T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences

LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN DENEYSEL AKUT KARACİĞER HASARINDA MFG-E8/LAKTADHERİN UYGULAMASININ FERROPTOTİK BİYOBELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANER YILDIRIM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Bilim Alan Kodu: 1090

BALIKESİR
2026

T.C.

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN DENEYSEL AKUT KARACİĞER HASARINDA MFG-E8/LAKTADHERİN UYGULAMASININ FERROPTOTİK BİYOBELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANER YILDIRIM

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ MERVE AKIŞ YILMAZ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 1090

BALIKESİR

2026

TEZ KABUL SAYFASI

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde **Caner YILDIRIM** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan

"Lipopolissakkarit ile İndüklenen Deneysel Akut Karaciğer Hasarında MFG-E8/Laktadherin Uygulamasının Ferroptotik Biyobelirteçler Üzerine Etkisinin Araştırılması"

başlıklı tez çalışması,
Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 31 / 08 / 2026

TEZ SINAV JÜRİSİ

Dr. Öğr. Üyesi Merve AKIŞ YILMAZ
Balıkesir Üniversitesi
(Danışman)
(Başkan)

Prof. Dr. A. Adil HİŞMİOĞULLARI
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Güneş ÖZEN EROĞLU
İstanbul Nişantaşı Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi,
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 01 / 09 / 2026 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI
Enstitü Müdürü

BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıpları kabullendiğimi **beyan ederim.**

13/08/2026

Caner YILDIRIM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bana yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Sayın Dr. Merve AKIŞ YILMAZ olmak üzere, tezin her aşamasında desteğini aldığım Sayın Dr. Arzu YILDIRIM ÖZLÜK'e ve Sayın Dr. Aslı KARAKILIÇ'a, maddi manevi yanımda olan değerli arkadaşlarım Ilgın ÖZKAN, Hakan Berk GÖNÜLTAŞ ve Burak ALTINTAŞ'a son olarak yüksek lisans süresince bana katlanan sevgili ebeveynlerime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER i

ÖZET iv

ABSTRACT vi

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ viii

ŞEKİLLER DİZİNİ xi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 6

2.1. Sepsis 6

2.1.1. Sepsiste İmmün Mekanizmalar 6

2.1.2. Sepsis Epidemiyolojisi 9

2.1.3. Sepsiste Akut Karaciğer Hasarı 9

2.2. Ferroptoz 10

2.2.1. Ferroptozda Demir Metabolizması 10

2.2.2. Ferroptozda Antioksidan Mekanizma 12

2.2.3. Ferroptozda Lipid Metabolizması 13

2.2.4. Hastalıklarda Ferroptoz 14

2.2.5. Sepsis ve Ferroptoz 15

2.3. Süt Yağı Globülü Epidermal Büyüme Faktörü-8 (MFG-E8) 15

2.3.1. MFG-E8 Moleküler Yapısı ve İşlevi 16

3. GEREÇ VE YÖNTEM 21

3.1. Deney Hayvanı Çalışmaları 21

3.1.1. Deney Grupları ve İlaç Uygulamaları 22

3.1.2. Sakrifikasyon 22

3.2. Hepatik Histopatolojik Değerlendirme 23

3.2.1. Hematoksilen & Eozin Boyaması 23

3.2.2. Karaciğer Dokusunda Prusya Mavisi Boyaması 23

3.3. Serum Karaciğer Fonksiyon Testleri 23
3.4. Karaciğer Dokusunda ELISA Analizleri 23
3.5. Karaciğer Dokusunda Metabolik Analizler 24
3.5.1. Karaciğer Dokusunda MDA Ölçümü 24
3.5.2. Karaciğer Dokusunda Ferröz Demir (Fe^{2+}) Ölçümü 25
3.5.3. Karaciğer Dokusunda Hücre İçi İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Ölçümü ve Total GSH/GSSG Oranı 26
3.6. Doku Total Protein Analizi 26
3.7. Western Blot Analizi 27
3.8. İstatistiksel Analiz 28
4. BULGULAR 29
4.1. Hepatik Histopatolojik Değerlendirme Bulguları 29
4.1.1. Hematoksilen & Eozin Boyaması 29
4.1.2. Prusya Mavisi Boyaması 31
4.2. Serumda Karaciğer Fonksiyon Testleri 32
4.3. Karaciğer Dokusunda ELISA Analiz Sonuçları 33
4.3.1. TNF-α Ölçümü 33
4.3.2. IL-1β Ölçümü 34
4.4. Karaciğer Dokusunda Metabolik Analizlerinin Sonuçları 35
4.4.1. Hücre İçi Fe^{+2} Düzeyinin Ölçümü 35
4.4.2. MDA Ölçümü 36
4.4.3. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Düzeyi Ölçümü 37
4.4.4. Total Glutatyon (T-GSH)/Yükseltgenmiş Glutatyon (GSSG) Oranı Ölçümü 38
4.5. Western Blot Analiz Sonuçları 39
4.5.1. GPX4 Protein Ekspresyonu Analizi 39
4.5.2. ACSL4 Protein Ekspresyonu Analizi 40
5. TARTIŞMA 41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 49
KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 60

EKLER 61

ÖZET

Sepsis, enfeksiyona karşı düzensiz konak yanıtı sonucunda gelişen, yaşamı tehdit eden bir organ disfonksiyonu olup karaciğer sepsisten sık etkilenen ve prognozu belirleyen organlardan biridir. Demire bağımlı, lipit peroksidasyonuyla karakterize kontrollü bir hücre ölüm biçimi olan ferroptozun sepsise bağlı organ hasarında rol oynadığı düşünülmektedir. Apoptotik hücrelerin temizlenmesinde görev alan ve anti-inflamatuar özellikleri bulunan süt yağı globülü epidermal büyüme faktörü-8 (MFG-E8) ise bu süreçte olası koruyucu bir molekül olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışmada, lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde MFG-E8 uygulamasının karaciğer hasarı, inflamasyon ve ferroptoz ile ilişkili biyobelirteçler üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada otuz altı yetişkin erkek Wistar albino sıçan; kontrol (n=8), LPS (n=10), LPS+MFG-E8 (n=10) ve MFG-E8 (n=8) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Sepsis, tek doz 2 mg/kg LPS (*E. coli*, O111:B4)'nin intraperitoneal enjeksiyonuyla oluşturuldu. MFG-E8 LPS'den bir saat sonra intraperitoneal 20 µg/kg olarak uygulandı. Altıncı saatte alınan serum ve karaciğer örneklerinde histopatolojik hasar (mononükleer hücre infiltrasyonu, konjesyon, vakuolleşme) hematoksilen-eozin boyaması ile, hepatik demir depoları Prusya mavisi boyaması ile, serum AST ve ALT düzeyleri otoanalizör ile, doku TNF-α ve IL-1β düzeyleri ELISA yöntemi ile, ferroptozla ilişkili olarak doku Fe^{2+}, MDA, total GSH ve GSSH düzeyleri kolorimetrik yöntem ile ve GPX4 ve ACSL4 proteinleri düzeyleri Western Blot ile değerlendirildi.

LPS grubunda kontrole kıyasla mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyon, serum AST ve ALT düzeyleri, doku TNF-α ve IL-1β düzeyleri ile hepatik demir birikimi ve demir düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. LPS sonrası MFG-E8 uygulaması, sadece hepatik demir birikimini LPS grubuna göre anlamlı şekilde azalttı. Buna karşın karaciğer fonksiyon testlerinde, inflamatuar sitokinlerde ve diğer ferroptoz belirteçleri üzerinde olumlu bir eğilim görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu bulgular, LPS ile indüklenen sepsis modelinde altıncı saatte belirgin akut karaciğer hasarı, inflamatuar yanıt ve hepatik demir birikiminin geliştiğini; MFG-

E8’in koruyucu etkisinin ise erken dönemde öncelikle demir metabolizması üzerinden ortaya çıktığını göstermektedir. Diğer ferroptotik ve inflamatuar parametrelerdeki değişimin anlamlılığa ulaşmaması erken zaman noktasıyla ilişkili olabileceğinden, MFG-E8'in olası anti-ferroptotik rolünün ve terapötik etkinliğinin zaman ve doz bağımlı olarak değerlendirileceği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *Sepsis, lipopolisakkarit, MFG-E8, ferroptoz, karaciğer hasarı, demir*

ABSTRACT

Sepsis is a life-threatening organ dysfunction resulting from a dysregulated host response to infection; the liver is one of the organs frequently affected by sepsis and plays a key role in determining the prognosis. Ferroptosis, a controlled form of cell death characterised by iron-dependent lipid peroxidation, is thought to play a role in sepsis-associated organ damage. Milk fat globule epidermal growth factor-8 (MFG-E8), which is involved in the clearance of apoptotic cells and possesses anti-inflammatory properties, has emerged as a potential protective molecule in this process. The aim of this study was to investigate the effect of MFG-E8 administration on biomarkers associated with liver damage, inflammation and ferroptosis in an experimental sepsis model induced by lipopolysaccharide (LPS).

Thirty-six adult male Wistar albino rats were randomized into four groups: control (K, n=8), LPS (L, n=10), LPS+MFG-E8 (LM, n=10) and MFG-E8 (M, n=8). Sepsis was induced by a single intraperitoneal injection of 2 mg/kg LPS (*E. coli*, O111:B4). MFG-E8 was administered intraperitoneally at a dose of 20 μg/kg one hour after LPS. In serum and liver samples taken at the sixth hour, histopathological damage (mononuclear cell infiltration, congestion, vacuolisation) was assessed using haematoxylin-eosin staining, hepatic iron stores were assessed using Prussian blue staining; serum AST and ALT levels were measured using an autoanalyser; tissue TNF-α and IL-1β levels were determined using the ELISA method; tissue Fe^{2+}, MDA, total GSH and GSSH levels, in relation to ferroptosis, were measured using a colorimetric method; and GPX4 and ACSL4 protein levels were assessed using Western blot analysis.

In the LPS group, mononuclear cell infiltration and congestion, serum AST and ALT levels, tissue TNF-α and IL-1β levels, as well as hepatic iron accumulation and iron levels, were found to be significantly higher than in the control group. Administration of MFG-E8 following LPS treatment significantly reduced hepatic iron accumulation compared with the LPS group. However, although a positive trend was observed in liver function tests, inflammatory cytokines and other ferroptosis markers, this was not statistically significant.

