PLOS ONE

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Düşük bir direkt elektrik sinyali, septik sıçanlarda oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltır

Savas Ustunova[1], Ebru Haciosmanoglu[2], Huri Bulut[3], Birsen Elibol[4], Aysu Kilic[1], Rumeysa Hekimoglu[5], Serkan Tunc[6], Rabia Atmaca[6], Irem Kaygusuz[6], Sevil Tunc[6], Gulcin Beyza Tunc[6], Ismail Meral[1]*

1 Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, **2** Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, **3** İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, **4** Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, **5** Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, **6** AVB Biotech, Istanbul, Türkiye

* imeral@bezmialem.edu.tr

AÇIK ERİŞİM

Alıntı: Ustunova S, Haciosmanoglu E, Bulut H, Elibol B, Kilic A, Hekimoglu R, ve ark. (2021) Düşük bir direkt elektrik sinyali, septik sıçanlarda oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltır. PLoS ONE 16(9): e0257177. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177

Editör: Rosanna Di Paola, Messina Üniversitesi, ITALY

Teslim Alınma Tarihi: 28 Haziran 2021

Kabul edilme Tarihi: 24 Ağustos 2021

Yayınlanma Tarihi: 9 Eylül 2021

Telif Hakkı: © 2021 Ustunova ve ark. Bu, orijinal yazar ve kaynağın belirtilmesi koşuluyla herhangi bir ortamda sınırsız kullanım, dağıtım ve çoğaltmaya izin veren Creative Commons Atıf Lisansı koşulları altında dağıtılan açık erişimli bir makaledir.

Veri Kullanılabilirlik Beyanı: İlgili tüm veriler yüklenen Orjinal ve Destekleyici Bilgi dosyaları içindedir.

Finansman: Bu çalışma AVB Biotech, Barbaros Caddesi, Deluxia Palace, No: 3/40, İstanbul, Türkiye tarafından desteklenmiştir. Finansör araştırma materyallerinin temini ve yazarlar [IK, RA, GBT] için maaş ödemesi şeklinde destek sağladı. ST ve ST, çalışmanın sponsoru ve Dr. Biolyse'i tasarlayıp geliştirdi.

Özet

Bakteri ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalara göre elektriksel uyarımın antimikrobiyal etki gösterdiği ileri sürülmektedir. Bu nedenle septik sıçanlarda elektrifikasyonun, inflamasyon üzerindeki etkilerini araştırdık. Yirmi sekiz erkek Wistar albino sıçan, sağlıklı kontrol (K), elektrik uygulanmış sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektrik uygulanmış sepsis (SE) grupları olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Sepsis modeli oluşturmak için sıçanlara 1 ml medyum içindeki *Staphylococcus aureus* (1 x 10^9 koloni), periton içine enjekte edildi. E ve SE gruplarındaki sıçanlar bakteriyel enfeksiyondan 1 saat ve 6 saat sonra 40 dakika boyunca düşük bir direkelektrik sinyaline (300 Hz ve 2.5 volt) maruz bırakıldı. İkinci elektrik sinyali uygulamasından hemen sonra kanları ve kalp, akciğer ve karaciğer doku örnekleri alındı. Sıçanların kan örneklerinde düşük direk elektrik sinyalinin antibakteriyel etkisi gözlendi. SE grubu ile S grubu karşılaştırıldığı zaman elektrik sinyallerinin dokuların histolojik yapısındaki değişiklikler, kan pH'ı, gazları, viskozitesi ve hücre sayısı, bazı önemli enzimlerin aktiviteleri, oksidatif stres parametreleri, inflamasyon ve doku apoptozunu iyileştirdiği gözlendi. Düşük direkt elektrik sinyali uygulaması, herhangi bir doku hasarı oluşturmadan vücut sıvılarında elektroliz indüksiyonu yaparak septis oluşturulmuş sıçanlar üzerinde antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiler gösterirdi.

Giriş

İnflamasyon, zararlı uyaranlara karşı koruma sağlayan ve birçok organı etkileyen ve uygun şekilde kontrol edilmediği takdirde hastalığın ilerlemesinde rol oynayan karmaşık bir biyolojik süreçtir. Akut inflamatuar yanıt, konak savunmasında kritik öneme sahiptir, ancak tedavi edilmezse birçok hastalıkla bağlı kronik inflamasyona yol açabilir. Vücutta yaygın bir iltihaplanma şekli olan sepsis de bu koşullardan biridir. Sepsis, bağışıklık sisteminin yaralanmaya veya bakteriyel enfeksiyona karşı verdiği olağandışı bir tepki olarak tanımlanır.

AVB Biotech çalışanları; RA, IK ve GBT Dr. Biolyse'nin uygulamasında yer aldılar. Bu yazarların belirli rolleri "yazar katkıları" bölümünde ifade edilmiştir.

Çakışan çıkarlar: Bu çalışma AVB Biotech, Barbaros Caddesi, Deluxia Palace, No: 3/40, İstanbul, Türkiye tarafından desteklenmiştir. ST ve ST, Dr. Biolyse'i tasarlayıp geliştirdi ve RA, IK ve GBT, çalışmanın sponsoru olan AVB Biotech'in çalışanları ve Dr. Biolyse'nin uygulamasına katıldılar. IM ve SU ayrıca Dr. Biolyse için BVU Biotech'in bilimsel danışmanları olarak hizmet vermektedir. Diğer yazarların bildirecek herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Bu beyan, veri ve materyal paylaşımına ilişkin PLOS ONE politikalarına bağlılığımızı değiştirmez.

Sepsisin erken evresinde, makrofajların yüzeyindeki Toll-benzeri reseptörler gibi reseptörler, patojenle ilgili molekülleri tanır; daha sonra sistemik inflamasyonu indüklemek için makrofajlardan tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin-1β (IL-1β) ve IL6 gibi proinflamatuar sitokinler, salgılanır. Bu proinflamatuar sitokinlere ek olarak, sepsisin diğer biyobelirteçlerinden olna C-reaktif protein (CRP) ve prokalsitonin (PCT) düzeyleride artar (ya da yukarı regüle edilir). Sepsisin ilerlemesi sırasında şiddetli sepsis adı verilen yaygın organ disfonksiyonu (akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin) başlar. Son olarak, kardiyovasküler bozukluklar nedeniyle septik şok meydana gelir [1]. Bunun yanında oksidatif stres, proinflamatuar sitokin salgılanmasını uyaran faktörlerden biri olduğu için sepsise bağlı organ disfonksiyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini şiddetlendirir [2]. Bu nedenle, inflamatuar yanıtın ilerleyici organ fonksiyonu kaybına katkıda bulunduğu hastalıklar için yeni terapötik yaklaşımlara acilen ihtiyaç duyulmaktadır [3].

Son yıllarda yan etkilerin daha az olması nedeniyle hastalıkların ilaçsız tedavisi tercih edilmeye başlandı. Örneğin, elektriksel veya manyetik stimülasyon gibi değişen parametrelere sahip fiziksel müdahaleler, akut veya kronik sinir yaralanmaları için olumlu sonuçlar verir. Elektriksel veya manyetik stimülasyonun biyolojik temeli esas olarak protein sentezindeki, iyon kanalı düzenlemesindeki ve büyüme faktörü salgılanmasındaki değişikliklere dayanır [4]. Bu özelliklerden dolayı elektrik akımı tıpta ayrıca ağrı kesici (TENS), inflamasyonu azaltma ve yara iyileşmesi için de kullanılır [5].

Elektrifikasyon, bağışıklık sistemimizi bozarak sağlığımızı bozan patojenleri, virüsleri, bakterileri, parazitleri, mikropları ve mantarları yok etme potansiyeline sahip bir tekniktir [6, 7]. Daha önce, elektrifikasyonun su, süt ve bakteri ve hücre kültürleri üzerindeki antimikrobiyal etkileri *in vitro* olarak gösterilmiştir [8, 9]. Ek olarak, edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) virüslerinin çoğu, *in vitro* olarak çok düşük bir elektrik akımına maruz kaldıktan sonra bulaşıcı özelliklerini kaybeder [10]. Kan ardı ardına elektrik akımına maruz kaldığı zaman, kan hücrelerine zarar vermeden AIDS ve hepatit virüsleri neredeyse saptanamaz hale gelir. Daha sonra, elektrotlar kan damarı yollarına yerleştirilerek ve çok düşük bir elektrik akımına maruz bırakılrak insanlarda da aynı etki elde edilmiştir [11]. Böyle bir protokol geliştirilmiş olmasına rağmen, ilginç bir şekilde, elektrik stimülasyonu üzerinde bugüne kadar yara iyileşmesi dışında hiçbir *in vivo* çalışma yapılmamıştır. Bu yara iyileştirme çalışmalarında, insanlarda elektrik stimülasyonunun ardından enfekte yaralarda bakteriyel inhibisyon tespit edilmiştir. [12–14]. Elektrik stimülasyonu, enfekte yaralar üzerinde antibakteriyel etkisini doğrudan veya dolaylı olarak yapsada, kesin mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Doğrudan etki, elektrik akımının bakteri zarının bütünlüğünü bozması veya elektrik uyarısının antibakteriyel etkilerinin en olası nedeni olan bakteri hücre yüzeyi üzerindeki moleküllerin elektrolizini indüklemesi nedeniyle ortaya çıkabilir [15, 16]. Sıcaklık ve pH değişiklikleri de elektrik stimülasyonunun dolaylı etkileri olabilir [17, 18]. Bununla birlikte, bu değişiklikler elektriksel stimülasyonun antibakteriyel etkilerinin birincil nedeni olmayabilir [14]. Bu yüzden, mevcut çalışma, sıçan bakteriyel sepsis modelinde düşük doğrudan elektrik sinyalinin inflamatuvar yanıt, kan bakteri sayısı, pH, gazlar, viskozite, hücre sayısı, bazı biyokimyasal parametreler, oksidatif stres ve doku hasarı üzerindeki *in vivo* etkilerini araştırmak için tasarlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Bakteri süspansiyonunun hazırlanması

Analizlerde ticari olarak temin edilen *Staphylococcus aureus* standart suşu (ATCC-10390) kullanıldı. -20°C'de liyofilize olarak saklanan suşlardan, enjeksiyonlardan önce pasajlar alınarak uygun sürelerde inkübasyon gerçekleştirildi. Standart suşlarda, herhangi bir kontaminasyon veya yapısal bir değişikliğin meydana gelmediğinden emin olunması amacıyla, VITEK 2 Compact 30 otomatik mikro tanımlama sistemi ve VITEK MS kütle

spektrofotometresi (bioMérieux, Lyon, France) kullanılarak, belli zaman aralıkları ile tanımlama (identifikasyon) yapıldı. Tanımlama sonucunda suşların %99,9 oranında benzerlik gösterdiği saptandı. Ayrıca, standart suşun mutasyona uğramaması ve patojenitesini kaybetmemesi amacıyla her zaman yalnızca ilk pasajlardan elde edilen bakteriler kullanıldı. Standart *Staphylococcus aureus* suşlarının deney esnasında, üremelerinin logaritmik fazında olmasına gayret edildi. Bu nedenle suşların pasajı, enjeksiyondan 18-24 saat önce alındı ve bu süre boyunca 37°C'lik etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında DensiCHEK plus (bioMérieux, Lyon, France) cihazı kullanılarak, uygun yoğunlukta bakteri süspansiyonu McFarland bulanıklık sistemine göre hazırlandı ($1x10^9$ KOB KOB/ml). Süspansiyonların hazırlanmasında steril ACILA®LAL Reagent Water (LRW, Opelstrassee 14, Mörfelden-Walldorf, Germany) kullanıldı. Hazırlanan süspansiyonlar steril koşullar altında 1 ml'lik enjektörlere çekilerek uygulamaya hazır hale getirildi. Deney sonunda, sepsis modelimizin güvenilirliliğinin belirlenmesi amacıyla kan örneklerinde kültür metodu kullanılarak mikrobiyolojik incelemeler yapıldı.

Kültüre Edilebilir Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Bakteri enjeksiyonundan 1 ve 6 saat sonra toplanan kan örnekleri (100 µl), 10 ml'lik ticari TSB tüplerinde (BD, BBL Trypticase Soy Broth, Franklin Lakes, New Jersey, ABD) 3 saat ön zenginleştirilmeye bırakıldı. 3 saatin sonunda 100 µl solüsyon üç farklı Mannitol Salt Agar plakasının (Merck-Millipore, Darmstadt, Almanya) yüzeyinin merkezine yayma plaka yöntemi kullanılarak pipetlendi. Plakalar 37°C'de 72 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda plakalarda koloni oluşturan birimler sayıldı ve ortalama sonuçlar istatistiksel analiz için kullanıldı.

Elektrik akımını uygulamak için kullanılan cihaz

Yeni geliştirilen bu düşük elektrik sinyali uygulama cihazı (Dr. Biolyse), vücut sıvılarındaki kimyasalları ayrıştırmak için kullanılabilen bir elektron hızlandırıcıdır (Türk Patent Enstitüsü patent başvuru numaraları: 2021/006002, 2020/08818, 2020/14753 ve 2020/14781). Cihazın prensibi, elektrik sinyalinin sağladığı enerji ile moleküllerin parçalanması ve ortama verilen elektronlardan yeni moleküllerin oluşmasıdır. Vücut sıvılarında, moleküler bağları birbirine yakın olan ve uyarılma sonucu kolayca ayrılıp birleşebilen 3 tip bileşik tespit edilmiştir: su (H_2O), sodyum klorid (NaCl) ve potasyum klorür (KCl). Bu yüzden, bu deneyden önce, vücut sıvılarında bu bileşiklerin gerekli bozunması ve yukarıda bahsedilen kimyasallardan yeni bileşiklerin oluşumunun, vücut ısısını artırmadan düşük doğrudan elektrik sinyaline maruz kalma (elektroliz) ile indüklenen enerji ve elektron transferi ile sağlayabileceği varsayılmıştı. Bu hipotezi, *in vitro* olarak izotonik tuzlu su çözeltisine düşük doğrudan elektrik sinyali uygulayarak test ettik ve böylece elektronun yörüngeden kopacağı hıza göre ortalama dönüş hızını rezonansa sokarak ayrılmayı kolaylaştırmak için kovalent bağlarda yaygın olarak kullanılan elektronların yörünge hızını arttırdı. Bu yöntem kullanılarak elektronun ayrışmadan sonraki yaklaşık hızı olan 300.000 km/sn hıza ulaşması için 300 Hz frekansında düşük bir doğrudan elektrik sinyali uygulanarak yüksek verimli ayırma sağlanmıştır. Böylece H2O hidrojen (H) ve hidroksil (OH) iyonlarına, NaCl sodyum (Na) ve klorür (Cl) iyonlarına ayrıştı. Reaksiyon devam ederken ortamda sodyum hidroksit (NaOH), H ve Cl oluştu. NaOH oluşumu belli bir seviyeye ulaştıktan hemen sonra hipokloröz asit (HOCl, zayıf asit) oluşumu meydana geldi.

