatment with Chloroquine Attenuates Renal I/R Injury in Rats. Ashton N, editör. *PLoS ONE.* 28 Mart 2014;9(3):e92673.
41. Fang H, Liu A, Dahmen U, Dirsch O. Dual role of chloroquine in liver ischemia reperfusion injury: reduction of liver damage in early phase, but aggravation in late phase. *Cell Death Dis.* 27 Haziran 2013;4(6):e694-e694.
42. Zhang SY, Xia HQ, Cui SL. Chloroquine prevents acute kidney injury induced by lipopolysaccharide in rats via inhibition of inflammatory factors. *Trop J Pharm Res.* 04 Ekim 2017;16(9):2149.

43. Coleman JE. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:897-946.
44. Crowell KT, Phillips BE, Kelleher SL, Soybel DI, Lang CH. Immune and metabolic responses in early and late sepsis during mild dietary zinc restriction. *J Surg Res.* Nisan 2017;210:47-58.
45. Carrol ED, Thomson APJ, Hart CA. Procalcitonin as a marker of sepsis. *Int J Antimicrob Agents.* Temmuz 2002;20(1):1-9.