These findings indicate that, in the LPS-induced sepsis model, marked acute liver damage, an inflammatory response and hepatic iron accumulation develop by the sixth hour; whilst the protective effect of MFG-E8 manifests primarily through iron metabolism in the early stages. As the lack of statistical significance in changes to other ferroptotic and inflammatory parameters may be related to the early time point, further studies are required to evaluate the potential anti-ferroptotic role and therapeutic efficacy of MFG-E8 in a time- and dose-dependent manner.

Key Words: *Sepsis, lipopolysaccharide, MFG-E8, ferroptosis, liver injury, iron*

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACSL4: Açil-KoA sentetaz uzun zincir ailesi üyesi 4

ALT: Alanin aminotransferaz

AST: Aspartat aminotransferaz

BSA: Sığır serum albümini

CAWS: Candida albicans su-çözünür fraksiyonu

CD14: Küme Farklılaşması 14

CLP: Çekal ligasyon ve delme

DAMP: Hasarla ilişkili moleküler paternler

DMT1: Divalent metal taşıyıcı 1

DTNB: Ellman Reaktifi

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ELISA: Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi

ERK: Ekstraselüler sinyal düzenli kinaz

FE: Fosfatidiletanolamin

FPN1: Ferroportin 1

FS: Fosfatidilserin

GPX4: Glutatyon peroksidaz 4

GSH: Hücre içi indirgenmiş glutatyon

GSSG: Yükseltgenmiş glutatyon

HO-1: Heme oksidaz 1

HRP: Horseradish peroksidaz (yaban turpu peroksidazı)

IL-12: İnterlökin 12

IL-1β: İnterlökin 1 Beta

IL-6: İnterlökin 6

LIP: Labil demir havuzu

LPCAT3: Lizofosfatidilkolin açiltransferaz 3

LPS: Lipopolisakkarit

MAPK: Mitojen ile aktive olan protein kinaz

MASH: Metabolik disfonksiyonla ilişkili steatohepatit

MD-2: Myeloid farklılaşma faktörü-2

MDA: Malondialdehit

MFG-E8: Süt yağı globülü epidermal büyüme faktörü-8

MUFA: Tekli doymamış yağ asiti

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NCOA4: Nükleer kargo reseptör koaktivatörü 4

NF-κB: Nükleer faktör kappa B

NRF-2: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlgili Faktör 2

PAMP: Patojenle ilişkili moleküler paternler

PGE2: Prostaglandin 2

PRR: Patern tanıma reseptörleri

PTGS2: Prostaglandin-endoperoksit sentaz 2

PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

RGD: Arginin-glisin-aspartat

ROT: Reaktif oksijen türleri

RSL3: RAS seçici öldürücü

SLC3A2: Çözünen madde taşıyıcı ailesi 3'ün 2.üyesi

SLC7A11: Çözünen madde taşıyıcı ailesi 7'nin 11.üyesi

STEAP3: Prostatın Altı Transmembranlı Epitel Antijeni 3

TBA: Tiyobarbitürik asit

TGFß1: Tümör büyüme faktörü β1

TLR4: Toll-benzeri reseptör 4

TNB: 2-nitro-5-tiyobenzoik asit

TNF-α: Tümör Nekroz Faktörü Alfa

TXNRD1: Tiyoredoksin redüktaz 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Erken dönem sepsiste immün yanıt 7
Şekil 2.2. LPS yapısı 9
Şekil 2.3. Ferroptozda demir metabolizması 12
Şekil 2.4. Sistem Xc^-/GPX4 yolağı 13
Şekil 2.5. MFG-E8 yapısı 16
Şekil 2.6. MFG-E8'in anti-inflamatuar yolağı 18
Şekil 3.1. Deney akış şeması 21
Şekil 4.1. Hematoksilen & Eozin ile boyanmış karaciğer doku örneklerinin fotomikrografları (x10) 29
Şekil 4.2. Mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyon skorları 30
Şekil 4.3. Prusya mavisi ile boyanmış karaciğer doku örneklerinin fotomikrografları (10x) 31
Şekil 4.4. Prusya mavisi pozitif alan grafiği 31
Şekil 4.5. Serum AST ve ALT düzeyleri 32
Şekil 4.6. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri 33
Şekil 4.7. Karaciğer dokusunda IL-1β düzeyleri 34
Şekil 4.8. Karaciğer dokusunda hücre içi Fe^{+2} düzeyleri 35
Şekil 4.9. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri 36
Şekil 4.10. Karaciğer dokusunda hücre içi GSH düzeyleri 37
Şekil 4.11. Karaciğer dokusunda gruplar arası GSH/GSSG oranları 39
Şekil 4.12. GPX4 Western Blot jel görüntüsü 39
Şekil 4.13. Normalize GPX4 bant yoğunlukları 40
Şekil 4.14. ACSL4 Western Blot jel görüntüsü 40
Şekil 4.15. Normalize ACSL4 bant yoğunlukları 41

1. GİRİŞ

Sepsis, enfeksiyona karşı gelişen kontrolsüz ve yıkıcı yanıtın bir sonucu olarak ortaya çıkan ve yaşamı tehdit eden organ disfonksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Singer ve ark., 2016). 2021 yılı için yapılan tahminler, sepsise bağlı ölümlerin, küresel ölçekte gerçekleşen tüm ölümlerin yaklaşık %31.5'ini oluşturduğu belirtilmektedir. Aynı yıl için Türkiye'de sepsis insidansının %1.64–1.94, sepsise bağlı ölüm sayısının ise 160,000 ile 212,000 arasında olduğu bildirilmiştir (Gray ve ark., 2025). Buna rağmen sepsis patogenezi hâlâ tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Erken evrede tanı koymayı sağlayacak güvenilir biyobelirteçlerin eksikliği ve hastalığa özgü etkin bir farmakolojik tedavinin bulunmayışı, klinik yönetimin büyük ölçüde destekleyici yaklaşımlarla sınırlı kalmasına neden olmaktadır (Pierrakos ve ark., 2020). Bu veriler, sepsisin küresel sağlık sistemlerinin tümünü ilgilendiren birinci derecede kritik halk sağlığı sorunu olduğunu ortaya koymaktadır.

Sepsiste konak yanıtının merkezinde, patojenle ilişkili moleküler paternlerin (PAMP) ve hasarla ilişkili moleküler paternlerin (DAMP), doğal bağışıklık hücrelerinin yüzeyindeki patern tanıma reseptörleri (PRR) tarafından tanınması yer alır. Gram-negatif bakterilerin dış membran bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS), Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) ve ko-reseptörleri CD14 ile miyeloid farklılaşma faktörü-2 (MD-2) aracılığıyla tanınarak inflamatuar sinyal yolaklarını başlatan en iyi tanımlanmış PAMP'lardan biridir (Park & Lee, 2013). Bu tanınmayı izleyen kontrolsüz sitokin salınımı "sitokin fırtınası" olarak adlandırılan hiper-inflamatuar durumu yaratmakta; endotel disfonksiyonu, mikrovasküler bozukluk ve doku hipoperfüzyonu ile birlikte çoklu organ disfonksiyonuna ilerlemektedir (Hotchkiss & Karl, 2003; Takeuchi & Akira, 2010).

Karaciğer, bakteriyel klirens, akut faz proteinlerinin sentezi, sitokin üretimi ve inflamasyona metabolik adaptasyon gibi işlevleriyle sepsis sürecinde belirleyici bir rol üstlenir; bu nedenle aynı zamanda hasara en açık organlardan biridir. Sepsis olgularının %34-46'sında karaciğer fonksiyonlarında bozulma saptanmakta, ortalama %8.5'inde ise belirgin karaciğer yetmezliği gelişmektedir. Sepsiste en sık görülen organ yetmezliği solunum sistemine ait olmakla birlikte (%42.2), karaciğer

disfonksiyonu ya da yetmezliği gelişen olgulardaki mortalite oranı (%60.69), solunum yetmezliği gelişen olgulara (%47.33) kıyasla belirgin biçimde daha yüksektir (Caraballo & Jaimes, 2019). Karaciğer hücrelerinin güçlü rejenerasyon kapasitesine karşın, tedavi edilmeyen akut karaciğer hasarı geri dönüşsüz yapısal yaralanmaya ve nihayetinde karaciğer yetmezliğine ilerleyebilmektedir (Kim & Choi, 2020). Bu nedenle sepsise bağlı akut karaciğer hasarının hücresel mekanizmalarının aydınlatılması, yalnızca organ koruyucu tedavi geliştirme açısından değil, genel sağkalımın iyileştirilmesi açısından da öncelikli bir hedeftir.

Deneysel çalışmalarda sepsise bağlı akut karaciğer hasarını modellemek amacıyla en sık kullanılan yaklaşımlardan biri, intraperitoneal LPS uygulamasıdır. LPS ile oluşturulan steril endotoksemi modeli, uygulama kolaylığı, yüksek tekrarlanabilirliği ve doza bağlı olarak farklı şiddette fenotip oluşturabilmesi nedeniyle literatürde en çok kullanılan sepsis modeli hâline gelmiştir (Kannan ve ark., 2024). Model, yüksek düzeyde pro-inflamatuar sitokin salınımına ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) birikimine yol açarak hepatosellüler hasar oluşturmakta; IL-1β ve TNF-α gibi sitokinler bu akut inflamatuar yanıtın temel belirteçleri olarak kullanılmaktadır. LPS ile indüklenen karaciğer hasarını demir birikimi ve ROT üretiminin izlediği gösterilmiştir; bu nedenle hepatositlerde demir ve redoks dengesini düzenleyen moleküllerin, LPS kaynaklı akut karaciğer hasarında terapötik katkı sağlaması beklenmektedir.