Bu sonuçlara göre sistem belirli periyotlarda hızlı bir şekilde dengelenmiştir. Dengeleme reaksiyonu, $NaOH + HOCl \longrightarrow NaCl + H_2O + O$ idi.

Bu çalışmada, elektrik sinyaline maruz kalan sıçan vücutlarının ürettiği direnci ölçmek için akciğere ve sırta, karın ve sırta iki çift karbon elektrot yerleştirildi.

Sıçanların vücut direnci standart bir direkt elektrik sinyali uygulanarak ölçüldüğünde 135.000–150.000 Ohm arasında değişiyordu. Bu direkt elektrik sinyalinin sürekli uygulanması hücreler üzerinde oluşturacağı yük nedeniyle zamanla doku hasarına neden olacaktı. Ancak doğrudan elektrik sinyali özelliğine sahip kare dalga frekansına sahip olan Dr. Biolyse cihazı ile ölçüldüğünde 300 Hz frekansında vücut direnci 2.700–3.300 Ohm aralığındaydı. 300 Hz'lik bu frekans, H2O, NaCl ve KCl üzerinde en verimli rezonansı sağlayarak moleküler ayrışma en hızlı seviyede gerçekleştiği için ön *in vitro* deneyimize göre seçilmiştir. Bu frekans ayarı ile elektrik sinyalinin dokularla teması en aza indirilmiş ve vücut sıvılarına uygulanan akım arttırılmıştır. Bu nedenle elektrik sinyali vücut dokuları üzerinden çok az dirençle hedef sıvı ortamına ulaşmıştır. Cihaz kendini yazılımla sınırlar (Şekil 1).

Şekil 1. Dr. Biolyse. Sıçanlar, yeni geliştirilen Dr. Biolyse cihazı kullanılarak düşük bir elektrik sinyaline maruz bırakıldı.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g001

Hayvanlar ve sepsis indüksiyonu

Power analizi sonucunda (ortalama 10 birim fark ve %80 güç ve %95 güven seviyesinde 5 birim standart sapma), her grup için en az 7 sıçanın gerekli olduğu tespit edildi. Bu nedenle, bu çalışmada 250-300 gram ağırlığındaki 28 erkek Wistar albino sıçanı kullanıldı. Sıçanlar, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edildi ve standart sıcaklık (25 ± 1˚C), nem (%50 - 60) ve karanlık-aydınlık koşullarında (12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü) barındırıldı ve *ad libitum* ile beslendi.

Bu çalışma, Ulusal Sağlık Enstitüleri Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Kılavuzundaki tavsiyelere sıkı sıkıya bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma protokolü Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 28.09.2020, No: 2020/145). Tüm ameliyatlar ketamin ve ksilazin anestezisi altında yapıldı ve acıyı en aza indirmek için her türlü çaba gösterildi.

Sıçanlar 4 gruba ayrıldı: sağlıklı kontrol (C), elektrik uygulanmış sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektrik uygulanmış sepsis (SE) grubu. Deneyden önce, elektrot yerleştirmek için sıçanların karın ve sırt bölgeleri elektrikli ustura ile tıraş edildi. S ve SE gruplarında sepsisi indüklemek için hayvanlara 1 ml LRW içinde *Staphylococcus aureus* (1 x 10^9 CFU) (i.p.) uygulandı. C ve E gruplarına *Staphylococcus aureus* aracı yerine 1 ml LRW enjekte edildi. [19]. Sepsis oluşumu, bakteri veya LRW enjeksiyonlarından 1 saat sonra izofluran ile anestezi uygulanan sıçanların jugular venlerinden alınan 100 μl kanın bakteri kültürü ile doğrulandı. (Şekil 2).

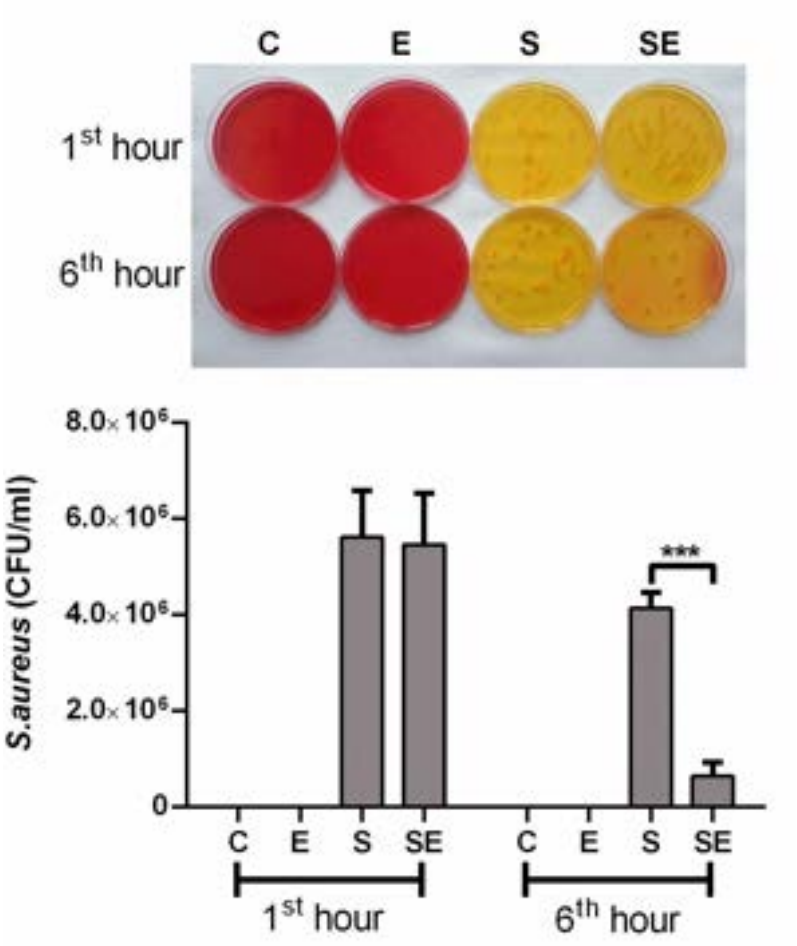
Vücut sıvılarının elektrolizi için elektrik sinyali vücuttan geçecek şekilde düşük direkt elektrik sinyali (300 Hz ve 2,5 volt) uygulamak için sıçanların göğüs ve karın bölgelerine pozitif elektrotlar, göğüs ve karın arka taraflarına negatif elektrotlar yerleştirildi. Elektrotlar, sıçanların sırtına ve karnına, vücudu tamamen saran bir flaster ile sabitlendi (Şekil 1). E ve SE gruplarındaki sıçanlara bakteri enjeksiyonundan 1 ve 6 saat sonra 40 dakika süreyle elektrik sinyali uygulandı. Elektrotlar, C ve S gruplarındaki sıçanların aynı bölgelerine herhangi bir elektrik sinyali uygulanmadan 40 dakika süreyle yerleştirildi. Bu sürenin sonunda sıçanlara ketamin-ksilazin (K, 100 mg/kg; X, 10 mg/kg, intraperitoneal) ile anestezi uygulandı ve hayvanlar derin uykudayken kardiyak kan örnekleri alındı. Daha sonra sıçanlar hala anestezi altındayken giyotin ile dekapite edildi ve ileri çalışmalar için doku örnekleri alındı.

Histopatolojik inceleme

Alınan dokular, ışık mikroskobu için %10 tamponlu formaldehit ile fikse edildi. Tamponlu formaldehit içinde saklanan numuneler, sabit vakumlu bir doku takip cihazında (Leica TP 1020, Almanya) takip edildi. Dokular parafine gömüldü. Üç-beş mikrometre kalınlığında kesitler alındıve ardından histopatolojik inceleme için hematoksilen-eozin ile boyandı. Her kesit, X10, X20 ve X40'lık objektiflerkullanılarak çift körlü olacak şekilde iki histolog tarafından bağımsız olarak değerlendirildi. Görüntüler Nikon marka dijital kamera (Eclipse 920248, ABD) kullanılarak çekildi.

Tam kan ölçümleri

Tam kan hücresi sayımı, bir hematoloji analizörü (Abacus junior vet, Budapeşte, Macaristan) kullanılarak ölçüldü. Kan gazları ve pH, bir kan gazı analizörü (ABL90 FLEX, Bronshoj, Danimarka) kullanılarak ölçüldü. Tam kan viskozitesi ve kayma gerilimi, bir Wells-Brookfield koni plakalı viskozimetre (DV3TLVCJ0, ABD) kullanılarak 1.500 s-1 kesme hızında ölçüldü. Tüm viskozite ölçümleri 37°C'de yapıldı.



Şekil 2. Deneyler sırasında ölçülen bakteri sayısı. Sağlıklı kontrol (C), elektrik verilmiş sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektriklenmiş sepsis (SE) gruplarının (n = 7) bakteri sayıları. ***; p<0,001 S grubuna göre istatistiksel olarak önemli fark.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g002

Biyokimyasal analiz

Numunelerin işlenmesi: Kan örnekleri, serum süpernatantını elde etmek için 3.000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Serum ve doku örnekleri deney gününe kadar -80˚C'de saklandı. Doku örnekleri, homojenizatör (Fast prep-24, MP Biomedical, ABD) kullanılarak PBS (fosfat tamponlu salin, pH: 7.4) içinde homojenize edildi.

Analiz: Serum örneklerinde kolesterol, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), lipaz ve total protein (TP) düzeyleri yarı otomatik biyokimyasal analizör (IDEXX Vettest, IDEXX Laboratories, Inc., ABD) ile ölçüldü. ALT, AST, lipaz, kolesterol ve TP kitleri için saptama aralıkları sırasıyla 20-161 U/L, 39-111 U/L, 10-150 U/L, 20-92 mg/dl ve 5,3 - 6,9 g/dl idi.

Oksidatif stres parametrelerinin analizi

Süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeylerinin ölçümesi: SOD, MDA ve GSH seviyeleri, ticari olarak temin edilebilen ELISA bazlı kitler ile ölçüldü (SOD için, Elabscience Co., ABD; MDA için, Mybiosource Co., ABD; GSH Elabscience Co., ABD için).

Kısaca, standartlar ve numuneler bir monoklonal antikorla kaplanmış mikro plakalara pipetlendi ve inkübe edildi. Bütün kuyucuklara biotin eklendi ve bağlanmayı indüklemek için streptavidin-HRP pipetlendi. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış reaktifleri çıkarmak için 4 yıkama yapıldı. A ve B kromojen solüsyonları eklendikten sonra stop solüsyonu eklendi ve ortaya çıkan optik yoğunluk bir plak okuyucu (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX çok modlu mikroplaka okuyucu, ABD) kullanılarak 450 nm'de ölçüldü. Kitlerin saptama aralığı SOD için 0.16-10 ng/ml, MDA için 0-1000 ng/ml ve GSH için 2-400 μmol/l arasındaydı.

Total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) ölçümleri: Kan ve doku numunelerindeki TAS seviyeleri, bir spektrofotometrik yöntemle (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX multimode mikroplaka okuyucu, ABD) ticari bir kit (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Kısaca, örneklerdeki antioksidanlar, koyu mavi yeşil 2,20-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) radikalini ABTS'nin renksiz indirgenmiş formuna indirgemiştir. 660 nm'de absorbanstaki değişiklik numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilgilidir. Toplam antioksidan aktiviteleri örneklerin mmol Trolox eşdeğeri/L olarak rapor edildi.

Numunelerdeki TOS seviyeleri, ticari bir kit (Assay Rel Diagnostics, Türkiye) ve spektrofotometre (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX çok modlu mikroplaka okuyucu, ABD) kullanılarak ölçüldü. Kısaca, numunelerde bulunan oksidanlar, demir iyonları şelatör kompleksini demir iyonlarına oksitledi. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan arttırıcı moleküller tarafından uzatılırken, ferrik iyon, asidik bir ortamda kromojen ile bir renk kompleksi oluşturmuştur. Oluşan rengin yoğunluğu, numunelerde bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Sonuçlar μm H2O2 eşdeğeri/L olarak rapor edilir.

Multipleks ELISA kullanarak inflamasyon parametrelerinin ölçümü

Serum numunelerindeki inflamasyon parametreleri, ticari olarak elde edilen bir inflamasyon paneli (Bio–Rad, Bioplex Sıçan sitokin pleks testi, ABD) ile ölçüldü. Panelde 30 parametre mevcut idi. Test, üreticinin tavsiyelerine göre kuruldu. Kısaca, numuneler 96 kuyucuklu bir plaka içinde antikora bağlı manyetik çubuklarla karıştırıldı ve gece boyunca 4°C'de çalkalanarak inkübe edildi. Soğuk ve oda sıcaklığında inkübasyon adımları, 500-600 x rpm'de bir orbital çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi. Mikroplaka, yıkama tamponu ile iki kez yıkandı. Biyotinlenmiş saptama antikoru ile oda sıcaklığında 1 saatlik bir inkübasyondan sonra streptavidin eklendi. Plaka yıkandı ve numune başına 50 çubuk alt limiti ile PBS eklendi. Okuma, bir Bio-Plex 200 cihazında (Bio–Rad, ABD) yapıldı.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS–PAGE) ve Western blot analizi

Dokular çözdürüldükten sonra (yaklaşık 100 mg) parçalara ayrıldı ve proteaz inhibitör kokteyli içeren 500 μl soğuk RIPA tamponunda (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, ABD) homojenizatör kullanılarak 30/s hızında 10 dakika homojenize edildi. Homojenattaki kalıntı ve çekirdekleri uzaklaştırmak için, 4°C'de 15 dakika 700 x g'de santrifüjlendi, süpernatantlar 1.5 ml'lik tüplerde toplandı. Numuneler sonraki deneylere kadar -80˚C'de saklandı.

Dokuların süpernatanları denatüre edildi ve %12 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeli üzerinde ayrıldı. Proteinler (20 μg) bir polivinil diflorür membrana (Bio–Rad, Hercules, CA, ABD) aktarıldı. Membran, %0,1 Tween 20 (TBST) içeren Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris)-tamponlu salin içinde %5 yağsız süt tozu (Bio– Rad, Hercules, CA, ABD) ile 1 saat süreyle bloke edildi. Membranlar daha sonra primer antikorlarla (IL-1β, TNF-α, Bax, Bcl-2, tubulin ve β-aktin (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, ABD)) 4°C'de gece boyunca immünoblot edildi.

Membranlar, TBST çözeltisi ile üç yıkamadan sonra, oda sıcaklığında 1 saat boyunca yaban turpu peroksidaz (HRP)-konjuge sekonder antikorları (keçi anti-tavşan immünoglobulin G (IgG) HRP ve keçi anti-fare IgG HRP (Hücre Sinyali, Danvers, Massachusetts, ABD)) ile inkübe edildi. Western blotlar, ECL reaktifleri (Elabscience, Houston, Texas, ABD) ile muamele edildi ve görüntüler Fusion FX7 sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) ile elde edildi. Bant yoğunluğu, ImageJ yazılımı (Ulusal Sağlık Enstitüleri, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

Grup ortalamaları ± standart sapmalar (SD) tüm değerlerden hesaplandı. Verilerin normalliğini test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA ile, normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Gruplar arasındaki post hoc karşılaştırmalar, GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Prism sürüm 6 Yazılım Programı San Diego, CA) kullanılarak Bonferroni ve Dunn testleri ile yapıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Sonuçlar

Kandaki kültürlenebilir bakteri sayısı

LRW veya *Staphylococcus aureus* enjeksiyonundan bir saat sonra, elektrik sinyali uygulamasından hemen önce, C ve E gruplarının kanında bakteri üremesi gözlenmezken, S ve SE gruplarının kanında yoğun bakteri üremesi tespit edildi ve bu iki grupta bakteriyemiyi gösterdi. Bakteri enjeksiyonundan 1 ve 6 saat sonra yapılan 40 dakikalık elektrik sinyali uygulaması SE grubunda bakteriyemiyi S grubuna göre önemli ölçüde azalttı ($P<0.001$) (Şekil 2). SE grubunda halen hafif bakteriyemi izlendi.

Doku histolojisi

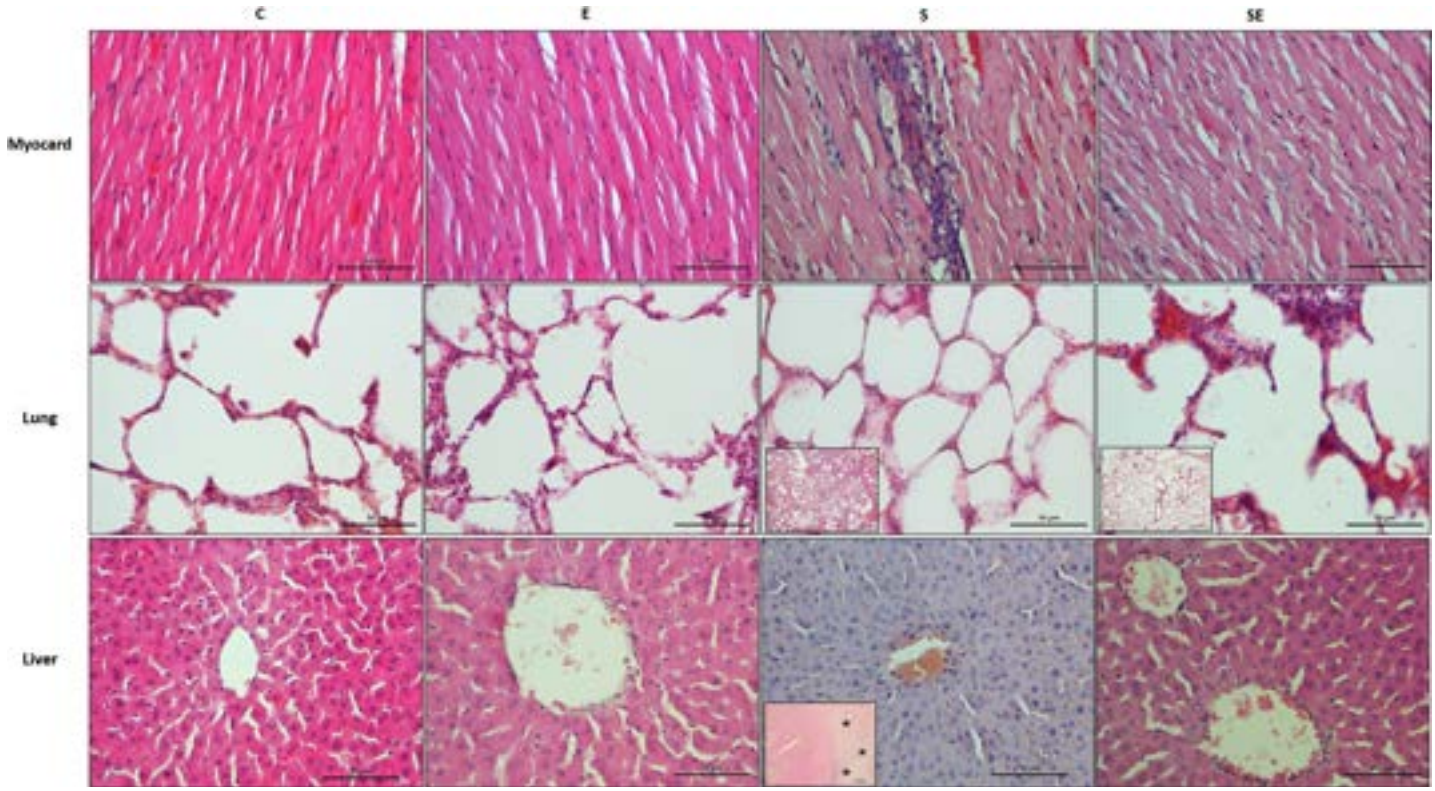
Gruplara ait histolojik sonuçlar Şekil 3'te gösterilmiştir. S grubunun miyokardında inflamasyon gözlenirken SE grubunun miyokardında inflamasyon gözlenmedi. S grubu dışındaki tüm gruplar normal histolojik yapılara sahipti. S grubunda miyokardiyal lif demetleri gevşek bir şekilde düzenlenmişti ve bazı miyokardiyal lifler nekrotikti.

Akciğer kesitleri incelendiğinde ne C ne de E gruplarının pulmoner histolojik değişiklik göstermediği ortaya çıktı. S grubunda inflamatuar hücre infiltrasyonu gözlendi. SE grubunda da inflamasyon saptandı ancak S grubuna göre çok daha azdı. Ayrıca, SE grubunda konjesyon diğer tüm gruplara göre daha fazlaydı.

Karaciğer dokularında ise hiçbir grupta inflamatuar hücre infiltrasyonunda artış gözlenmedi. S grubu dışındaki tüm gruplar normal histolojik yapıya sahipti. Ancak sinüzoidler fiksasyon nedeniyle tüm gruplarda biraz daha genişti. S grubu dokularında nekroz alanları gözlendi.

Kan parametrelerindeki değişiklikler

C grubu ile karşılaştırıldığında, pH, oksijen satürasyonu (sO_2) ve beyaz kan hücresi (WBC) sayısı, S grubunda önemli ölçüde daha düşüktü ($p<0.05$—$p<0.001$) ve parsiyel karbondioksit, kırmızı kan hücresi (RBC) sayısı, hemoglobin (HB) düzeyi, hematokrit yüzdesi (% HCT), kan viskozitesi ve kayma gerilim düzeyleri önemli ölçüde daha yüksekti ($p<0.05$—$p<0.001$). Ancak S grubunda meydana gelen değişikliklerin hiçbiri SE grubunda gözlenmedi (Şekil 4-7). Trombosit (PLT) sayıları, monosit yüzdesi veya pO_2'de gruplar arasında anlamlı fark ($p>0.05$) gözlenmedi. Ek olarak, lenfosit yüzdesi önemli ölçüde arttı.



Şekil 3. Dr. Biolyse tedavisi sonrası elde edilen histolojik sonuçlar. X400 büyütmede sağlıklı kontrol (C), elektrik verilmiş sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektrikli sepsis (SE) gruplarından kesitlerde hematoksilen & eozin boyama görüntüleri. Ekler, S ve SE gruplarının akciğer dokularını düşük büyütmede gösterir. Burada inflamasyon S grubunda SE grubuna göre daha fazlaydı (HE X10). S grubuna ait karaciğer kesitresimlerinde bulunan iç kısımlardaki yıldızlar nekrotik karaciğer dokusunu göstermektedir (HE X10).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g003

($p<0.05$), ve granülosit yüzdesi ve RBC sayısı, C grubuna kıyasla E grubunda önemli ölçüde azaldı (sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.05$).

Biyokimyasal kan ölçümleri

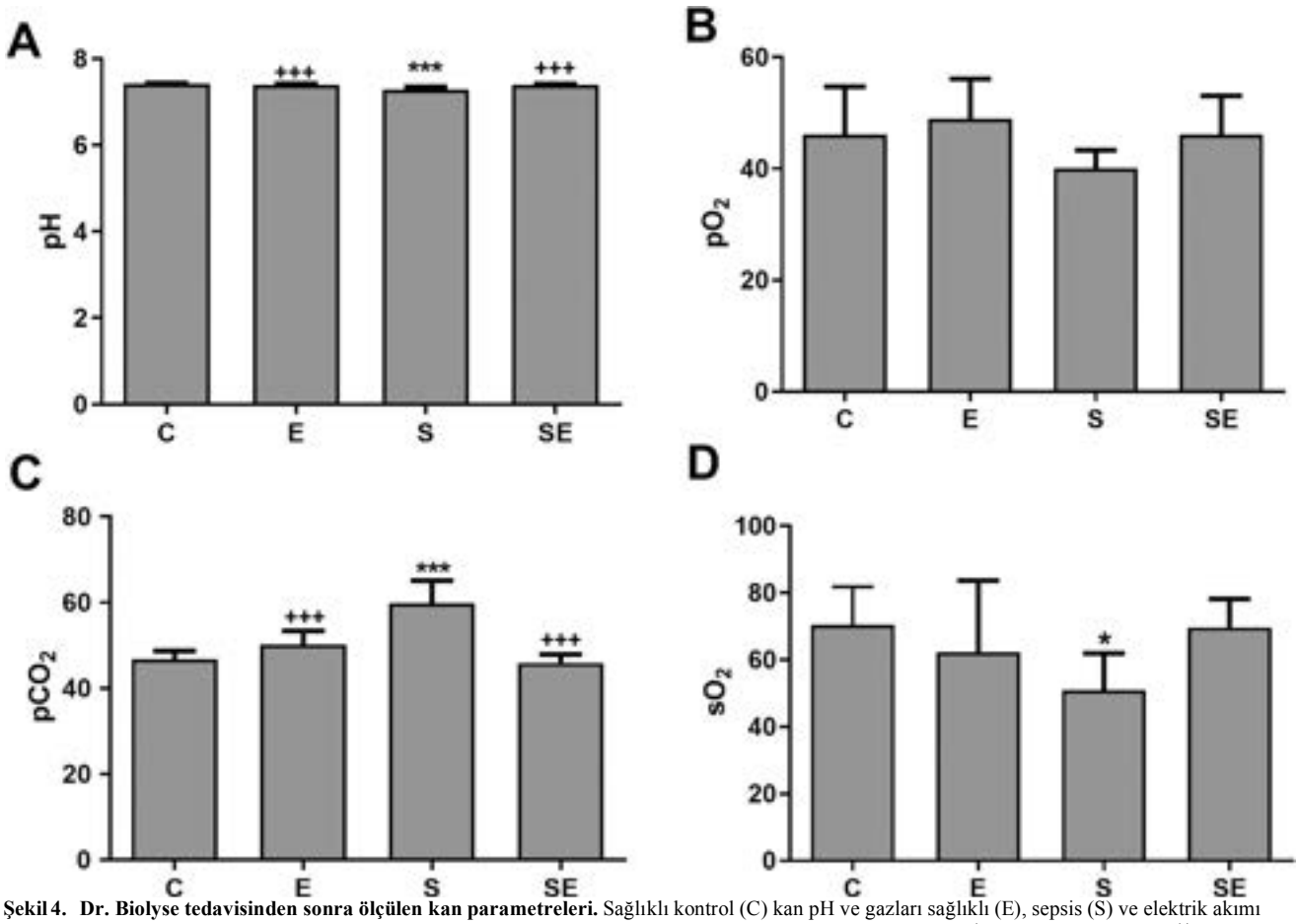
C grubu ile karşılaştırıldığında, S grubunda ALT ve AST serum düzeyleri ile lipaz aktivitesi önemli ölçüde yüksek iken (sırasıyla, $p<0.01$, $p<0.01$ ve $p<0.001$), TP düzeyi önemli ölçüde düşüktü ($p<0.01$). Ancak S grubunda meydana gelen değişikliklerin hiçbiri SE grubunda gözlenmedi. (Tablo 1).

Oksidatif stres analizi

C grubu ile karşılaştırıldığında, S grubunda TOS ve MDA'nın kan ve doku düzeyleri önemli ölçüde yüksekken ($p<0,001$), TAS ve GSH düzeyleri ve SOD aktivitesi ise önemli ölçüde daha düşüktü ($p<0,001$). Ancak S grubunda meydana gelen değişikliklerin hiçbiri SE grubunda gözlenmedi. (Tablo 1).

Kandaki sitokin düzeylerinin analizi

Serum inflamasyon belirteçleri Tablo 2'de gösterilmektedir. IL-5, IL-13 ve MIP-3α hariç incelenen tüm interlökinlerin (IL'ler) ve makrofaj inflamatuar proteinlerinin (MIP'ler) seviyeleri, C grubuna kıyasla S grubunda önemli ölçüde arttı ($p<0,05$ –$p<0,001$).