Ferroptoz, hücre içi demire bağımlı, apoptotik olmayan kontrollü bir hücre ölümü biçimidir (Dixon ve ark., 2012). Hücre içinde biriken serbest demir, hidrojen peroksit ile Fenton reaksiyonuna girerek ROT oluşumuna yol açar; ortaya çıkan radikaller membran fosfolipitlerinde yer alan çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) zincirlerini peroksitleyerek membran bütünlüğünü bozar ve hücre ölümü ile sonuçlanır (16). Bu sürecin başlıca düzenleyicileri; hücre içine sistin alımını sağlayan sistem Xc^- aktivasyonu, indirgenmiş glutatyon (GSH) sentezi, GSH'ı kofaktör olarak kullanarak fosfolipit hidroperoksitlerini indirgeyen glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) ve PUFA'ların fosfolipitlere katılmasını sağlayarak hücreyi ferroptoza duyarlı hâle getiren açil-KoA sentetaz uzun zincir ailesi üyesi 4 (ACSL4) enzimidir (Y. Li ve ark., 2019; Y. Xie ve ark., 2023). Dolayısıyla doku demir yükü, malondialdehit (MDA) gibi lipit peroksidasyon ürünleri, GSH düzeyleri ile GPX4 ve ACSL4 protein ifadeleri,

ferroptotik sürecin izlenmesinde birlikte değerlendirilmesi gereken biyobelirteçleri oluşturmaktadır.

Sepsis, demir metabolizması ile oksidatif stresin en belirgin biçimde kesiştiği klinik tablolardan biridir. Bakterilerin neredeyse tümü enzimatik reaksiyonları için demire gereksinim duyduğundan, konak organizma enfeksiyon sırasında karaciğerden hepsidin salgılayarak ferroportin-1 aracılı demir çıkışını engeller ve dolaşımdaki demiri hücre içine hapseder (Drakesmith & Prentice, 2012). Bu koruyucu yanıt, aynı zamanda hücre içi labil demir havuzunu (LIP) genişleterek ferroptozu tetikleyebilmektedir (Lu ve ark., 2022). Karaciğerin eritrosit dışı en büyük demir deposu olması ve aşırı demir yükünün oksidatif stres yoluyla karaciğer hasarını ilerletmesi, sepsise bağlı akut karaciğer hasarında ferroptozun kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir. Nitekim ferroptoz inhibitörleri, antioksidanlar ve demir şelatörleri ile yapılan çalışmalarda ferroptotik sürecin baskılanmasının inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı, doku ve organ hasarını belirgin biçimde hafiflettiği gösterilmiştir (Z. Xiao ve ark., 2024).

Süt yağı globülü epidermal büyüme faktörü-8 (MFG-E8) ya da laktadherin, ilk kez laktasyon dönemindeki meme bezinde tanımlanan, 47 kDa moleküler ağırlığında, salgılanan bir glikoproteindir (Stubbs ve ark., 1990). Başlıca aktive makrofajlar ve olgunlaşmamış dendritik hücreler tarafından üretilir. Yapısında yer alan ve arginin-glisin-aspartat (RGD) motifi taşıyan epidermal büyüme faktörü (EGF)-benzeri tekrarlar fagositik hücrelerin yüzeyindeki integrin αvβ3/αvβ5 reseptörlerine, C-terminalindeki discoidin-benzeri domainler ise apoptotik hücre yüzeyinde eksternalize olan fosfatidilserine bağlanır. Bu çift bağlanma özelliği sayesinde MFG-E8, apoptotik hücreler ile fagositler arasında bir "köprü molekülü" olarak görev yaparak efferositozu kolaylaştırır (Hanayama ve ark., 2002; Yi, 2016). Efferositoz yalnızca doku homeostazının sürdürülmesini sağlamakla kalmaz; apoptotik hücrelerin ikincil nekroza girerek inflamatuar içeriklerini ortama boşaltmasını da engeller (Doran ve ark., 2020; Ravichandran, 2010). Bunun ötesinde MFG-E8'in, apoptotik hücrelerden bağımsız olarak da MAPK, p38, ERK1/2 ve NF-κB gibi inflamatuar sinyal moleküllerinin aktivitesini baskıladığı ve Keap-1/Nrf-2/HO-1 yolağı üzerinden antioksidan savunmayı desteklediği gösterilmiştir (Yi, 2016).

MFG-E8'in sepsisteki rolünü inceleyen çalışmalar sınırlı olmakla birlikte tutarlı bir tablo ortaya koymaktadır. Sepsiste MFG-E8'in tüketildiği ya da baskılandığı; çekal ligasyon ve delme (CLP) ile sepsis oluşturulan sıçanlarda 20. saatte MFG-E8 protein ifadesinin dalakta %48, karaciğerde %70 oranında azaldığı bildirilmiştir. Rekombinant insan MFG-E8'in CLP sonrası 5. saatte artan dozlarda (20, 40, 80, 160 μg/kg) uygulandığı bir çalışmada ise, tedavinin organ hasarı göstergeleri ile serum IL-6 ve TNF-α düzeylerini doza bağımlı biçimde azalttığı, 20 μg/kg dozun etkili en düşük doz olduğu ve daha yüksek dozlarda AST, ALT, kreatinin ve laktat düzeylerinde belirgin ek iyileşme sağlandığı gösterilmiştir (Shah ve ark., 2012). Benzer şekilde, MFG-E8 türevi bir peptidin sepsiste organ hasarını azaltarak sağkalımı iyileştirdiği bildirilmiştir (W. L. Yang ve ark., 2015). Sepsis kaynaklı ferroptotik süreçte MFG-E8'in etkisini doğrudan inceleyen tek çalışmada ise, septik hastaların serum MFG-E8 düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu, hastalık şiddeti ile negatif ilişki gösterdiği ve düşük MFG-E8 düzeyine sahip hastalarda 28 günlük sağkalımın anlamlı biçimde azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada CLP ile sepsis oluşturulan farelerin karaciğerinde zamana bağlı GPX4 kaybı, GSH azalması, MDA ve Fe^{2+} düzeylerinde artış gözlenmiş; rekombinant insan MFG-E8 uygulaması bu değişikliklerin tümünü tersine çevirmiş ve sağkalımı belirgin biçimde iyileştirmiştir (Wu ve ark., 2022).

Ancak mevcut kanıtların tamamı polimikrobiyal CLP modelinden ve görece geç zaman noktalarından (12–24 saat) elde edilmiştir. MFG-E8'in, hepatosellüler hasarın henüz yapısal dejenerasyona ilerlemediği erken endotoksemi döneminde ferroptotik biyobelirteçler üzerinde etkili olup olmadığı, bu etkinin hangi basamakta (demir yükü mü, lipit peroksidasyonu mu, antioksidan savunma mı) ortaya çıktığı ve düşük dozda tek uygulamanın yeterli olup olmadığı bilinmemektedir. Bununla birlikte literatürde LPS ile oluşturulan sepsis modelinde MFG-E8'in ferroptoz ile ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada, LPS ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde gelişen akut karaciğer hasarında, ekzojen olarak uygulanan MFG-E8'in kısa süreli tedavi etkinliğinin ferroptotik biyobelirteçler üzerindeki olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda erkek Wistar albino sıçanlarda tek doz LPS ile sepsis modeli oluşturulmuş, LPS uygulamasından bir saat sonra MFG-E8

verilmiş ve 6. saatte alınan serum ile karaciğer örneklerinde histopatolojik hasar skorları, hepatik demir depoları, serum AST ve ALT düzeyleri, doku TNF-α ve IL-1β düzeyleri ile ferroptozun temel biyobelirteçleri olan Fe^{2+}, MDA, GSH düzeyleri ve GPX4 ile ACSL4 protein ifadeleri değerlendirilmiştir.

Çalışmanın hipotezi, MFG-E8 uygulamasının LPS ile indüklenen sepsis modeline bağlı akut karaciğer hasarında inflamatuar yanıtını ve hepatik demir birikimini azaltacağı; ferroptotik yolaklar üzerinden ferroptozu düzenleyeceği yönündedir. Elde edilen bulguların hipotezlerimizi desteklemesi halinde, çalışmanın sepsis kaynaklı akut karaciğer hasarının tedavisinde MFG-E8'in anti-ferroptotik rolüne ilişkin literatüre katkı sağlayacağı ve yeni tedavi stratejileri açısından umut verici bir yol açacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

Sepsis 2016 yılında yayımlanan Uluslararası Sepsis Konsensusuna göre enfeksiyon durumunda gelişen düzensiz konak yanıtına bağlı olarak hayati tehlike içeren organ disfonksiyonu olarak tanımlanmıştır (Singer ve ark., 2016). Sepsis patogenezinin henüz tam olarak aydınlatılamamış olması ve erken evrede tanı koymayı sağlayacak etkili biyobelirteçlerin eksikliği, hastalığın klinik yönetimini ve tedavisini oldukça güçleştirmektedir (Pierrakos ve ark., 2020).

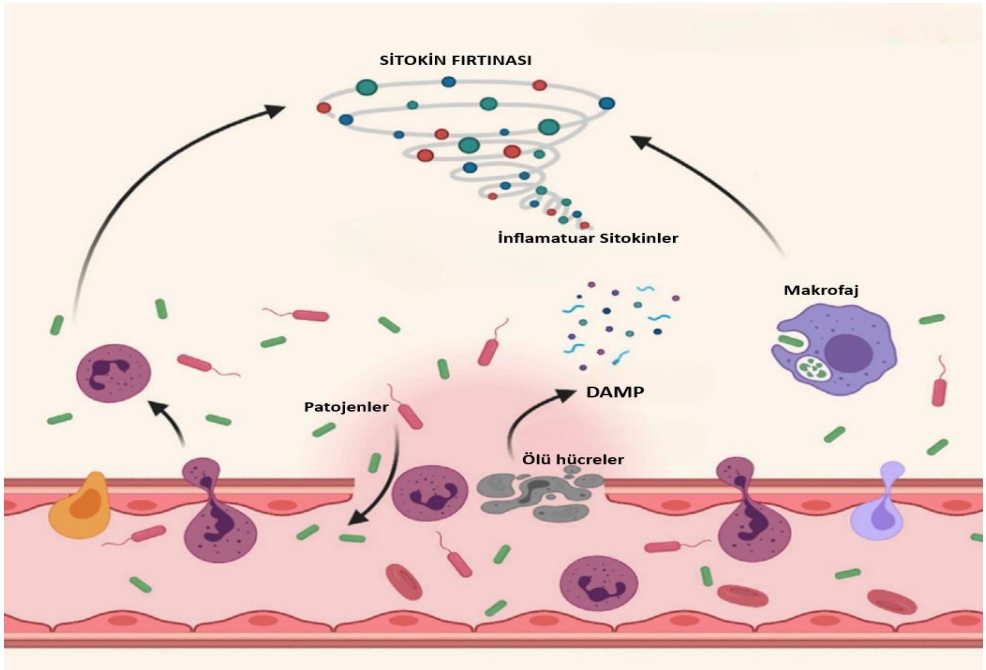
Her türlü enfeksiyon sepsise yol açabilmektedir; ancak sepsisin kendisi basit veya lokal enfeksiyonlardan farklı olarak, inflamatuar ve anti-inflamatuar dengenin karmaşık biçimde bozulması ve bunu takiben gelişen organ hasarları ile seyretmektedir (Park & Lee, 2013).