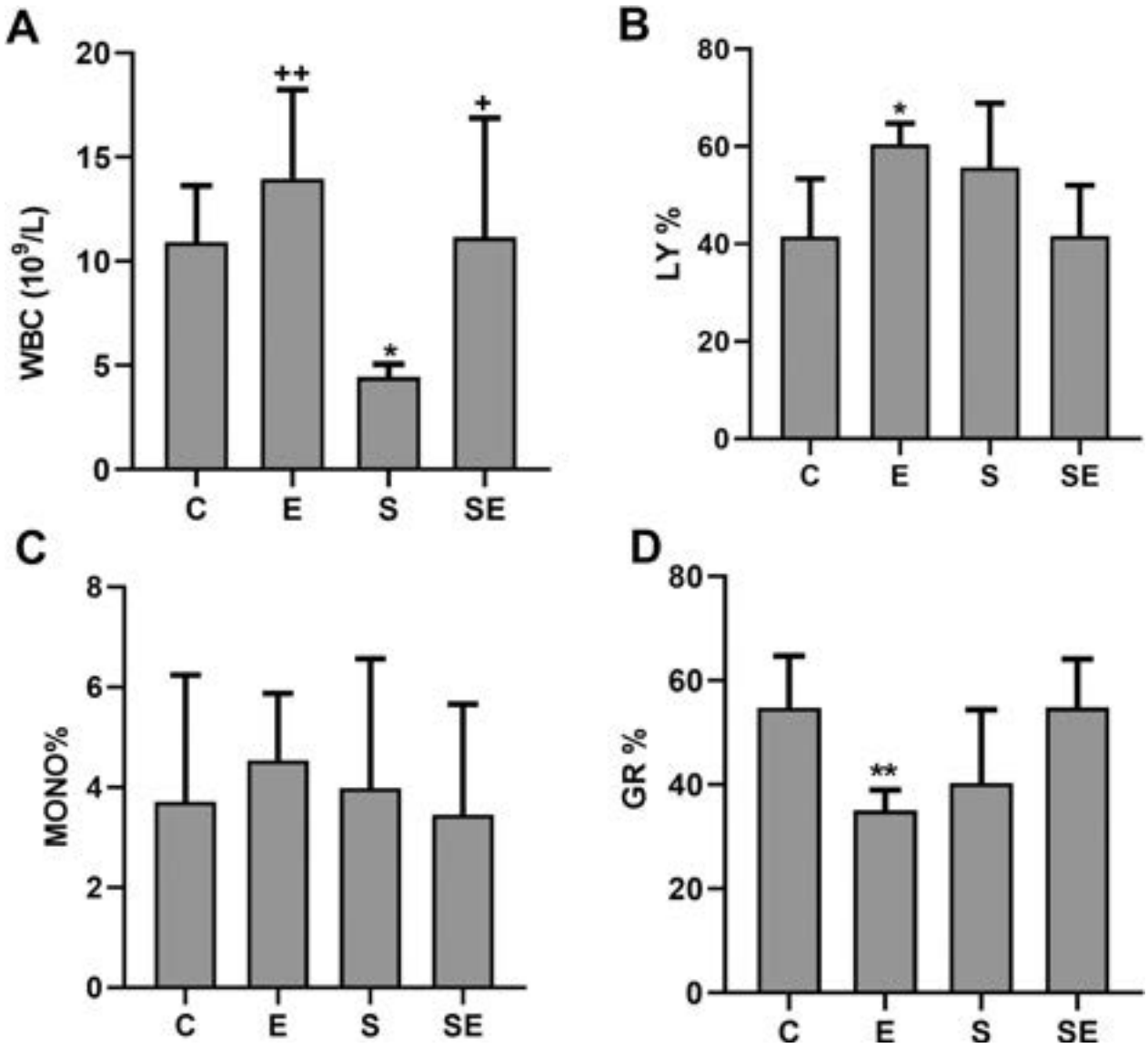
Şekil 4. Dr. Biolyse tedavisinden sonra ölçülen kan parametreleri. Sağlıklı kontrol (C) kan pH ve gazları sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektrik akımı verilmişsepsis (SE) gruplarına (n = 7) elektrik akımı verildi. pH (A), pO_2 (B), pCO_2 (C) ve sO_2 (D), ortalama ± SD $^{+}$ olarak sunulur; $p<0.05^{++}$; p<0,001 C grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark. +++; p<0,001 S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g004

Ek olarak, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) seviyeleri, C grubuna göre S grubunda önemli ölçüde daha düşüktü (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), büyümeyi düzenleyen onkogenler (GRO) / keratinosit kemoatraktan (KC), interferon gama (IFNγ), monosit kemoatraktan protein 1 (MCP1) ve kemokin ligand (CCL5 veya RANTES) seviyeleri önemli ölçüde daha yüksekti. Ancak IL-1α dışında S grubunda değişen tüm bu parametreler SE grubunda değişmedi. SE grubunda C grubuna göre seviye hala daha yüksekti ($p<0.05$).

Western blot

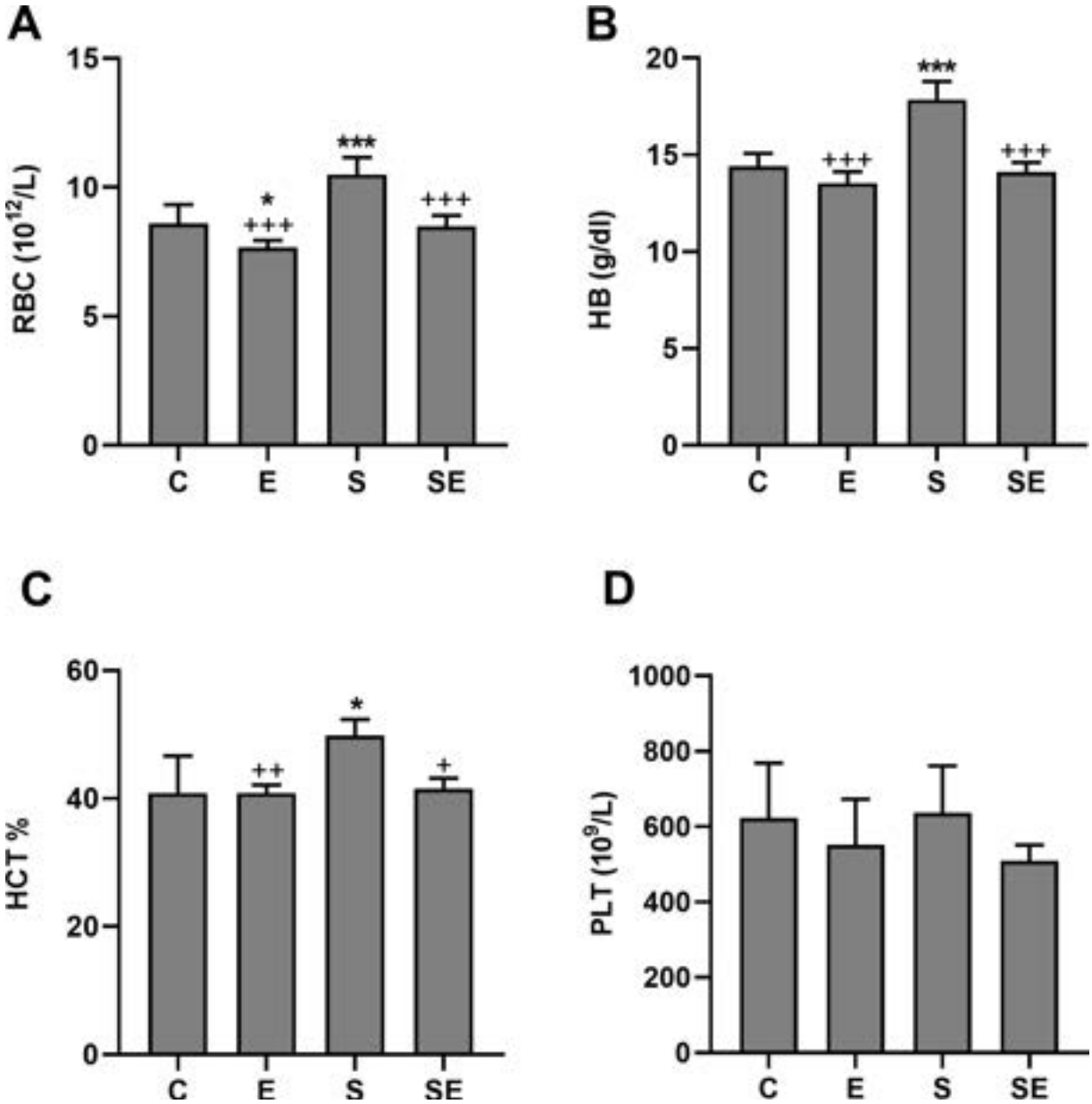
Sıçanların karaciğer, kalp ve akciğer dokularındaki inflamatuar sitokinler IL-1β ve TNF-α seviyelerindeki değişiklikler Şekil 8 ve 9'da gösterilmektedir. İncelenen tüm dokularda, bu sitokinlerin ekspresyonu, C grubuna kıyasla S grubunda yukarı regüle edildi ($p <0.05$ – $p<0.001$). Elektriksel sinyal tedavisi, SE grubunda hem IL-1β hem de TNF-α düzeylerini S grubuna göre önemli ölçüde azalttı ($p<0.05$ –$p<0.01$). Ek olarak, sağlıklı sıçanların elektrik sinyali tedavisi, karaciğer, kalp veya akciğer dokularında bu inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadı.



Şekil 5. Beyaz kan hücresi sayımı. Sağlıklı kontrol (K) elektrik verilmiş sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektriklenmiş sepsis (SE) gruplarının (n = 7) kan lökosit sayıları. WBC (A), beyaz kan hücreleri; %LY (B), lenfosit %; MONO% (C), monosit %; % GR (D), % granülosit. Veriler, ortalama ± SD olarak sunulur. +; $p<0.05$, ++; C grubuna göre $p<0.01$ istatistiksel olarak anlamlıı fark. $^{+}$; $p<0.05$, $^{++}$; S grubuna göre $p<0.01$ istatistiksel olarak anlamlı fark.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g005

Sepsis sürecinde artan proinflamatuar sitokin seviyeleri ile apoptoz arasındaki ilişki nedeniyle, Bax'ın (Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesi) Bcl-2 (Bcl-2 ailesinin antiapoptotik bir üyesi) ekspresyonuna oranı apoptoz oranı için bir belirteç olarak analiz edildi (Şekil 10). Karaciğer ve kalp dokularında Bax/Bcl-2 oranı S grubunda C grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.05$), bu da apoptozda bir artışa işaret etmektedir. Ancak S grubunda akciğer dokularındaki Bax/Bcl-2 oranları C grubu ile kıyaslandığında değişiklik gözlenmedi. Elektrik sinyali tedavisi, SE grubunun karaciğer, kalp ve akciğer dokusunda apoptoz oranını S grubuna göre önemli ölçüde azalttı ($p<0.05$ –$p<0.01$). Ayrıca sağlıklı sıçanların elektriksel sinyal tedavisi, incelenen dokularda C grubuna göre apoptozda herhangi bir değişiklik oluşturmadı.

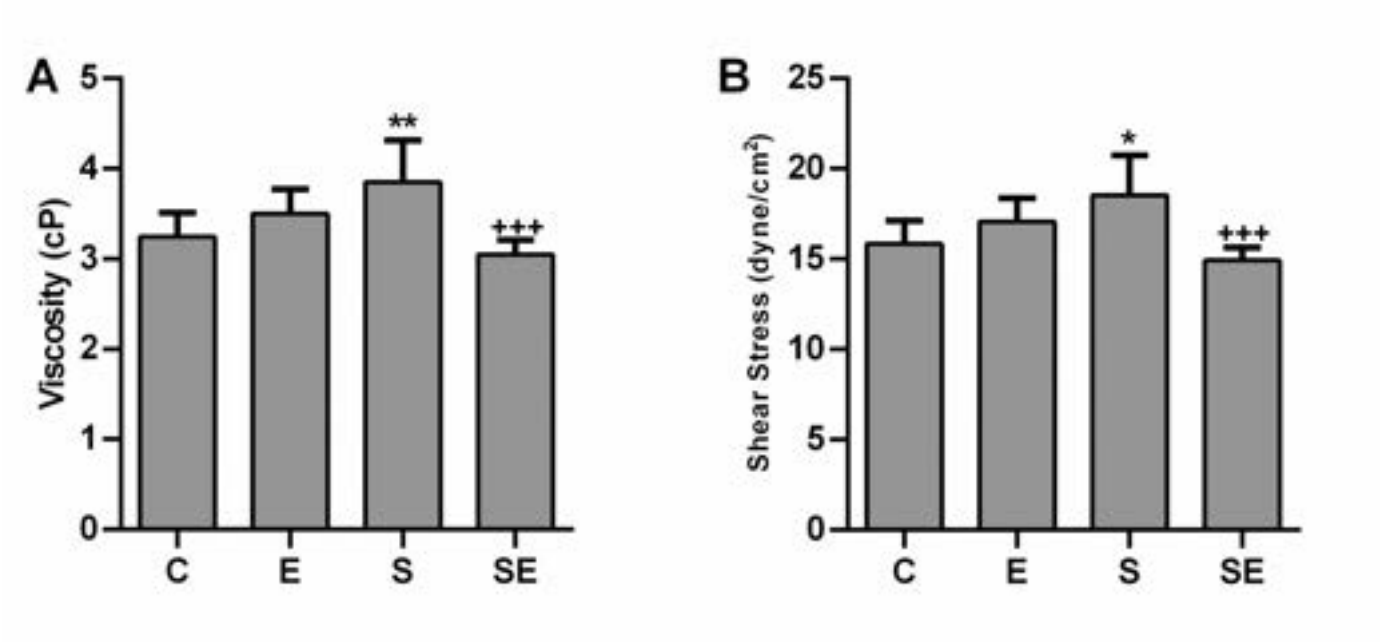


Şekil 6. Kan hemogram parametreleri. Sağlıklı kontrol (K), elektrik verilmiş sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektrifiye sepsis (SE) gruplarında (n=7) kan eritrosit ve trombosit sayıları ile hemoglobin ve hematokrit düzeyleri. RBC (A), kırmızı kan hücresi; HB (B), hemoglobin; HCT (C), hematokrit; ve PLT (D), trombosit. Veriler ortalama ± SD olarak sunulmuştur. $^{+}$; $p<0.05$, $^{+++}$; $p<0,001$ C grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı. $^{+}$; $p<0.05$, $^{++}$; $p<0.01$, $^{+++}$; S grubuna kıyasla $p<0,001$ istatistiksel olarak anlamlı.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g006

Tartışma

Düşük bir direk elektrik sinyalinin, deneysel olarak sepsis modeli oluşturulan sıçanlar üzerindeki antibakteriyel etkisi, ilk defa çalışmamızda açıklanmıştır. Elektrik stimülasyonunun antibakteriyel etkisinin, birincil olarak bakteri hücre yüzeyindeki [15, 16] moleküllerin elektrolizi yoluyla bakteri zarının bütünlüğünü bozmasından veya ikincil olarak düşük elektrik sinyali ile vücut sıvılarının elektrolizi nedeniyle HOCl oluşumundan kaynaklanabileceğini öne sürmüştük. Mikroplarla temas halindeyken HOCl, mikroorganizmaların doymamış lipid tabakasına seçici olarak bağlanır.