2.1.1. Sepsiste İmmün Mekanizmalar

İnsan vücudu belirli bir antijeni tanımaya gerek duymayan koruyucu mekanizmalar sayesinde, edinilmiş bağışıklık eksikliğinde de birçok enfeksiyonla başa çıkabilmektedir. Bu mekanizmalar doğuştan bağışıklık sistemini oluşturur (Marshall ve ark., 2018). Doğal bağışıklık yanıtı vücudun savunma sistemi için erken uyarı mekanizması gibi çalışır. Doğal bağışıklık hücrelerinin (makrofaj ve nötrofiller gibi) yüzeyinde ve sitoplazmasında bulunan patern tanıma reseptörleri (PRRs) sağlıklı bir insanda normalde bulunmayan moleküler yapıları ayırt edebilmektedir. Bir mikroorganizma vücudun kimyasal ve fiziksel bariyerlerini aştığında mikroplara özgü ve değişmeyen yapılar olan patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMPs), PRR'ler tarafından hemen tanınır. Buna ek olarak hücreler hasar gördüklerinde hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMPs) salgılarlar. Bu moleküller PRR'ler tarafından tanındığında çeşitli sinyal yolaklarını tetikler ve sonuç olarak inflamasyonla ilişkili sitokinler üretilir (Takeuchi & Akira, 2010).

Temel bir enfeksiyonda patojenler vücuda girdiğinde dokularda yerel bir inflamasyon oluşur. Bağışıklık hücreleri enfeksiyon bölgesine giderek patojenlerin çoğalmasını ve yayılmasını engeller. Sonunda patojen temizlenir ve vücudun bağışıklık dengesi yeniden sağlanır.

Ağır bir enfeksiyon ve eşlik eden doku hasarı durumunda hızlı PAMP ve DAMP artışı sonrası bağışıklık sistemi bir hiper-inflamatuar hale gelir. Bu hiper-inflamatuar duruma yol açan yoğun inflamatuar sitokin salınımı "sitokin fırtınası" olarak adlandırılır (Şekil 2.3). Sepsis modelinde yapılan hayvan çalışmalarında; tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökin-1β (IL-1β) gibi inflamatuar sitokinler inhibe edildiğinde mortalite ve organ hasarında önemli ölçüde azalma olduğu gösterilmiştir (Hotchkiss & Karl, 2003). Hiper-inflamatuar durum bir ölçüde patojenlerden kurtulmaya yardımcı olsa da oluşan sitokin fırtınası daha fazla doku hasarına sebep olur ve hasarlı damarlardan sızan patojenler enfeksiyonu yerel bir enfeksiyondan sistemik hale getirir**.** Sistemik boyuta ulaşan bu enfeksiyonu, kontrolsüz bir inflamatuar yanıt ve doku hasarı izlemekte, neticesinde çoklu organ disfonksiyonu gelişmektedir.

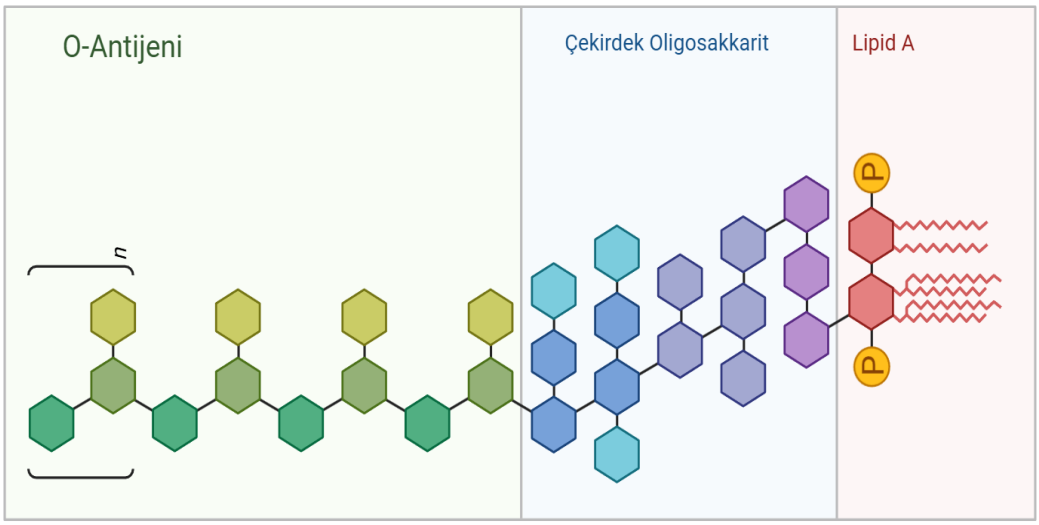


Şekil 2.1. Erken dönem sepsiste immün yanıt

(Chen & Wei, 2021)

Önceki çalışmalar sepsiste bu inflamatuar aşamanın, immün sistem baskılanması, lenfopeni ve ikincil enfeksiyonların gözüktüğü bir anti-inflamatuar aşama ile devam ettiğini öne sürmüştür (Hotchkiss & Karl, 2003). Ancak son yapılan çalışmalar, sepsiste hem inflamatuar hem de anti-inflamatuar yanıtların erken dönemde ve eş zamanlı olarak ortaya çıktığını göstermiştir (W. Xiao ve ark., 2011). Bu iki faz eş zamanlı olarak gerçekleşse de genel olarak sepsisin erken döneminde baskın olan inflamatuar yanıt iken, ileri döneminde anti-inflamatuar yanıt hâkim olmaktadır (Hotchkiss ve ark., 2016).

Daha önce belirtildiği gibi PRR'ler sepsiste inflamasyonun kontrolden çıkması konusunda etkili reseptörlerdir. Bu reseptörlerden biri olan Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4), gram negatif bakterilerin dış membranından salgılanan bir endotoksin olan ve sepsis patolojisinde sıklıkla görülen Lipopolisakkarit'i (LPS) doğrudan tanıyan bir molekül olarak karşımıza çıkmaktadır (Park & Lee, 2013). LPS temel yapı olarak Lipid A, çekirdek oligosakkarit ve O-antijeni alt birimlerinden oluşan bir glikolipittir (Şekil 2.4). Burada en dışta bulunan ve aynı tür olsa bile bakteriden bakteriye aşırı değişkenlik gösteren O-antijeni, kompleman sisteminden ve fagositozdan kaçış, kolonizasyon ve virülans süreçlerinde rol oynayan bir oligosakkarittir. Çekirdek oligosakkarit bölümü, Lipid A kısmına bağlı bir iç ve O-antijenine bağlı bir dış kısımla LPS'nin iskeleti olarak görev yapar. O-antijeninden farklı olarak bakteri serotiplerinde değişkenliği çok azdır (Lerouge & Vanderleyden, 2002). Tüm yapıyı bakteri membranına bağlayan Lipid A, LPS'nin biyoaktif kısmıdır. Bir PAMP olan Lipid A'nın yapısı konaktan gelecek bağışıklık yanıtını doğrudan etkiler (Raetz & Whitfield, 2002). Burada LPS'nin Lipid A kısmı TLR4 ve ko-reseptörleri CD14, myeloid farklılaşma faktörü-2 (MD-2) tarafından tanınarak çeşitli inflamatuar yolakları başlatır (Park & Lee, 2013).



Şekil 2.2. LPS yapısı

(BioRender ile oluşturuldu)

2.1.2. Sepsis Epidemiyolojisi

2021 yılı için yapılan tahminler, dünyada yaklaşık 166 milyon (%95 belirsizlik aralığı: 135–201 milyon) sepsis vakası ve 21.4 milyon (20.3–22.5 milyon) sepsise bağlı ölüm olduğunu göstermektedir. COVID-19 pandemisinin de etkisiyle sepsis yükünün daha da ağırlaştığı tahmin edilmektedir. Çalışmalar özellikle 15 yaş üzerindeki bireylerde sepsis yükünün belirgin biçimde arttığını göstermekte; 1990-2021 yılları arasında bu yaş grubunda sepsise bağlı mortalitenin %26.3 oranında yükseldiğini, sepsis insidansının ise yaklaşık %230 arttığını ortaya koymaktadır. Türkiye'de ise 2021 yılında sepsis insidansının %1.64-1.94 ve sepsise bağlı ölümlerin 160,000 ila 212,000 aralığında olduğu rapor edilmiştir (Gray ve ark., 2025).

2.1.3. Sepsiste Akut Karaciğer Hasarı

Sepsis sürecinde patojenler, toksik maddeler veya inflamatuar düzenleyicilerin etkisiyle karaciğer zarar görmektedir. Bu süreç, başlangıçta karaciğer hücrelerinde işlev bozukluğu ile ortaya çıkar, ardından karaciğer hasarına ve nihayetinde karaciğer yetmezliğine doğru ilerler. Karaciğer disfonksiyonu, sentez kapasitesinde azalma ya

da maddelerin kandan temizlenmesinde bozulma gibi karaciğer fonksiyonlarındaki hafif ve erken değişiklikleri ifade eder. Karaciğer hasarı ise hepatositlerde geri dönüşü olmayan yapısal yaralanma olarak tanımlanır. Karaciğer yetmezliği, karaciğer hücrelerinin yaklaşık %80–90'ında kalıcı ve ağır hasar gelişmesiyle birlikte organın temel fonksiyonlarını yerine getirememesi durumudur (Kim & Choi, 2020).

Sepsis hastalarının %34-46'sında karaciğer fonksiyonlarında bozulma saptanırken, ortalama %8.5'inde belirgin karaciğer yetmezliği gelişmektedir. Sepsiste en sık karşılaşılan organ yetmezliği solunum sisteminde görülse de (ortalama %42.2); karaciğer disfonksiyonu veya yetmezliği gelişen vakalardaki mortalite oranı (%60.69), solunum yetmezliği gelişen vakalara (%47.33) kıyasla belirgin şekilde daha yüksektir (Caraballo & Jaimes, 2019).

2.2. Ferroptoz

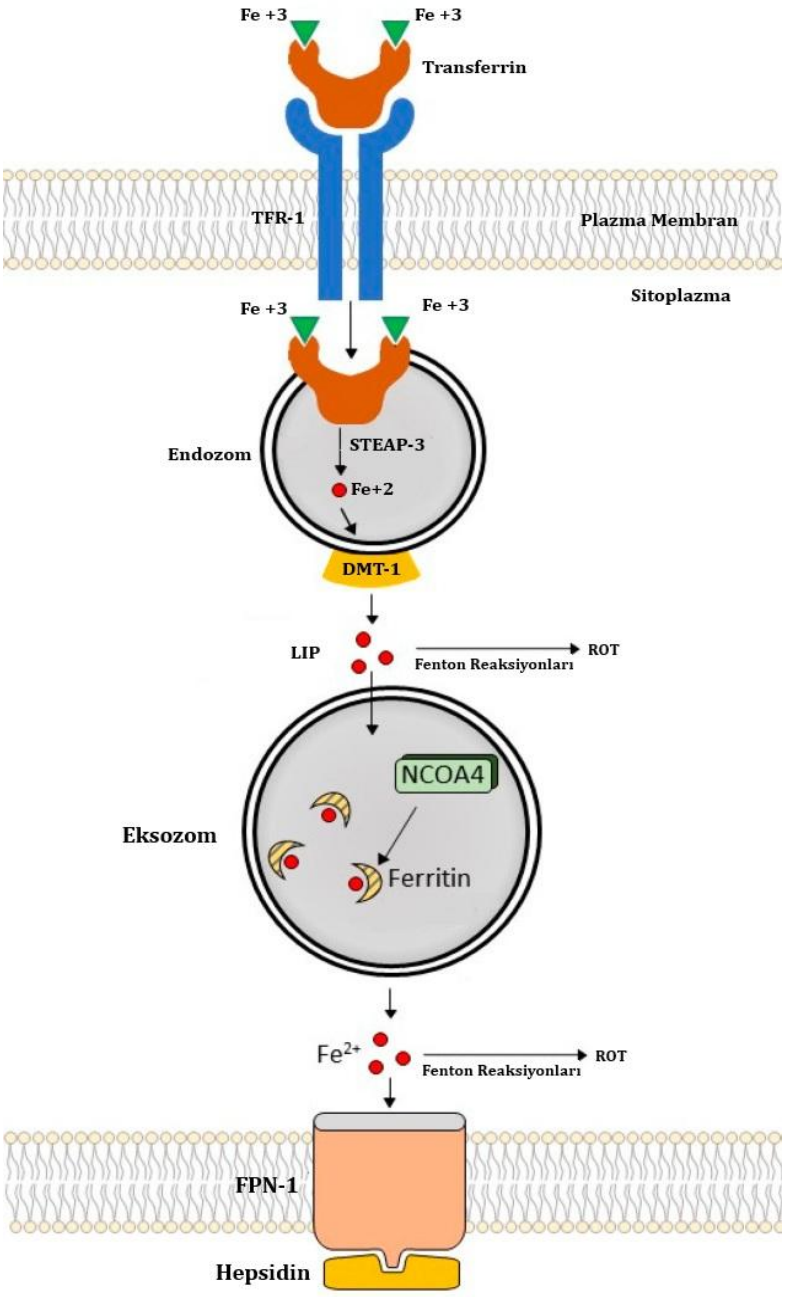
Ferroptoz hücre içi demire bağımlı apoptotik olmayan kontrollü bir hücre ölüm şeklidir (Dixon ve ark., 2012). Hücre içindeki serbest demir, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile Fenton reaksiyonları üzerinden etkileşime girerek hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içeren fosfolipitlerde yoğun lipid peroksidasyonuna, membran sağlamlığının bozulmasına ardından da hücrenin ölümüne yol açar (J. Li ve ark., 2020). Ferroptotik hücre ölümünün ön koşulları hücre çeperindeki okside lipitlerin varlığı, hücre içi demir yükünün artması, antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması, kontrolsüz lipit peroksidasyonunun tetiklenmesi ile sağlanır (Zhou ve ark., 2024).

2.2.1. Ferroptozda Demir Metabolizması

Dolaşımdaki ferrik demir (Fe^{+3}), transferrin/transferrin reseptörü-1 (TF/TFR-1) taşıma sistemi aracılığıyla hücre içine alınır ve metallo redüktaz Prostatın Altı Transmembranlı Epitel Antijeni 3 (STEAP3) tarafından ferröz demir (Fe^{+2}) formuna indirgenir. İndirgenmiş Fe^{+2} divalent metal transporter-1 (DMT1) yoluyla sitoplazmaya taşınır ve DNA sentezi, oksijen taşınması ile metabolik yolakların

düzenlenmesi dâhil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde rol alır (Rochette ve ark., 2022). Hücre demir doygunluğuna ulaştığında ferroportin-1 (FPN-1) isimli taşıyıcı ile hücre dışına çıkartılabilir ya da ferritin proteini içerisinde veya redoksa hazır demir havuzlarında (LIP) depolanabilir (Ganz, 2013; Ward & Kaplan, 2012). Nükleer kargo reseptör koaktivatörü 4 (NCOA4) burada ferritin depolarının parçalanmasını sağlayarak LIP miktarını arttırabilir, bu süreç ferritinofaji olarak bilinir (Mancias ve ark., 2014) (Şekil 2.1).

NADPH-oksidaz, ksantin oksidaz gibi enzimler veya elektron taşıma zinciri ile ortaya çıkan süperoksit anyonları çeşitli dismutaz enzimleri (Süper oksit dismutaz 1 gibi) ile H_2O_2'ye çevrilebilir. Oluşan H_2O_2 ile LIP içerisinde biriken demirlerle fenton reaksiyonlarına girerek reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna yol açmakta ve bu yol ile ferroptoza neden olabilmektedir (Dixon & Stockwell, 2014).



Şekil 2.3. Ferroptozda demir metabolizması

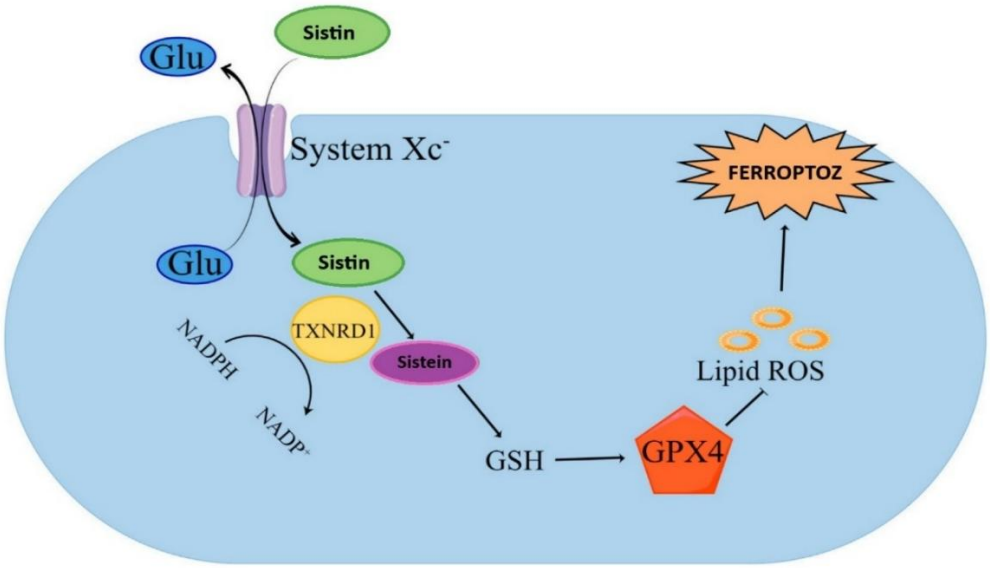
(Ward & Kaplan, 2012)

2.2.2. Ferroptozda Antioksidan Mekanizma

Sistem Xc^- hücre membranında bulunan ve hücre içine sistin alıp, hücre dışına glutamat salınmasını sağlayan bir taşıyıcıdır (Koppula ve ark., 2021). SLC7A11 (Çözünen madde taşıyıcı ailesi 7'nin 11.üyesi) ve SLC3A2 (Çözünen madde taşıyıcı

ailesi 3'ün 2.üyesi) protein birimlerinin kovalent disülfit bağıyla bağlanması ile oluşur. Bu iki alt birimden SLC7A11 sistin ve glutamatın taşınmasını sağlarken, SLC3A2 yapısal bütünlüğü sağlar (Koppula ve ark., 2021). Hücre içine alınan sistin hızlıca tiyoredoksin redüktaz 1 (TXNRD1) enzimi ile sisteine indirgenir (Şekil 2.2). Sistein ve glutamat indirgenmiş glutatyon (GSH) sentezi için kullanılır (20). Üretilen GSH; glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) enziminin substratı olarak antioksidan savunmada görev alır.

GPX4, GSH'ı kullanarak peroksitleri indirgeyebilen bir enzimdir ve antioksidan mekanizmanın çok önemli bir bileşenidir. Kolesterol hidroperoksitlerini ve esterlenmiş okside yağ asitlerini indirgeyebilen tek enzim olan GPX4, bu özelliği sayesinde ferroptozda kilit bir rol üstlenmektedir (W. S. Yang ve ark., 2014).



Şekil 2.4. Sistem Xc^-/ GPX4 yolağı

(Pan ve ark., 2022)

2.2.3. Ferroptozda Lipid Metabolizması

Hücresel membranda bulunan özellikle çoklu doymamış yağ asidi içeren fosfolipitler (PUFA-FP'ler), lipit oksidasyonu ve ferroptozun başlaması için gereklidir. Bunun nedeni, fosfolipitlerde yer alan PUFA zincirlerinin birden fazla çift bağ ve oksidatif hasara son derece duyarlı olan fonksiyonel gruplar içermesidir (W. S. Yang

ve ark., 2016). Bu yapılar oksidasyona uğrayarak fosfolipit hidroperoksitlerine (FL-PUFA-OOH) dönüşürler. PUFA'ların fosfolipitlere eklenmesi, başlıca açil-KoA sentetaz uzun zincir ailesi üyesi 4 (ACSL4) ve lizofosfatidilkolin açiltransferaz 3 (LPCAT3) enzimlerinin aracılık ettiği bir lipit metabolizması sürecini gerektirmektedir. ACSL4, PUFA'ların PUFA-KoA türevlerine dönüştürülmesini katalizler (Dixon ve ark., 2015). Oluşan PUFA-KoA'lar, ardından LPCAT3 tarafından fosfolipit yapısına bağlanarak hücrenin ferroptoza duyarlılığının artmasına yol açar.