Şekil 7. Kan reolojik parametreleri. Sağlıklı kontrol (C), elektrik verilmiş sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektriklenmiş sepsis (SE) gruplarının (n = 7) kan viskozitesi ve kesme stresi seviyeleri. Viskozite (A) ve kayma gerilimi (B). Veriler, ortalama ± SD olarak sunulur. $^{+}$; $p<0.05$, $^{++}$; C grubuna göre $p<0.01$ istatistiksel olarakanlamlı fark. $^{+++}$; $p<0,001$ S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g007

Daha sonra hücre duvarlarını ve dolayısıyla mikropların veya virüslerin hücresel bütünlüğünü bozarak yok olmalarına neden olur [20]. Ek olarak, HOCl ayrıca istilacı patojenlere karşı immün yanıtta aktive edilmiş nötrofiller tarafından üretilir ve çoğunlukla konakçıya ait olan proteinlerle hemen reaksiyona girer [21, 22]. İnsan monosit türevli makrofajların HOCl'ye maruz kalması, lökositlerin hücre dışı tuzaklar oluşturduğu yol olabilecek hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu arttırır [23]. Benzer şekilde, hücre dışı tuzakların salınımı, nötrofiller Ca^{2+} iyonofor iyonomisin'e maruz kaldığında meydana gelir [23].

Histolojik olarak doku bütünlüğünün korunması ve nekrozun olmaması, düşük direkt elektrik sinyali uygulamasının sıçan doku ve organlarında herhangi bir hasara yol açmadığını göstermiştir. Hem S hem de SE gruplarının akciğer dokularında inflamasyon görülmesine rağmen, SE grubundaki inflamasyon S grubuna göre çok daha azdı. Böylece, sıçanlar deneysel olarak başarıyla enfekte edildi, ancak düşük doğrudan elektrik sinyalinin uygulanması, enfeksiyonun akciğer dokusunda yayılmasını önemli ölçüde azalttı.

Çalışmamızda C grubuna göre S grubunda pH, sO_2 ve WBC sayısı daha düşük, pCO_2, RBC sayısı, HB, HCT %, kan viskozitesi ve kayma gerilimi seviyeleri daha yüksekti. Bizim sonucumuza benzer şekilde şiddetli sepsisli bireylerde kan pH'ı düşer [24, 25]. S grubunda pH ve kan gazı düzeylerindeki değişiklikler, sepsis ile solunum ve dolaşım sistemi yetmezliğine ve akut böbrek hasarına yol açabilecek çoklu organ yetmezliği ilişkisine bağlı olabilir [26, 27].

Kan viskozitesi, kanın kalınlığının bir ölçüsüdür ve kayma gerilimi ile kayma hızı arasındaki oran olarak tanımlanır. Akut faz proteinlerindeki artışa bağlı olarak akut inflamatuar hastalığı olan bireylerde artabilir [28]. HCT % ayrıca kan viskozitesini de değiştirebilir. Çalışmamızda, kontrollere kıyasla septik sıçanlarda gözlenen artmış kan viskozitesi, muhtemelen artan RBC sayısı, HB seviyesi ve HCT yüzdesine bağlıydı. Sepsisli hastalarda solunum (hipoventilasyon) ve dolaşım (hipoperfüzyon) yetersizlikleri doku hipoksisine neden

Tablo 1. Serum ALT, AST, kolesterol ve TP seviyeleri ve lipaz aktivitesi ile kan ve doku TAS, TOS, MDA ve GSH seviyeleri ve SOD aktivitesi.

Serum	Gruplar			
	C	E	S	SE
AST (U/L)	53.14±2.73	53.17±4.84^{++}	79.14±28.13^{++}	58±9.03^{+}
ALT (U/L)	93.29±5.4	92.42±3.8^{+++}	186.7±94.65^{++}	98±15.19^{++}
TP (g/dl)	5.8±0.5	5.817±0.16^{+++}	4.786±0.49^{++}	5.314±0.65
KOLESTEROL (mg/dl)	51±3.05	52.25±5.11	35.71±20.66	44.86±20.36
LİPAZ (U/L)	62.14±37.72	58.25±12.56^{+++}	1419±1123^{+++}	60±37^{+++}
TAS (mmol/L)	1.2±0.14	1.27±0.16^{+++}	0.88±0.09^{+++}	1.25±0.13^{+++}
TOS (μmol/L)	4.41±0.62	3.75±0.34^{+++}	8.51±1.99^{+++}	4.5±0.71^{+++}
SOD (ng/ml)	9.32±1.11	9.9±1.53^{+++}	4.94±0.73^{+++}	9.13±1.29^{+++}
MDA (ng/ml)	142±37.81	119.9±28.06^{+++}	784.4±143.2^{+++}	200±53.01^{+++}
GSH (μmol/L)	280.2±52.11	289.2±52.4^{+++}	72.54±18.67^{+++}	281.6±49.57^{+++}
Akciğer	**Gruplar**			
	C	E	S	SE
TAS (mmol/L)	1.21±0.09	1.26±0.09^{+++}	0.84±0.11^{+++}	1.25±0.06^{+++}
TOS (μmol/L)	4.39±0.61	3.71±0.33^{+++}	8.53±1.92^{+++}	4.55±0.61^{+++}
SOD (ng/ml)	10.36±1.59	11.68±1.03^{+++}	5.96±0.68^{+++}	9.93±0.92^{+++}
MDA (ng/ml)	224.8±77.97	209.9±49.10^{+++}	1146±350^{+++}	372.6±67.84^{+++}
GSH (μmol/L)	291.9±45.29	304.6±59.91^{+++}	98.67±16.71^{+++}	282.8±16.62^{+++}
Karaciğer	**Gruplar**			
	C	E	S	SE
TAS (mmol/L)	1.27±0.09	1.3±0.09^{+++}	0.87±0.12^{+++}	1.29±0.06^{+++}
TOS (μmol/L)	4.54±0.63	3.83±0.34^{+++}	8.82±1.99^{+++}	4.7±0.63^{+++}
SOD (ng/ml)	10.66±0.85	12.28±1.34$^{*\ +++}$	5.98±0.69^{+++}	9.22±1.05^{+++}
MDA (ng/ml)	229.4±56.67	220.1±47.63^{+++}	1215±115.1^{+++}	238.7±33.49^{+++}
GSH (μmol/L)	310.3±69.59	341.6±69.66^{+++}	132.9±41.61^{+++}	308.9±24.62^{+++}

Veriler ortalama ± SD olarak sunulur.

$^{+}$; $p<0.05$

$^{+++}$; p<0,001 C grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark.

+++; p<0,001 S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark (n = 7).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.t001

olabilir [29]. Bu nedenle, hipoksi ile indüklenen eritropoietin üretimi, kontrollere kıyasla septik sıçanlarda artan RBC sayısı, HB değeri ve HCT yüzdesini açıklayabilir. WBC sayısı, C grubuna kıyasla S grubunda önemli ölçüde azaldı. Azalmış bir WBC sayısı, bağışıklık felci ile ilişkili olabilir. Şiddetli sepsisin önemli bir özelliğini temsil eder ve mortalite oranının artmasına neden olur [30]. Ancak S grubunda meydana gelen değişikliklerin hiçbiri SE grubunda gözlenmedi. Ayrıca düşük elektrik sinyali, C grubuna göre E grubunda lenfosit yüzdesini artırmış, granülosit yüzdesini ve RBC sayısını azaltmıştır. Deneyimiz, düşük bir elektrik sinyalinin lenfosit ve monosit yüzdeleri üzerindeki bu etkisini belgeleyen ilk deneydir.

S grubunda C grubuna göre ALT ve AST serum seviyeleri ve lipaz aktivitesi daha yüksek, TP seviyesi daha düşüktü. Artan lipaz aktivitesi, pankreatit veya septik şokun bir göstergesidir [31], ve artmış ALT ve AST seviyeleri ve azalmış TP seviyeleri, karaciğer hasarının belirteçleridir [32]. Düşük elektrik sinyali uygulaması SE grubunda tüm bu değişikliklerin oluşmasını engellemiştir.

Önceki çalışmalar, MDA gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) dokularda aşırı üretimi, nötrofil birikimi ve sepsis sırasında proinflamatuar sitokin üretiminde artış nedeniyle [33, 34]

Tablo 2. Serum inflamasyon belirteçleri.

İnflamasyon Belirteçleri	Gruplar			
	C	E	S	SE
G-CSF (pg/ml)	2,51±0,57	4,06±1.17$^{**\ +++}$	1,22±0.59^{+}	2,79±0.62^{++}
M-CSF (pg/ml)	19,97±4.68	18,7±5.02^{+++}	6,62±1.96^{+++}	17,39±5.8^{++}
GM-CSF (pg/ml)	7,49±2.97	8,07±2.79^{+++}	16,75±3.1^{+++}	9,43±2.5^{+++}
GRO/KC (pg/ml)	2,47±1.17	2,8±1.17^{+++}	5,08±1.04^{+++}	3,17±0.84^{+}
IFNγ (pg/ml)	24,23±9.61	26,11±9.05^{+++}	50,72±7.26^{+++}	29,07±5.84^{+++}
MCP1 (pg/ml)	28,49±4.52	25,09±6.83^{+++}	83,13±14.78^{+++}	29,96±4.57^{+++}
IL-1α (pg/ml)	19,15±4.52	18,88±6.76^{+++}	48,11±5.47^{+++}	28,75±7.54$^{*\ +++}$
IL-1β (pg/ml)	15,96±2.84	14,78±5.51^{+++}	31,82±5.34^{+++}	15,54±5.07^{+++}
IL-2 (pg/ml)	25,7±7.17	25,55±7.13^{+++}	56,83±7.73^{+++}	30,44±6.85^{+++}
IL-4 (pg/ml)	5,8±0.65	5,3±1.42^{+++}	12,07±2.52^{+++}	6,04±1.93^{+++}
IL-5 (pg/ml)	20,3±4.35	21,86±6.24	20,04±8.26	18,35±7.15
IL-6 (pg/ml)	24,87±3.7	20,53±5.38^{+++}	63,73±6.57^{+++}	23,58±6.59^{+++}
IL-7 (pg/ml)	6,97±1.41	6,88±0.94^{+++}	13,1±1.63^{+++}	8,5±1.81^{+++}
IL-10 (pg/ml)	13,4±2.45	12,81±3.3^{+++}	30,7±3.95^{+++}	15,25±3.27^{+++}
IL-12 p40 (pg/ml)	10,62±1.99	9,7±1.59^{++}	16,65±6.45^{+}	13,85±4.36
IL-12 p70 (pg/ml)	15,71±2.64	14,47±2.7^{+++}	30,44±4.78^{+++}	17,56±3.31^{+++}
IL-13 (pg/ml)	13,07±4.36	14,62±6.24	12,81±8.26	11,11±7.15
IL-17A (pg/ml)	5,34±1.64	4,75±1.33^{+++}	12,74±2^{+++}	7,75±3.01^{+++}
IL18 (pg/ml)	34,91±6.38	33,08±7.12^{+++}	70,83±7.49^{+++}	38,74±8.21^{+++}
MIP-1α (pg/ml)	23,59±5.57	23,27±8.33^{+++}	63,86±6.22^{+++}	32,58±6.12^{+++}
MIP-2 (pg/ml)	1,18±0.45	1,13±0.59^{+++}	2,52±0.41^{+++}	1,32±0.47^{+++}
MIP-3α (pg/ml)	3,08±1.02	3,45±1.47	3,02±1.95	2,62±1.69
RANTES (pg/ml)	10,8±1.45	10,3±3.21^{+++}	24,8±3.99^{+++}	13,87±2.68^{+++}

Veriler, ortalama ± SD olarak sunulur.