Buna karşılık, tekli doymamış yağ asitleri (MUFA'lar), fosfolipit bağlı çoklu doymamış yağ asidi hidroperoksitlerinin (FL-PUFA-OOH) biyosentezini yarışmalı olarak inhibe ederek ferroptoza karşı koruyucu etki gösterir (Qiu ve ark., 2024).

2.2.4. Hastalıklarda Ferroptoz

Son yıllarda yapılan araştırmalar, ferroptozun birçok hastalığın patogenezinde önemli bir hücre ölümü mekanizması olarak rol oynadığını ortaya koymakta ve bu bulgular yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için umut verici bir zemin oluşturmaktadır. Diyabette ferroptoz; yüksek glukoz ortamına bağlı oksidatif stres, GSH tükenmesi ve aşırı demir birikimiyle tetiklenerek pankreas beta hücrelerinin kaybına ve insülin direncine neden olmaktadır (Miao ve ark., 2023). Benzer şekilde, demir ve antioksidan metabolizmasındaki bozukluklar ile aşırı ROT oluşumu, lipid peroksidasyonunu tetikleyerek geri dönüşsüz nöral hasara ve ardından çeşitli nörodejeneratif hastalıklara yol açabilmektedir (Reichert CO & Sampaio-Silva, 2020). Yapılan çalışmalar ferroptozun pulmoner fibrozis (PF), astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve diğer solunum yolu hastalıklarının patogenezinde rol oynadığını göstermektedir (Y. Li ve ark., 2022; L. Yang ve ark., 2022). Kalp, ince bağırsak ve böbrek gibi organlarda gelişen iskemi/reperfüzyon hasarlarında ferroptozun baskılanması umut verici bir terapötik yaklaşım sunmaktadır (Reichert ve ark., 2020). Bazı kanser türlerinde ise, ferroptozu indükleyen yaklaşımların tedavi etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (X. L. Lei ve ark., 2022). Bunun yanında sepsise bağlı sistemik doku ve organ hasarlarının gelişiminde ferroptotik süreçlerin de kritik bir rol oynadığını rapor edilmiştir (G. Lei ve ark., 2022).

2.2.5. Sepsis ve Ferroptoz

Sepsisin temel sebeplerinden biri olan bakterilerin neredeyse tümü enzimatik reaksiyonları için demire ihtiyaç duymaktadır. Bu sebeple insan vücudu sepsis sırasında karaciğerden demirin hücre dışına çıkışını engelleyen hepsidin proteinini sentezler (Drakesmith & Prentice, 2012). Yapılan çalışmalar hepsidinin hücre içi LIP birikimini arttırarak ferroptozu tetikleyebileceğini göstermektedir (L. Li ve ark., 2022). Ferroptozda hücre membranının yapısal düzeninin bozulması ve membran rüptürü temel bir morfolojik özellik olarak karşımıza çıkar (Dixon & Olzmann, 2024). Çalışmalar bütünlüğü bozulan membrandan DAMP'lar da dahil olmak üzere ekstraselüler ortama yayılan hücre içi elemanların immün sistemi etkileyerek inflamatuar bir yanıta sebep olabileceğini göstermiştir (Wen ve ark., 2019). Bunun yanında diğer çalışmalar sepsiste antioksidan mekanizmada bozulmalar ve aşırı ROT oluşumunu bildirmiştir. Hücrede aşırı ROT birikimi endotel disfonksiyondan, doku hasarına ve organ yetmezliğine kadar ilerleyebilen bir yolun başlangıcı olmasının yanı sıra ferroptozun da temel taşlarından biridir (Lu ve ark., 2022; Miliaraki ve ark., 2022).

Sepsis patofizyolojisinde demir metabolizması ve ROT arasında gözlenen yakın ilişki araştırmacıları ferroptoz mekanizmalarının rolünü araştırmaya yönlendirmiştir. Nitekim ferroptoz inhibitörleri, antioksidanlar ve demir şelatörleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda ferroptotik sürecin baskılanmasının inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı, bunun sonucunda da doku ve organ hasarının belirgin şekilde hafiflediği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2026, 2024).

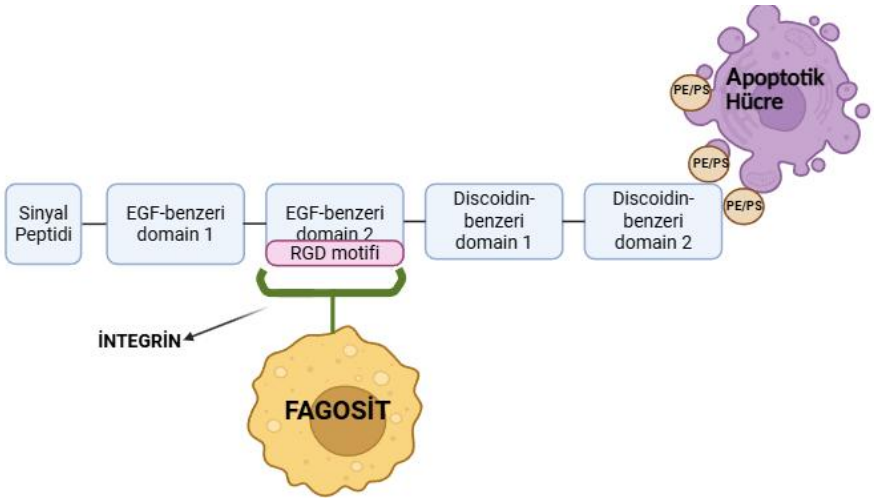
2.3. Süt Yağı Globülü Epidermal Büyüme Faktörü-8 (MFG-E8)

MFG-E8 ya da *Laktadherin*, ilk olarak laktasyon dönemindeki meme bezlerinde tanımlanmış; yağ globülleriyle ilişkili olarak salgılanan ve periferik membrana bağlı bir glikoproteindir (Stubbs ve ark., 1990). Ancak sonraki çalışmalarda insanlarda MFG-E8 geninin dalak, lenf düğümleri, beyin ve akciğerde yüksek miktarda, bağırsak ve karaciğerde daha düşük miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Hanayama ve ark., 2004).

Başlangıçta, MFG-E8'in doku yeniden düzenlenmesi ile ilişkili fizyolojik süreçlerde rol oynadığı ve apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından temizlenmesini kolaylaştırdığı bilinmekteydi. Yapılan son çalışmalar ile MFG-E8'in hücre çoğalması, apoptozun düzenlemesi, bağışıklık modülasyonu, inflamasyon ve oksidatif stres, anjiyogenez ve nörolojik fonksiyon dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik sürece aracılık ettiği gösterilmiştir (D. Li ve ark., 2024; Matsuda ve ark., 2013).

2.3.1. MFG-E8 Moleküler Yapısı ve İşlevi

MFG-E8, 47 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir (Stubbs ve ark., 1990). N-terminalinde MFG-E8'in hücre dışına yönlendirilmesini sağlayan bir sinyal peptiti bulunur. Bunun ardından yapıda epidermal büyüme faktörü (EGF)-benzeri tekrarlar ve discoidin-benzeri domainler yer alır. Bu domainler, sırasıyla EGF ile kan koagülasyon faktörleri V ve VIII'e olan dizi benzerlikleri nedeniyle bu şekilde adlandırılmıştır (Yi, 2016) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. MFG-E8 yapısı

PE: fosfatidiletanolamin PS: fosfatidilserin (BioRender ile oluşturuldu)

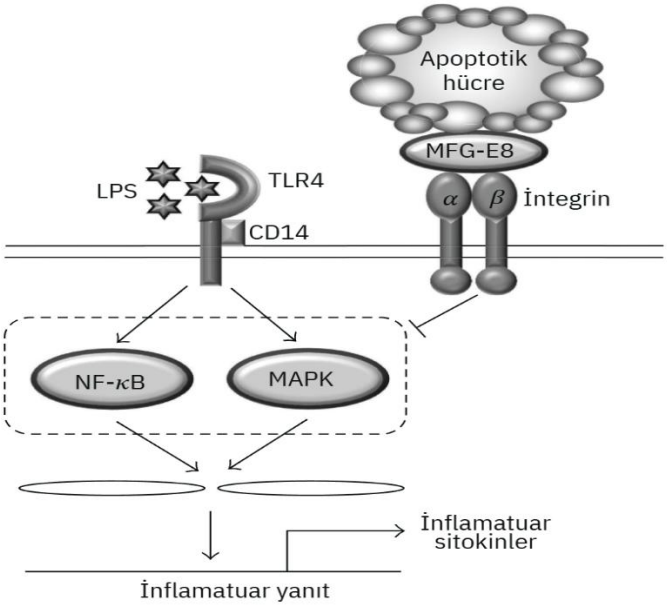
MFG-E8'in yapısında hem EGF-benzeri tekrarlar hem de discoidin-benzeri domainler ikişer kopya halinde bulunur. Bu çift motifli yapı, apoptotik hücrelerin

tanınması ve temizlenmesini kolaylaştıran önemli bir yapısal özelliktir. Özellikle ikinci EGF tekrarında bulunan ve yüksek derecede korunmuş olan arginin-glisin-aspartat (RGD) motifi, fagositik hücrelerin yüzeyinde yer alan integrin reseptörlerine (spesifik olarak integrin $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ reseptörleri) bağlanma açısından kritik öneme sahiptir.

Proteinin C-terminalinde yer alan discoidin-benzeri domainler ise apoptotik hücrelerin tanınmasında görev alır. Bu domainler, apoptoz sırasında hücre dışına salınan fosfatidilserin (FS) ve fosfatidiletanolamin (FE) ile etkileşime girerek apoptotik hücrelerin fagositler tarafından tanınmasını sağlar. Bu özellikler sayesinde MFG-E8, apoptotik hücreler ile fagositik hücreler arasında bir "köprü molekülü" görevi görür (Hanayama ve ark., 2002).