$^{+}$ $p<0.05$

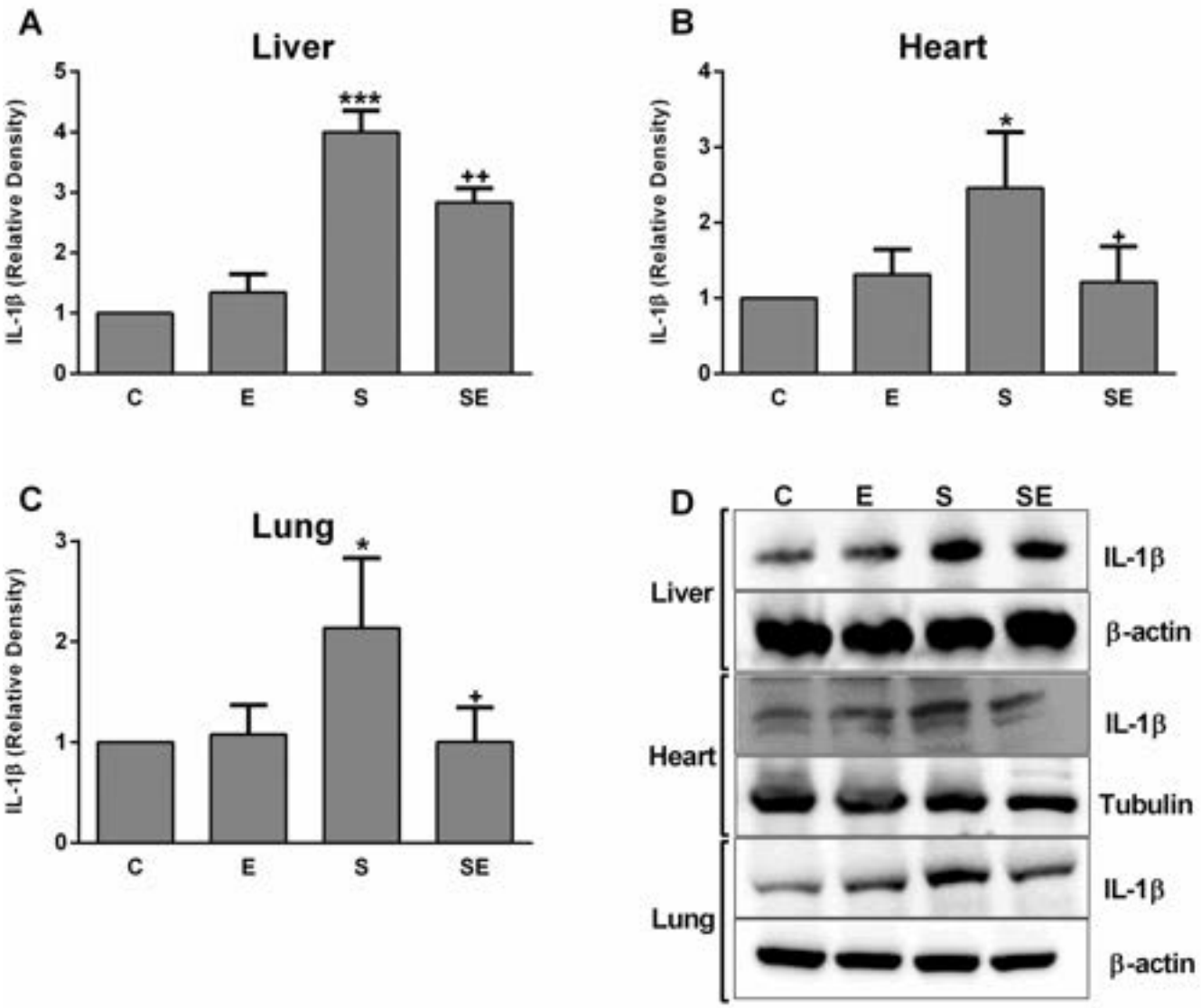
$^{+++}$; p<0,001 C grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark.

+++; p<0,001 S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark (n=7).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.t002

akciğer ve böbrek zedelenmelerinin veya hasarlanmalarının meydana geldiğini ortaya koymuştur [35, 36]. ROS seviyeleri, vücudun GSH ve SOD gibi antioksidan savunma sistemleri tarafından nötralize edildiğinden dengede tutulur [37]. Bu denge ROS lehine bozulursa proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi moleküllerde yıkıcı reaksiyonlar meydana gelir. "Oksidatif stres" olarak adlandırılan bu durum, nihayetinde doku hasarına yol açar [38].S grubunda TOS ve MDA'nın kan ve doku düzeylerinin daha yüksek olması, TAS ve GSH düzeylerinin ve SOD aktivitesinin C grubuna göre daha düşük olması, osteoartrit ve pulmoner fibroz gibi diğer inflamatuar hastalıklarda gözlendiği gibi oksidanlar/antioksidanlar ve dolayısıyla oksidatif stres lehine oksidan dengesinin bozulduğunu gösterir [39, 40]. Ancak düşük elektrik sinyalinin uygulanması SE grubunda oksidatif stres oluşumunu önleyerek bir antioksidan etki göstermiştir.

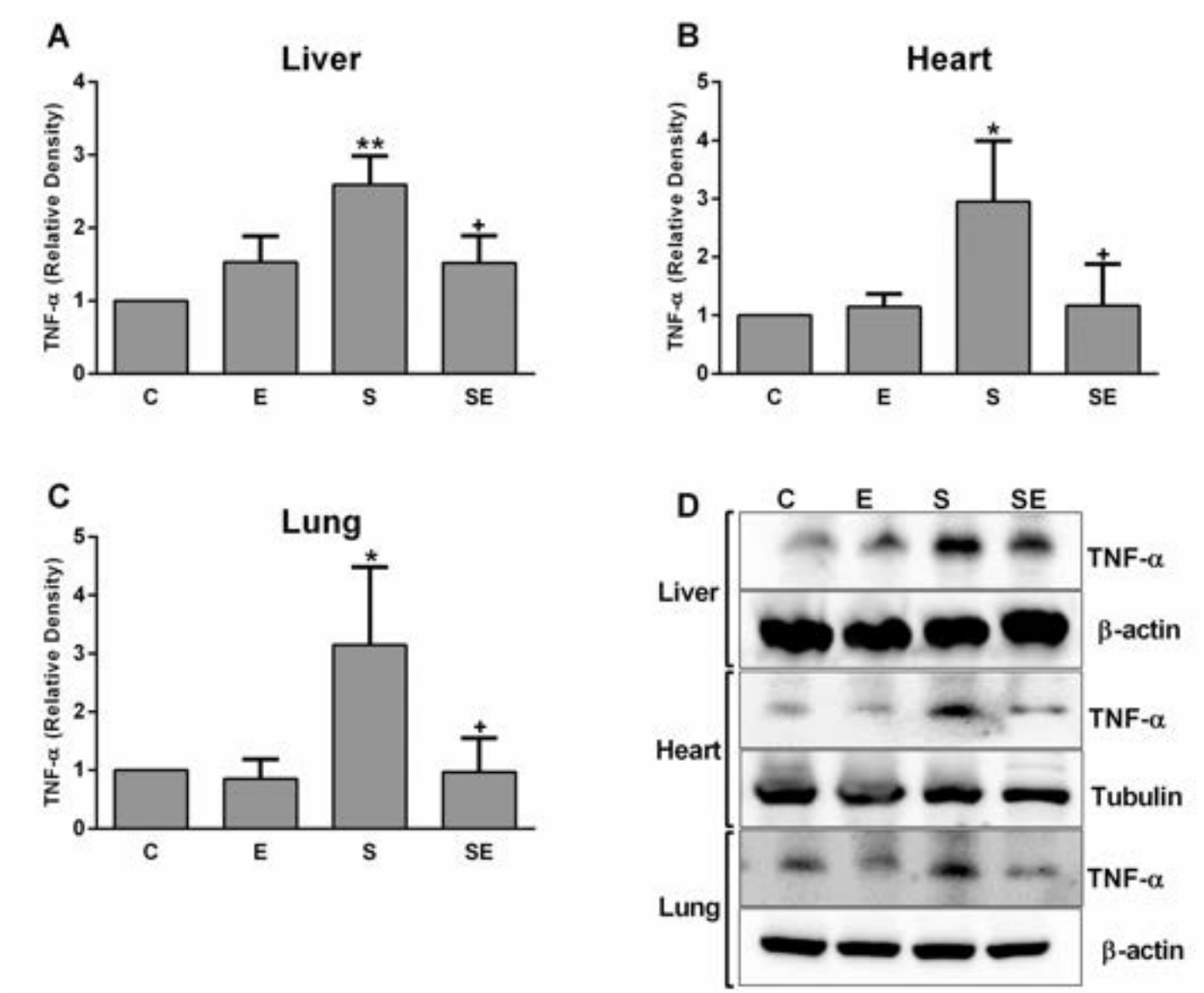
Sepsisli bireylerde birçok IL düzeyi yükselir [41–43]. Daha önceki çalışmalara paralel olarak bizim çalışmamızda da S grubunda IL-5 ve IL-13 dışında incelenen tüm IL'lerin seviyeleri C grubuna göre arttı. Düşük bir IL-5 seviyesi, akciğer ölümü ve doku hasarı ile ilişkilidir ve bu nedenle IL-5 tedavisi sepsis ile ilişkili ölüm oranını azaltabilir [44]. Önceki bir çalışmada, IL-13, inflamatuar tepkileri baskılayarak sepsis kaynaklı ölümcüllüğe karşı koruma sağlamıştır [45]. Çalışmamızda gösterildiği gibi, MIP-3α hariç incelenen tüm MIP'lerin seviyeleri, C grubuna kıyasla S grubunda arttı. Literatürde MIP-3α düzeyi hakkında sınırlı bilgi mevcuttur ve



Şekil 8. Proinflamatuar sitokin IL-1β'nin nispi protein ekspresyonu. A Sağlıklı kontrol (C), elektrik akımı verilmiş sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektrik akımı verilmiş sepsis (SE) gruplarından A) karaciğer, B) kalp ve C) akciğer dokularının görüntüleri D) Çalışılan dokularda IL-1β ekspresyonunun temsili görüntüleri. Değerler, ortalama ± SD olarak sunulmuştur. Karşılaştırmalar C grubu ile S grubu (+; $p<0.05$ ve +++; $p<0.001$) ve S grubu ile SE grubu arasında yapıldı. (+; $p<0.05$ ve ++; $p<0.01$).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g008

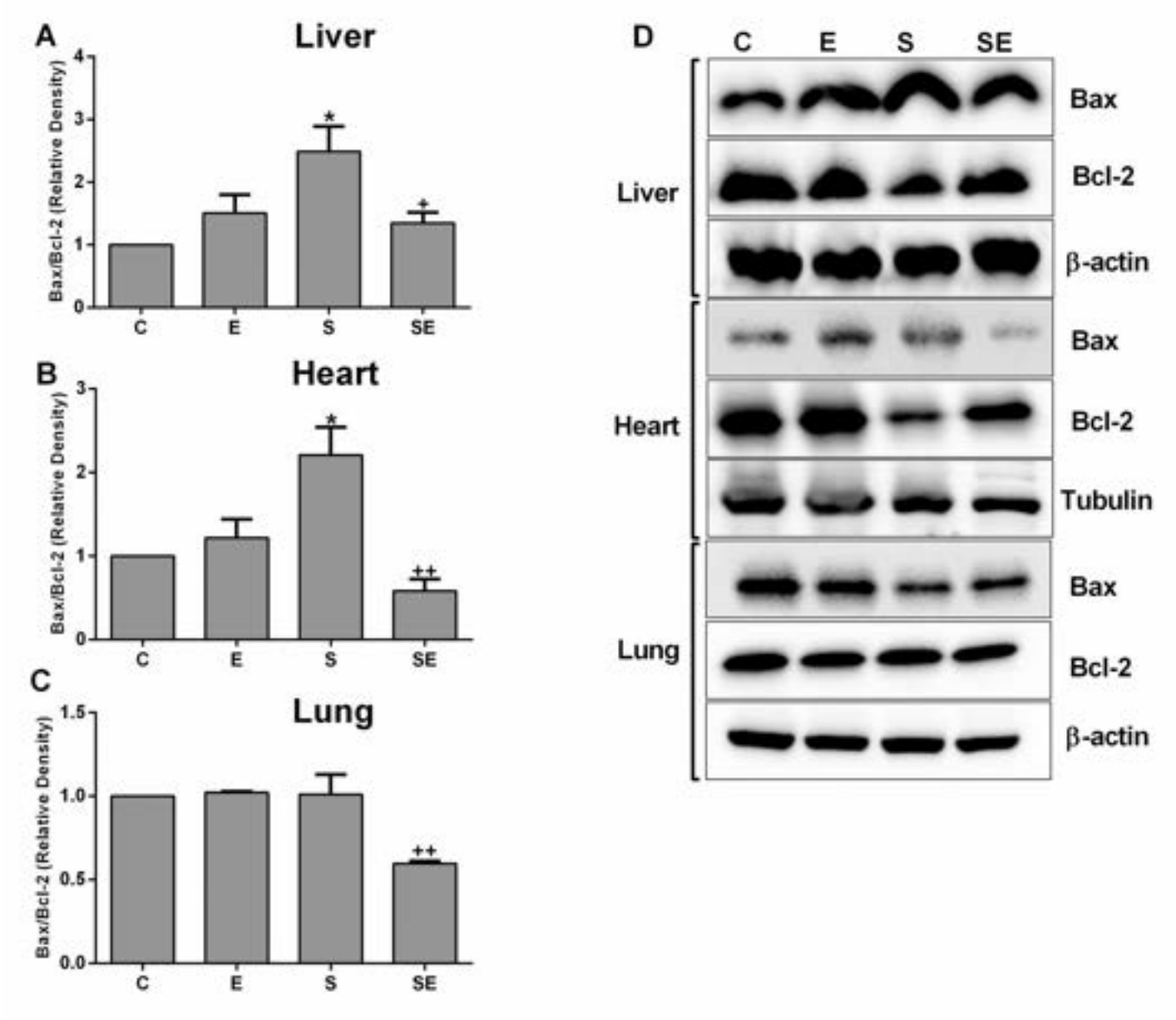
M diğer MIP ailelerinin sepsisteki rolleri tartışmalıdır [46,47]. Sepsisli hastalarda miyeloid hücre fonksiyonlarını artırmak için S grubunda seviyeleri düşen G-CSF kullanımı önerilmektedir [48]. İlginç bir şekilde, GM-CSF düzeyinin S grubunda düşmesi beklenirken [49], bizim çalışmamızda kontrollere göre daha yüksekti. Bu değişiklik sepsisin erken veya geç evresi ile ilgili olabilir. Bizim çalışmamızda GRO/KC, MCP1 ve RANTES düzeyleri S grubunda C grubuna göre daha yüksekti. Bildiğimiz kadarıyla, sepsisli bireylerde GRO düzeyini değerlendiren hiçbir çalışma yoktur, ancak çeşitli kanserleri olan hastalar üzerinde birçok çalışma vardır [50,51]. Farklı kanser türlerine sahip bireylerde GRO düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. MCP1, güçlü bir kemoatraktan ve çeşitli inflamatuar hastalıklarda yer alan düzenleyici bir aracıdır [52]. RANTES de benzer bir etki gösterir [53].



Şekil 9. Proinflamatuar sitokin TNF-a'nın nispi protein ekspresyonu. Sağlıklı kontrol (C), elektrik akımı verilmiş sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektrik akımı verilmiş sepsis (SE) gruplarından A) karaciğer, B) kalp ve C) akciğer dokularının görüntüleri. D) Çalışılan dokularda TNF-a ekspresyonunun temsili resimleri gösterilmektedir. Değerler, ortalama ± SD olarak sunulmuştur. Karşılaştırmalar C grubu ile S grubu arasında (+; $p<0.05$ ve ++; $p<0.01$) ve S grubu ile SE grubu arasında yapıldı. (+; $p<0.05$).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g009

Bununla birlikte, elektrik sinyallerinin uygulanması, E grubunda IL-1α dışında inflamatuar belirteçlerin oluşumunu önleyerek bir anti-inflamatuar etki gösterir. IL-1α, aktive edilmiş makrofajlar ve nötrofiller, epitel hücreleri ve endotel hücreleri tarafından üretilir. İnterlökin-1 reseptörüne bağlanarak bağışıklık cevaplarının düzenlenmesinde önemli roller oynar. [54]. SE grubunda C grubuna göre daha yüksek IL-1 seviyesi SE grubunda hafif bakteriyemi varlığından kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamızda kırk dakikalık iki seansta düşük elektrik sinyali uygulanmıştır. Seans sayısı artırılarak bakteriyemi ortadan kaldırılabilir. Bu bulgu aynı zamanda SE grubunun akciğerlerinde minör inflamasyon varlığını da açıklamaktadır.



Şekil 10. Proapoptotik protein Bax'in antiapoptotik protein Bcl-2'ye göreli ekspresyon oranı. A) Sağlıklı kontrol (C), elektrik akımı verilmiş sağlıklı (E), sepsis (S) ve elektrik akımı verilmiş sepsis (SE) gruplarından A) karaciğer, B) kalp ve C) akciğer dokularından elde edilen veriler. D) Çalışılan dokularda Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun temsili resimleri. Değerler, ortalama ± SD olarak sunulmuştur. Karşılaştırmalar C grubu ile S grubu arasında (+; $p<0.05$) ve S grubu ile SE grubu arasında yapıldı. (+; $p<0.05$ ve ++; $p<0.01$).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257177.g010

Sepsis ile TNF-α ve IL-1β gibi proinflamatuar sitokinlerin artan seviyeleri arasındaki ilişki, istilacı patojenleri ortadan kaldıran bir mekanizma olarak bilinir [55, 56]. Öte yandan, bu bağışıklık sistemi düzenleyicileri, dokuya aşırı zarar veren inflamasyonu teşvik ederek (uyararak) sepsis kaynaklı patofizyolojide rol alır [57 Bu çalışmada, sepsis patofizyolojisinde en çok çalışılan sitokinler olan hem TNF-α hem de IL-1β'nin yukarı regülasyonu, diğer araştırmacıların önceki raporlarıyla tutarlı olarak, S grubundaki sıçanların karaciğer,

kalp ve akciğer dokularında gösterilmiştir [58–60]. Proinflamatuar sitokinlerin üretimi, sepsisli hastalarda yüksek düzeyde ROS üretimi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [61, 62]. Ancak düşük elektrik sinyali, sepsis kaynaklı doku hasarını iyileştirerek bu sitokinlerin ve oksidatif stres parametrelerinin seviyelerini kontrol grubuna benzer seviyelere indirdi. Önceki bir elektroakupunktur çalışmasında, akciğer dokusundaki proinflamatuar sitokin seviyelerinde sepsis kaynaklı artış da elektrik stimülasyonu ile azaltılmıştır [63]. Buna ek olarak, araştırmacılar ayrıca sepsis sırasında elektriksel vagus siniri stimülasyonunun bir anti-inflamatuar mekanizmayı aktive ederek TNF-α seviyesini azalttığını keşfettiler [64]. Ek olarak, yeni geliştirilen düşük doğrudan elektrik sinyali uygulama yöntemimiz, sepsis kaynaklı doku hasarını düzeltmek için bir anti-inflamatuar mekanizmanın geliştirilebilmesine yardımcı olabilir

Sepsis sırasında, mitokondriyal apoptoz yolunun aktivasyonu nedeniyle hücresel ölüm oranı artar [65]. Bu çalışmada, karaciğer ve kalp dokularında apoptotik oranda da son çalışmalarla uyumlu olarak bir artış gözlemledik [59, 66]. Sepsisin patofizyolojik sürecinin uyarılması, hem bağışıklık hücrelerinin sayısındaki apoptoza bağlı bir azalmadan hem de apoptotik hücrelerin bağışıklık bastırıcı etkisinden kaynaklanabilir [65]. Önceki çalışmalara göre, apoptozun inhibisyonu, sepsis kaynaklı doku hasarına karşı koruma sağlamak için etkili bir strateji olabilir [67]. Ayrıca, düşük elektrik sinyalinin, sepsis sonrası hücre hayatta kalma şansını artırmak için apoptoz oranını da azalttığını gözlemledik. Xie ve ark. ayrıca apoptoza karşı telafi edici bir mekanizma olarak kaspaz-3 ve Bax'ın pulmoner ekspresyonu üzerinde elektriksel stimülasyonun olumlu bir etkisi olduğunu bildirmiştir [63].

Özetle, düşük bir direkt elektrik sinyali uygulaması, farelerin doku veya organlarına herhangi bir zarar vermeden şunları yapar:

- moleküllerin elektrolizi yoluyla bakteri zarının bütünlüğünü bozan veya vücut sıvılarının elektrolizi nedeniyle HOCl oluşumuna neden olan antibakteriyel etki,
- bozulmuş oksidan/antioksidan durumu dengeleyerek ve oksidatif stresi azaltarak antioksidan etki,
- bakteriyemiyi azaltarak ve böylece inflamatuar belirteçlerin oluşumunu engelleyerek bir anti-inflamatuar etki,
- sepsise bağlı hücre ölümünü azaltmak için proapoptotik (bax) ve antiapoptotik (bcl-2) proteinler arasındaki dengeyi antiapoptotik (bcl-2) proteinler lehine ayarlayarak antiapoptotik bir etki.

Anti-bakteriyel, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkileri nedeniyle Dr. Biolyse, enfeksiyon hastalıklarına karşı mevcut tedavilere ek faydalar sunabilmektedir.

Destekleyici bilgiler

S1 İşlenmemiş veri. İşlenmemiş veri Tablo 1.
(XLSX)

S2 İşlenmemiş veri. İşlenmemiş veri Tablo 2.
(XLSX)

S3 İşlenmemiş veri. İşlenmemiş veri -Şekiller 4–7.
(XLSX)

S1 İşlenmemiş görseller.
(PDF)

Teşekkür

Yazarlar, ön *in vitro* deneyler yaparak bu projenin gerçekleşmesine katkı sağlayan Prof. Dr. Ayşen Özel'e, Prof. Dr. Sevim Akyüz'e, Doç. Dr. Sefa Celik'e ve Dr. Mustafa Turhan'a teşekkür eder.

Yazar Katkıları

Kavramsallaştırma: Savas Ustunova, Ismail Meral.

Resmi analiz: Savas Ustunova, Ebru Haciosmanoglu, Ismail Meral.

Finansman edinimi: Serkan Tunc.

İnceleme: Savas Ustunova, Ebru Haciosmanoglu, Huri Bulut, Birsen Elibol, Rabia Atmaca, Irem Kaygusuz, Sevil Tunc, Gulcin Beyza Tunc.

Metodoloji: Savas Ustunova, Ebru Haciosmanoglu, Huri Bulut, Birsen Elibol, Aysu Kilic, Rumeysa Hekimoglu, Serkan Tunc, Rabia Atmaca, Irem Kaygusuz, Gulcin Beyza Tunc, Ismail Meral.

Proje yönetimi: Serkan Tunc, Sevil Tunc.

Kaynaklar: Sevil Tunc.

Denetleme: Ismail Meral.

Onaylama: Ebru Haciosmanoglu.

Görselleştirme: Savas Ustunova, Ebru Haciosmanoglu, Huri Bulut, Aysu Kilic, Rumeysa Hekimoglu, Ismail Meral.

Yazı – orijinal taslak: Savas Ustunova, Ebru Haciosmanoglu, Huri Bulut, Birsen Elibol, Aysu Kilic, Rumeysa Hekimoglu, Ismail Meral.

Yazı – inceleme & düzenleme: Savas Ustunova, Birsen Elibol, Ismail Meral.

Referanslar

- Faix JD. Sepsisin biyolojik belirteçleri. Crit Rev Clin Lab Sci. 2013; 50(1):23–36. https://doi.org/10.3109/ 10408363.2013.764490 PMID: 23480440
- Di Paola R, Fusco R, Gugliandolo E, D'Amico R, Campolo M, Latteri S, ve ark. Antep Fıstığının Antioksidan Aktivitesi, Diyabetik Streptozotosin (STZ) ile İndüklenen Hiperglisemik Sıçanlarda Akut İskemi/Reperfüzyonun (I/R) Kalp Dokusu Hasarını Azaltır.2018; 9:51. https://doi.org/10.3389/fphar. 2018.00051 PMID: 29467653
- Perretti M. İnflamasyonun çözümü: Patofizyolojideki yeni mekanizmalar farmakoloji için fırsatlar yaratıyor. Semin Immunol. 2015; 27(3):145–8. https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.06.001 PMID: 26209504
- Qian Y, Cheng Y, Cai J, Zhao X, Ouyang Y, Yuan WE ve ark. Sinir rejenerasyonunda elektriksel ve manyetik stimülasyondaki gelişmeler. Regen Med. 2019; 14(10):969–79. https://doi.org/10.2217/rme-2018- 0079 PMID: 31583954
- Flaherty MJ. Perioperatif Ağrı Tedavisinde Rehabilitasyon Tedavisi. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2019; 49(6):1143–56. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.07.006 PMID: 31473030
- Ding T, Ge Z, Shi J, Xu Y-T, Jones CL, Liu D-H. Hafif asidik elektrolize su (SAEW) ve ultrasonun mikrobiyal yükler ve taze meyvelerin kalitesi üzerindeki etkisi. LWT—Food Science and Technology. 2015; 60 (2, Part 2):1195–9.
- Hao J, Li H, Wan Y, Liu H. Asidik elektrolize su (AcEW) ve alkali elektrolize suyun (AIEW) taze kesilmiş kişnişin mikrobiyal indirgenmesi üzerindeki birleşik etkisi. Food Control. 2015; 50:699–704.
- Mobini S, Leppik L, Barker JH. Hücreleri in vitro tedavi etmek için doğru akım elektrik stimülasyon odası. Bio- techniques. 2016; 60(2):95–8. https://doi.org/10.2144/000114382 PMID: 26842356

- Liu M, Zhong C, Zhang YM, Xu ZM, Qiao CS, Jia SR. Doğru Akım Elektrik Alanında Gluconacetobacter xylinus ve Bakteriyel Selüloz Üretiminde Metabolik Araştırma. Front Microbiol. 2016; 7:331. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00331 PMID: 27014248
- Lyman WD, Merkatz IR, Kaali SG. Biyouyumlu elektrik akımı HIV bulaşmasını azaltır. Surg Tech- nol Int. 1996; 5:75–9. PMID: 15858720
- Kaali S, Schwolsky Peter M, mucitler; KAALI STEVEN, atanan. Kan ve/veya diğer vücut sıvılarının ve/veya sentetik sıvıların elektrik kuvvetleriyle tedavisi için alternatif akımla sağlanan elektriksel olarak iletken yöntem ve sistem 1990 1990/11/16/Başvuru tarihi.
- Kloth LC. Yara iyileşmesi için elektrik stimülasyonu: in vitro çalışmalardan, hayvan deneylerinden ve klinik deneylerden elde edilen kanıtların gözden geçirilmesi. Int J Low Extrem Wounds. 2005; 4(1):23–44. https://doi.org/10.1177/ 1534734605275733 PMID: 15860450
- Balakatounis KC, Angoules AG. Yara iyileşmesinde düşük yoğunluklu elektrik stimülasyonu: Yaralanma akımına benzeyen dışarıdan uygulanan akımların etkinliğinin gözden geçirilmesi. Eplasty. 2008; 8:e28. PMID: 18552975
- Asadi MR, Torkaman G. Elektrik Stimülasyonu ile Bakteriyel İnhibisyon. Adv Wound Care (New Rochelle). 2014; 3(2):91–7. https://doi.org/10.1089/wound.2012.0410 PMID: 24761349
- Liu WK, Brown MR, Elliott TS. Düşük amperli elektrik akımının (DC) bakterisit aktivitesinin mekanizmaları. J Antimicrob Chemother. 1997; 39(6):687–95. https://doi.org/10.1093/jac/39.6.687 PMID: 9222036
- Pareilleux A, Sicard N. Elektrik akımının Escherichia coli üzerindeki öldürücü etkileri. Appl Microbiol. 1970; 19 (3):421–4. https://doi.org/10.1128/am.19.3.421-424.1970 PMID: 4909349
- Daeschlein G, Assadian O, Kloth LC, Meinl C, Ney F, Kramer A. Kronik yaraların altı tipik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriyel patojeni üzerinde pozitif ve negatif polariteli düşük voltajlı darbeli akımın (LVPC) antibakteriyel aktivitesi.Wound Repair Regen. 2007; 15(3):399–403. https://doi.org/10. 1111/j.1524-475X.2007.00242.x PMID: 17537127
- Newton RA, Karselis TC. Yüksek voltajlı darbeli galvanik uyarımı takiben cilt pH'ı. Phys Ther. 1983; 63(10):1593–6. https://doi.org/10.1093/ptj/63.10.1593 PMID: 6604927
- Zuelli FM, Carnio EC, Saia RS. Kolesistokinin, sıçanları Staphylococcus aureus'un neden olduğu sepsise karşı korur. Med Microbiol Immunol. 2014; 203(3):165–76. https://doi.org/10.1007/s00430-014-0328-3 PMID: 24487953
- Block MS, Rowan BG. Hipokloröz Asit: İnceleme. J Oral Maxillofac Surg. 2020; 78(9):1461–6. https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.06.029 PMID: 32653307
- Krych-Madej J, Stawowska K, Gebicka L. Flavonoidlerin hipokloröz asit ile oksidasyonu: reaksiyon kinetiği ve antioksidan aktivite çalışmaları. Free Radic Res. 2016; 50(8):898–908. https://doi.org/10.1080/ 10715762.2016.1194520 PMID: 27225705
- Speth C, Brodde MF, Hagleitner M, Rambach G, Van Aken H, Dierich M ve ark. Nötrofiller Plazma Proteinlerini HIV-1'e Karşı Silahlara Dönüştürür.PLoS One. 2013; 8(6):e66073. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0066073 PMID: 23840401
- Rayner BS, Zhang Y, Brown BE, Reyes L, Cogger VC, Hawkins CL. Makrofaj hücre dışı tuzak oluşumunun indüklenmesinde hipokloröz asit (HOCl) ve diğer inflamatuar aracıların rolü. Free Radic Biol Med. 2018; 129:25–34. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.001 PMID: 30189264
- White HD, Vazquez-Sandoval A, Quiroga PF, Song J, Jones SF, Arroliga AC. Şiddetli sepsis ve septik şokta venöz kan gazlarının kullanımı. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2018; 31(3):269–75. https://doi. org/10.1080/08998280.2018.1460133 PMID: 29904286
- Leon K, Pichavant-Rafini K, Ollivier H, L'Her E. Sıçanlarda Deneysel Akut Sepsis Sırasında İndüklenen Hafif Hipoterminin Asit-Baz Dengesine Etkisi. Ther Hypothermia Temp Manag. 2015; 5(3):163–70. https://doi.org/10.1089/ther.2015.0008 PMID: 26083241
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Amerika Birleşik Devletleri'nde şiddetli sepsis epidemiyolojisi: insidans, sonuç ve ilgili bakım maliyetlerinin analizi.Crit Care Med. 2001; 29(7):1303–10. https://doi.org/10.1097/00003246-200107000-00002 PMID: 11445675
- Rackow EC, Astiz ME, Mecher CE, Weil MH. Sıçanlarda şiddetli sepsis sırasında artan venöz-arteriyel karbon dioksit gerilim farkı. Crit Care Med. 1994; 22(1):121–5. https://doi.org/10.1097/00003246- 199401000-00023 PMID: 8124954
- Moisă E, Negoiţă S, Corneci D. Sepsiste Kırmızı Kan Hücresi Reolojisini ve Klinik Uygulamadaki Rolünü Biyomoleküler Yönlerden Olası Terapötik Müdahalelere Anlamak. Central European Journal of Clinical Research. 2018; 1(1):40–58.
- Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis ve septik şok. Lancet. 2018; 392(10141):75–87. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2 PMID: 29937192

- Hotchkiss RS, Karl IE. Sepsisin patofizyolojisi ve tedavisi. N Engl J Med. 2003; 348(2):138– 50. https://doi.org/10.1056/NEJMra021333 PMID: 12519925
- Chaari A, Abdel Hakim K, Bousselmi K, Etman M, El Bahr M, El Saka A, ve ark. Septik şoklu hastalarda pankreas yaralanması: Bir literatür incelemesi. World J Gastrointest Oncol. 2016; 8(7):526–31. https:// doi.org/10.4251/wjgo.v8.i7.526 PMID: 27559431
- McGill MR. Serum aminotransferazlarının geçmişi ve bugünü ve karaciğer hasarı biyobelirteçlerinin geleceği. EXCLI J. 2016; 15:817–28. https://doi.org/10.17179/excli2016-800 PMID: 28337112
- Cadirci E, Altunkaynak BZ, Halici Z, Odabasoglu F, Uyanik MH, Gundogdu C, ve ark. Sıçanlarda çekal ligasyon ve delinmeye bağlı sepsis modelinin neden olduğu akciğer hasarının tedavisi için potansiyel bir hedef olarak alfa-lipoik asit. Shock. 2010; 33(5):479–84. https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181c3cf0e PMID: 19823117
- Schrier RW, Wang W. Akut böbrek yetmezliği ve sepsis.N Engl J Med. 2004; 351(2):159–69. https://doi. org/10.1056/NEJMra032401 PMID: 15247356
- Bedirli A, Kerem M, Pasaoglu H, Akyurek N, Tezcaner T, Elbeg S, ve ark. Beta-glukan, deneysel bir sepsis modelinde inflamatuar sitokin salınımını azaltır ve akut akciğer hasarını önler. Shock. 2007; 27(4):397–401. https://doi.org/10.1097/01.shk.0000245030.24235.f1 PMID: 17414422
- Wu L, Gokden N, Mayeux PR. Polimikrobiyal sepsis kaynaklı renal peritübüler kapiller disfonksiyon ve tübüler hasarda reaktif nitrojen türlerinin rolüne dair kanıt. J Am Soc Nephrol. 2007; 18(6):1807–15. https://doi.org/10.1681/ASN.2006121402 PMID: 17494883
- Çalıkoğlu M, Ünlü A, Bilgin R, Tamer L, Atış S, Ulubaş B, ve ark. Hafif stabil astımlı hastaların serumlarında lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitesi. Eurasian J Pulmonol. 2002; 4 (4):458–62.
- Atlan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Dergisi. 2006; 31(2):51–6.
- Fusco R, Cordaro M, Genovese T, Impellizzeri D, Siracusa R, Gugliandolo E, ve ark. Adelmidrol: Pulmoner Fibroziste Umut Veren Yeni Bir Antioksidan ve Anti-inflamatuar Terapötik Araç. Antioxidants (Basel). 2020; 9(7). https://doi.org/10.3390/antiox9070601 PMID: 32660140
- Fusco R, Siracusa R, Peritore AF, Gugliandolo E, Genovese T, D'Amico R, ve ark. Kaju'nun Rolü (Anacardium occidentale L.). Ağrılı Dejeneratif Eklem Hastalığının Deneysel Bir Modeli Üzerine Kuruyemişler. Antioxidants (Basel). 2020; 9(6).
- Ding Y, Lin YJ, Zhu T, Huang M, Xu QP. İnterlökin 6, sirtuin 1 aracılığıyla sepsis sıçanlarında organların işlev bozukluğunu artırır. Int J Clin Exp Med. 2014; 7(9):2593–8. PMID: 25356114
- Song J, Park DW, Moon S, Cho HJ, Park JH, Seok H, ve ark. Sepsis ve septik şok hastalarında interlökin-6, pentraksin 3 ve prokalsitonin düzeylerinin tanısal ve prognostik değeri: Sepsis-3 tanımlarına göre prospektif kontrollü bir çalışma. BMC Infect Dis. 2019; 19(1):968. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4618-7 PMID: 31718563
- Feng M, Sun T, Zhao Y, Zhang H. Sepsiste Serum Interleukin-6/10/18 Düzeylerinin Saptanması ve Klinik Önemi. J Clin Lab Anal. 2016; 30(6):1037–43. https://doi.org/10.1002/jcla.21977 PMID: 27184083
- Linch SN, Danielson ET, Kelly AM, Tamakawa RA, Lee JJ, Gold JA. İnterlökin 5, sepsis sırasında eozinofilden bağımsız bir şekilde koruyucudur. Am J Respir Crit Care Med. 2012; 186(3):246–54. https:// doi.org/10.1164/rccm.201201-0134OC PMID: 22652030
- Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL, Strieter RM, ve ark. Deneysel bir sepsis modelinde endojen IL-13'ün ifadesi ve katkısı. J Immunol. 2000; 164(5):2738– 44. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2738 PMID: 10679115
- O'Grady NP, Tropea M, Preas HL 2nd, Reda D, Vandivier RW, Banks SM, ve ark. Deneysel endotoksemi ve insan sepsisi sırasında makrofaj inflamatuar protein (MIP)-1alfa ve MIP-1beta tespiti. J Infect Dis. 1999; 179(1):136–41. https://doi.org/10.1086/314559 PMID: 9841832
- Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A, Zanc V, ve ark. Sepsisli hastalarda multipleks sitokin profili oluşturma. APMIS. 2011; 119(2):155–63. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02705.x PMID: 21208283
- Bo L, Wang F, Zhu J, Li J, Deng X. Sepsis için granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF): bir meta-analiz. Crit Care. 2011; 15(1): R58. https://doi.org/10.1186/cc10031 PMID: 21310070
- Mathias B, Szpila BE, Moore FA, Efron PA, Moldawer LL. Sepsis'te GM-CSF Tedavisine Bir İnceleme. Medicine (Baltimore). 2015; 94(50):e2044. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002044 PMID: 26683913

- Lian S, Zhai X, Wang X, Zhu H, Zhang S, Wang W, ve ark. Tümör ve stromal hücrelerde büyüme ile düzenlenen onkogen-alfanın yüksek ekspresyonu, pankreas kanserinde olumsuz prognozu tahmin eder. Medicine (Baltimore). 2016; 95(30):e4328. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004328 PMID: 27472713
- Loukinova E, Dong G, Enamorado-Ayalya I, Thomas GR, Chen Z, Schreiber H, ve ark. Murin skuamöz hücreli karsinom tarafından büyüme düzenlenmiş onkogen-alfa ekspresyonu, konakçı CXC reseptörü-2'ye bağlı bir mekanizma ile tümör büyümesini, metastazı, lökosit infiltrasyonunu ve anjiyogenezi destekler. Oncogene. 2000; 19(31):3477–86. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203687 PMID: 10918606
- Ramnath RD, Ng SW, Guglielmotti A, Bhatia M. MCP-1'in endotoksemi ve sepsisteki rolü. Int Immunopharmacol. 2008; 8(6):810–8. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.033 PMID: 18442784
- Chen L, Zhang Q, Yu C, Wang F, Kong X. Karaciğer hastalığında CCL5/RANTES'in fonksiyonel rolleri. Liver Research. 2020; 4(1):28–34.
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. İnterlökin-1 sinyal iletimi. Life Sci. 1996; 59(2):61– 83. https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00135-x PMID: 8699924
- Aikawa N. [Cerrahi hakaretlerle ilişkili çoklu organ disfonksiyonu sendromunun patogenezinde sitokin fırtınası]. Nihon Geka Gakkai Zasshi. 1996; 97(9):771–7. PMID: 8940690
- Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Sepsiste sitokinler: güçlü immün düzenleyiciler ve potansiyel terapötik hedefler - güncellenmiş bir görünüm. Mediators Inflamm. 2013; 2013:165974. https://doi.org/10.1155/ 2013/165974 PMID: 23853427
- Dinarello C, Arend W, Sims J, Smith D, Blumberg H, O'Neill L, ve ark. IL-1 ailesi terminolojisi. Nat Immunol. 2010; 11(11):973. https://doi.org/10.1038/ni1110-973 PMID: 20959797
- Faim F, Passaglia P, Batalhao M, Lacchini R, Stabile AM, Carnio EC. Endotoksemi sırasında büyüme hormonu/insülin benzeri büyüme faktörü-1 ekseninde ghrelinin rolü. Growth Horm IGF Res. 2019; 48–49:36–44. https://doi.org/10.1016/j.ghir.2019.08.004 PMID: 31494533
- Wang Y, Yu W, Shi C, Hu P. Crocetin, İnflamatuar Tepki ve Mitokondriyal Fonksiyonun Düzenlenmesi Yoluyla Sepsisin Neden Olduğu Kardiyak Disfonksiyonu Azaltır. Front Physiol. 2020; 11:514. https://doi.org/10. 3389/fphys.2020.00514 PMID: 32581829
- Zheng L, Su J, Zhang Z, Jiang L, Wei J, Xu X, ve ark. Salidrosid, akciğer epitel hücreleri tarafından miRNA-146a eksozomlarının salgılanmasını etkileyerek alveolar makrofajların inflamatuar yolunu düzenler. Sci Rep. 2020; 10(1):20750. https://doi.org/10.1038/s41598-020-77448-6 PMID: 33247202
- Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, Machado FR, Assunçao MS, Blecher S, ve ark. Sepsisin klinik sürekliliğinde hücre yüzeyi reseptörlerinin ifadesi ve oksidatif metabolizma modülasyonu. Crit Care. 2008; 12(1):R25. https://doi.org/10.1186/cc6801 PMID: 18302745
- Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. Sepsis: gelişen kavramlar ve zorluklar. Braz J Med Biol Res. 2019; 52(4):e8595. https://doi.org/10.1590/1414-431X20198595 PMID: 30994733
- Xie C, Wu S, Li Z, Huang B, Zeng W. [Elektroakupunktur, septik sıçanları JAK1/STAT3 yolu aracılığıyla akut akciğer hasarından korur]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2020; 40(11):1662–7. https://doi. org/10.12122/j.issn.1673-4254.2020.11.20 PMID: 33243749
- Villegas-Bastida A, Torres-Rosas R, Arriaga-Pizano LA, Flores-Estrada J, Gustavo-Acosta A, Moreno-Eutimio MA. ST36 Akupunktur Noktasındaki Elektrik Stimülasyonu Sepsis Ölümcüllüğüne Karşı Korur ve Vagus Siniri ve Katekolamine Bağlı Mekanizmalar Yoluyla Serum TNF Düzeylerini Düşürür. Evid Based Complement Alternat Med. 2014; 2014:451674. https://doi.org/10.1155/2014/451674 PMID: 25057275
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptoz ve kaspazlar sepsiste ölüm ve inflamasyonu düzenler. Nat Rev Immunol. 2006; 6(11):813–22. https://doi.org/10.1038/nri1943 PMID: 17039247
- Chen SN, Tan Y, Xiao XC, Li Q, Wu Q, Peng YY, ve ark. TLR4'ün silinmesi, inflamasyon ve apoptozu inhibe ederek lipopolisakkarit kaynaklı akut karaciğer hasarını hafifletir. Acta Pharmacol Sin. 2021. https:// doi.org/10.1038/s41401-020-00597-x PMID: 33495514
- Weaver JG, Rouse MS, Steckelberg JM, Badley AD. Oral olarak uygulanan bir apoptoz inhibitörü ile deneysel sepsiste iyileştirilmiş survi. FASEB J. 2004; 18(11):1185–91. https://doi.org/10.1096/fj. 03-1230com PMID: 15284218