Apoptotik süreçteki hücreler tarafından hücre yüzeyinde sergilenen "beni ye" sinyalleri, profesyonel fagositler olarak sınıflandırılan makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından kısa sürede tanınır ve ardından bu apoptotik hücreler fagosite edilir (Ravichandran, 2010). Efferositoz adı verilen bu süreç doku homeostazının sağlanması için büyük öneme sahip olmasının yanı sıra hali hazırda hasar görmüş dokuların tamir edilmesinde ilk basamaklardan birini oluşturur (Boada-Romero ve ark., 2020). Çalışmalar apoptotik hücrelerin fagositozu sonrasında, tümör büyüme faktörü-β1 (TGF-β1) ve prostaglandin 2 (PGE2) gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretiminin arttığı, buna karşılık interlökin-8 (IL-8) ve TNF-α gibi inflamatuar sitokinlerin salınımının baskılandığını göstermiştir (Fadok ve ark., 1998; McDonald ve ark., 1999). Bu mekanizma sayesinde çevre dokular, ölmekte olan hücrelerin içerdiği inflamatuar bileşenlere maruz kalmaktan korunarak istenmeyen bir inflamatuar yanıtın gelişimi önlenir (Doran ve ark., 2020).

MFG-E8, apoptotik hücrelere bağımlı ya da bağımsız bir şekilde, inflamatuar yolakları aşağı yönlü regüle edebilmektedir. Yapılan çalışmalar, mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK), p38, ekstraselüler sinyal düzenli kinaz (ERK) 1/2 ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) gibi inflamatuar hücre içi sinyal moleküllerinin aktivitelerinin bastırılmasında etkisi olduğunu göstermiştir (Yi, 2016) **(**Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. MFG-E8'in anti-inflamatuar yolağı

(Yi, 2016)

2.4. Sepsis, Ferroptoz ve MFG-E8 İlişkisi

Literatürde MFG-E8'in inflamatuar hastalıklardaki rolü görece daha çok çalışılmış olmakla birlikte, ferroptozla ilişkisini doğrudan ele alan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır ve bu çalışmalar farklı hastalık modellerine dağılmıştır. İnflamasyon ile ilişkili hastalıklar açısından incelendiğinde, MFG-E8 ile romatoid artrit, koroner vaskülit, pankreatit, inflamatuar bağırsak hastalıkları, steatohepatit gibi geniş yelpazede yapılan çalışmalar mevcuttur.

MFG-E8 geni nakavt edilmiş farelerde oluşturulan serum transfer artrit (STA) modelinde, artritin daha ağır seyrettiği, eklemlerde nötrofil sayısının arttığı ve hem lokal hem sistemik kemik kaybının belirginleştiği gösterilmiştir (Albus ve ark., 2016). Candida albicans su-çözünür fraksiyonu (CAWS) ile oluşturulan fare koroner vaskülit modelinde ise, ekzojen uygulanan MFG-E8 koroner arter inflamasyonunu hafifletmiş ve oksidatif stresi azaltmıştır (Pei ve ark., 2025).

MFG-E8'in koruyucu etkisi doku hasarı ve onarımı bağlamında da görülmektedir. Kronik pankreatit modelinde, MFG-E8 geninin susturulması

pankreatik fibrozu ağırlaştırmış, hastalık gelişimiyle birlikte pankreas dokusundaki MFG-E8 düzeylerini azaltmıştır. Rekombinant MFG-E8 uygulamasının ise, fibrözü hafifletirken aynı zamanda oksidatif stres yükünü de azalttığı gösterilmiştir (Ren ve ark., 2021). Farklı organ ve hastalık modellerinden elde edilen bu bulguların ortak paydası, MFG-E8'in inflamatuar yanıtı sınırlaması, oksidatif stresi baskılaması ve doku rejenerasyonunu desteklemesidir.

MFG-E8'in sepsisteki rolünü inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Yapılan bir deney hayvanı çalışmasında, LPS uygulamasının MFG-E8'i inhibe ettiği ve LPS enjeksiyonunun dalak MFG-E8 mRNA ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2023). Hem MFG-E8- içeren ekzozomlar hem de rekombinant fare MFG-E8 uygulanan bir sıçan modelinde, sepsiste hayatta kalma oranını yaklaşık olarak %80'e çıkarmıştır. Buna ek olarak, MFG-E8'in protein ekspresyonunun sıçan çekal ligasyonu ile indüklenen sepsis modelinden 20 saat sonra önemli ölçüde azaldığı (dalakta %48 oranında ve karaciğerde %70 oranında) gösterilmiştir (Matsuda ve ark., 2013).

Sepsis, oksidatif stres, doku hasarı ve inflamasyonun çok belirgin biçimde kesiştiği klinik tablolardan biridir. Literatürde sepsis kaynaklı ferroptotik süreçte MFG-E8'in etkisini inceleyen yalnızca bir çalışmaya rastlanmıştır (Wu ve ark., 2022). Bu çalışmada hem çekal ligasyon ve delme yöntemi (CLP) ile sepsis modeli oluşturulan fareler kullanılmış hem de sepsisli hastalar değerlendirilmiştir. Sepsis modeli oluşturulan farelerin karaciğerinde zamanla GPX4 kaybı, GSH azalması, MDA ve Fe^{+2} düzeylerinde artış saptanmıştır. Rekombinant MFG-E8 uygulaması sonrasında ise, GSH ve GPX4 düzeyleri yükselmiş, MDA düzeyinin ve Fe^{+2} birikimi azalmıştır. Septik hastalarda serum MFG-E8 düzeyinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu, hastalık şiddeti ile negatif ilişkili olduğu ve düşük MFG-E8 düzeyine sahip hastalarda 28 günlük sağkalımın anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, MFG-E8'in ferroptozu ve oksidatif stresi baskılayarak karaciğer hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve sağkalımı belirgin biçimde iyileştirdiği öne sürülmüştür.

Buna karşı Kuroda ve arkadaşları, metabolik disfonksiyon ilişkili steatohepatitte (MASH) viseral yağ dokusundan salgılanan MFG-E8'in karaciğer

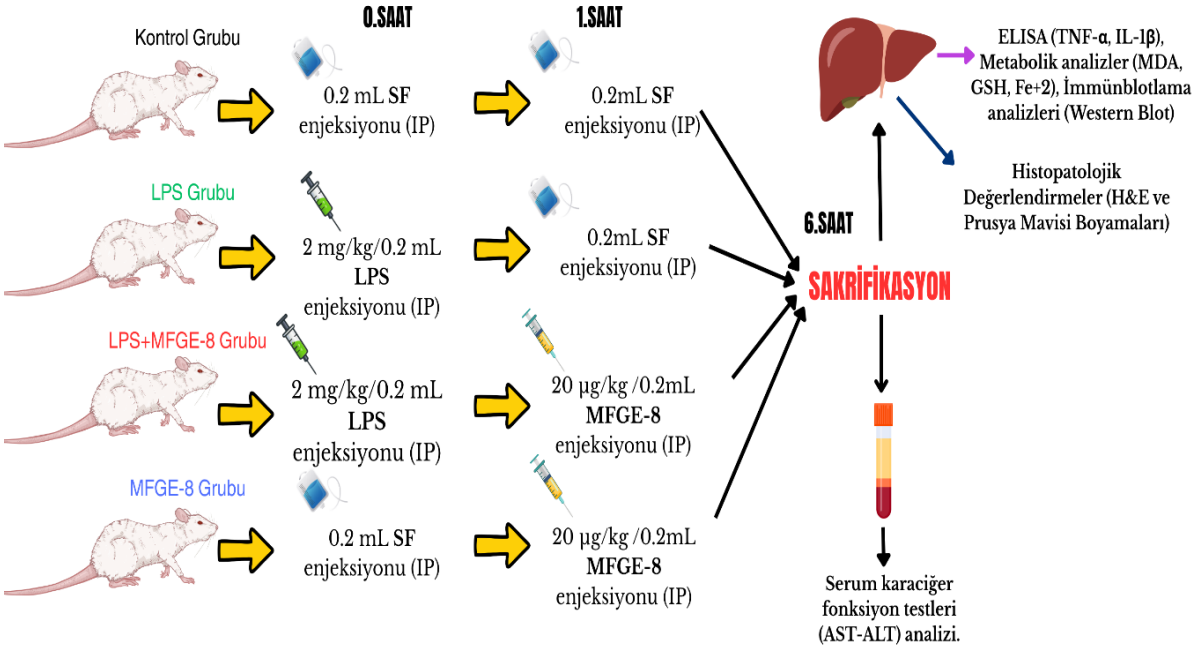
inflamasyonunu ve fibrozunu kötüleştiren bir aracı molekül olduğunu göstermiştir. Obez farelerin yağ dokusunda aşırı eksprese olduğu saptanan MFG-E8'in, STAM-MASH modelinde genetik olarak silinmesi; steatozu ve hepatik trigliserit içeriğini değiştirmeksizin lobüler inflamasyonu ve balonlaşmayı, inflamatuar sitokin ile tip I kollajen mRNA düzeylerini, serum karaciğer enzimlerini ve fibrozu anlamlı biçimde azaltmış, ortalama sağkalım süresini günden güne uzatmıştır. Buna karşılık MFG-E8 nakavt farelere MFG-E8 içeren ekstraselüler vezikül uygulanması hepatik inflamasyonu yeniden artırarak koruyucu etkiyi ortadan kaldırmış; hücre kültüründe ise makrofajlarda inflamatuar sitokin ekspresyonu ortama ekzojen MFG-E8 eklenmesiyle daha da yükselmiştir. Yazarlar bu bulgulara dayanarak, yağ dokusu kaynaklı MFG-E8'in dolaşım yoluyla karaciğere ulaşarak makrofaj–hepatosit etkileşimini güçlendirdiğini ve lipit metabolizmasından bağımsız olarak MASH patogenezine katkıda bulunduğunu öne sürmüştür (Kuroda ve ark., 2026).

Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızda LPS ile oluşturulan sepsise bağlı akut karaciğer hasarı modelinde, ekzojen olarak uygulanan MFG-E8'in kısa süreli tedavisinin ferroptotik biyobelirteçler üzerindeki olası etkilerini inceledik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı Çalışmaları

Çalışmaya 24/04/2025 tarihli ve 2025/4-2 karar nolu Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı alındıktan sonra başlandı. Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 36 adet yetişkin Wistar albino erkek sıçan (8-10 haftalık, canlı ağırlıkları 250-350 gr) dahil edildi. Sıçanlar deney boyunca 20-22 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık döngü içinde tutuldu. Bu süreçte tüm sıçanlar standart sıçan yemi ve suyu ile beslendi. Bir haftalık alışma süresi sonrasında çalışma başlatıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Deney akış şeması

3.1.1. Deney Grupları ve İlaç Uygulamaları

Hayvanlar vücut ağırlıkları dengeli olacak şekilde rastgele dört gruba bölündü. Tüm uygulamalar intraperitoneal olarak gerçekleştirildi.

Grup 1. Kontrol grubu (K) (n=8): 0.2 mL serum fizyolojik (%0.9 izotonik sodyum klorür, Polifleks, Polifarma) enjeksiyonu ardından 1 saat sonra 0.2 mL serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup 2. LPS ile oluşturulan sepsis modeli grubu (L) (n=10): LPS (E.coli, O111:B4 serotip, Sigma L2630) liyofilize halde satın alındı ve serum fizyolojik içinde (%0.9 izotonik sodyum klorür, Polifleks, Polifarma) çözülerek hazırlandı. LPS, 2 mg/kg/0.2 mL olacak şekilde tek doz uygulandı (Fang ve ark., 2018; L. Xie ve ark., 2023). 1 saat sonra 0.2 mL serum fizyolojik uygulandı.

Grup 3. LPS uygulaması sonrası MFG-E8 enjeksiyonu (LM) (n=10): Tek doz olarak 2 mg/kg/0.2 mL LPS uygulandıktan 1 saat sonra serum fizyolojik ile çözülen MFG-E8 (fare kaynaklı, MedChemExpress HY-P77749) 20 μg/kg/0.2 mL olacak şekilde tek doz olarak enjekte edildi (Cui ve ark., 2024; Wu ve ark., 2022).

Grup 4. MFG-E8 uygulaması grubu (M) (n=8): 20 μg/kg/0.2 mL MFG-E8 uygulandıktan 1 saat sonra 0.2 mL serum fizyolojik enjekte edildi

3.1.2. Sakrifikasyon

LPS uygulaması sonrasında hayvanlar 6. saatte ketamin (90 mg/kg) / xylazine (5 mg/kg) ile anestezi verilerek eksanguinasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası hayvanlardan kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Karaciğer dokusu medyan lobundan alınan doku örnekleri histopatolojik çalışmalar için formol içeren kaplara ayrıldı. Diğer çalışmalar için sol lateral lobdan alınan kısımlar ependorflara alınarak -80 °C'de saklandı. Kan örnekleri sarı kapaklı jelli kan tüplerine alındıktan sonra 20-25 dakika oda sıcaklığında bekletilerek pıhtılaşmaları sağlandı ve +4 °C'de 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi.

3.2. Hepatik Histopatolojik Değerlendirme

3.2.1. Hematoksilen & Eozin Boyaması

Histopatolojik değerlendirme için alınan karaciğer örnekleri %10 formaldehit ile fikse edilip doku takip işlemleri sonrası parafine gömüldü. 5 μm kalınlığında kesitler alınarak slaytlara yerleştirilip, hematoksilen&eozin ile boyandı. Tüm örnekler ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Karaciğer hasarı; mononükleer hücre infiltrasyonu, konjesyon ve vakuolleşme varlığı açısından 0: yok, 1: hafif, 2: orta ve 3: şiddetli olacak şekilde her biri için ayrı ayrı skorlanarak değerlendirildi (Akin ve ark., 2025; Bi ve ark., 2020).

3.2.2. Karaciğer Dokusunda Prusya Mavisi Boyaması

Hepatik dokuda demir depolarının varlığını göstermek için doku kesitleri prusya mavisi ile boyandı ve ImageJ uygulamasında analiz edildi. Analizlerde preperatlar n=4 olarak alındı.

3.3. Serum Karaciğer Fonksiyon Testleri

Serum aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri kolorimetrik yöntem esasına dayanan ticari kitler kullanılarak otoanalizörde (MINDRAY BS-400, Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd., Shenzhen, Çin) ölçüldü. AST ve ALT analizleri Otto Scientific firmasından hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

3.4. Karaciğer Dokusunda ELISA Analizleri

IL-1β ve TNF-α düzeyleri ticari olarak satın alınan ELISA kitleri (Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin; Kat. No: E-EL-R0012 ve Kat. No: E-EL-R2856,

sırasıyla) kullanılarak, üretici firmanın talimatları doğrultusunda analiz edildi. IL-1β için ölçüm aralığı 31.25-2000 pg/mL (duyarlılık 18.75 pg/mL), TNF-α için ölçüm aralığı 15.63-1000 pg/mL (duyarlılık 9.38 pg/mL)'dir.

Doku örnekleri öncelikle, kanın uzaklaştırılması amacıyla soğuk PBS (0.01 M, pH 7.2-7.4) ile yıkandı. Ardından dokular küçük parçalar hâlinde kesilerek, proteaz inhibitörü içeren PBS ile homojenizatöre (Stuart SHM1, Cole-Parmer, Nottingham, Birleşik Krallık) aktarıldı. Doku/homojenat oranı 1:9 olacak şekilde ayarlandı. Örnekler buz üzerinde homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar +4 °C'de 5.000 × g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatanlar toplanarak analiz için ayrıldı. TNF-α için, doku homojenatları distile su ile 1:20 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

Her iki kitin çalışma prensibi sandviç ELISA esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde örnekte bulunan hedef protein, mikroplak kuyucuklarına önceden kaplanmış antikor tarafından spesifik olarak bağlanmakta, ardından biyotinlenmiş dedeksiyon antikoru tarafından tanınarak sandviç immün kompleksi oluşturmaktadır. Oluşan bu komplekse avidin-horseradish peroksidaz (HRP) konjugatının bağlanmasıyla enzimatik sinyal amplifikasyonu sağlanmaktadır. Kromojenik substrat eklenmesinin ardından HRP enzimi tarafından katalizlenen renkli ürün oluşumu 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, ABD). Dört parametreli logistik eğri (4PL) ile çizilen standart grafiği kullanılarak örneklerdeki IL-1β ve TNF-α konsantrasyonları hesaplandı.

3.5. Karaciğer Dokusunda Metabolik Analizler

3.5.1. Karaciğer Dokusunda MDA Ölçümü

Doku MDA düzeyleri, tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemi esasına dayanan kolorimetrik bir analiz kiti (Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin; Kat. No: E-BC-K025-M) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda ölçüldü. Kitin ölçüm aralığı 2.92-40 μmol/L, analitik duyarlılığı 1.13 μmol/L'dir.

Doku örnekleri soğuk PBS (0.01 M, pH 7.4) ile yıkandıktan sonra PBS (0.01 M, pH 7.4) içerisinde +4 °C'de homojenizatör (Stuart SHM1, Cole-Parmer, Nottingham, Birleşik Krallık) kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar, çözünmeyen materyalin uzaklaştırılması amacıyla +4 °C'de 10.000 × g'de 10 dakika santrifüj edildi.

Yöntem, lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek 532 nm'de maksimum absorpsiyon veren bir bileşik oluşturması esasına dayanmaktadır. Doku MDA düzeyleri doku proteinine oranlanarak µmol/g protein cinsinden ifade edildi.

3.5.2. Karaciğer Dokusunda Ferröz Demir (Fe^{2+}) Ölçümü

Doku ferröz demir (Fe^{2+}) düzeyleri, kolorimetrik bir kit (Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin; Kat. No: E-BC-K773-M) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda ölçüldü. Kitin ölçüm aralığı 0.4-50 µmol/L, analitik duyarlılığı ise 0.4 µmol/L'dir.

Doku örnekleri soğuk PBS (0.01 M, pH 7.4) ile yıkandıktan sonra, +4 °C'de Dounce homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar, çözünmeyen materyalin uzaklaştırılması amacıyla +4 °C'de 10.000 × g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatanlar toplandı. Örneklerin hazırlanması ve aktarılması sırasında demir içeren malzemeler kullanılmamış ve kontaminasyondan kaçınılmıştır.

Yöntem, kit reaktifleri içerisinde bulunan bileşikler ile Fe^{2+} 'nin birleşerek 593 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren renkli kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Homojenizasyon sonrası iki kat dilüe edilen örneklerin absorbans değerleri üzerinden demir konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar µmol/kg yaş doku ağırlığı cinsinden ifade edildi.

3.5.3. Karaciğer Dokusunda Hücre İçi İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Ölçümü ve Total GSH/GSSG Oranı

Doku total glutatyon (T-GSH) ve okside glutatyon (GSSG) düzeyleri, kolorimetrik bir kit (Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin; Kat. No: E-BC-K097-M) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda ölçüldü. Kitin ölçüm aralığı T-GSH için 0.36-30 µmol/L, analitik duyarlılığı ise 0.36 µmol/L'dir.

Doku örnekleri soğuk PBS (0.01 M, pH 7.4) ile yıkandıktan sonra, protein çöktürücü çözelti içerisinde +4 °C'de Dounce homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar, çözünmeyen materyalin uzaklaştırılması amacıyla +4 °C'de 10.000 × g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatanlar toplandı. Elde edilen süpernatanlar, ölçüm öncesinde protein çöktürücü çözelti ile 50 kat dilüe edilerek kullanıldı.

Yöntemin esasını, GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi ile GSH'ye indirgenmesi ve GSH'nin Ellman Reaktifi (DTNB) ile reaksiyona girerek GSSG ile birlikte sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asit (TNB) oluşturması oluşturmaktadır. Oluşan sarı renkli TNB miktarı total glutatyon (GSH + GSSG) miktarı ile orantılı olduğundan, 412 nm'de ölçülen absorbans üzerinden total glutatyon düzeyi hesaplandı. GSSG ölçümünde ise örnekteki indirgenmiş GSH, GSH tutucu (scavenger) ile uzaklaştırıldıktan sonra aynı reaksiyon prensibi uygulandı ve 412 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. İndirgenmiş glutatyon düzeyi ise "GSH = T-GSH – (2 × GSSG)" eşitliği ile hesaplandı. Sonuçlar µmol/g protein cinsinden ifade edildi.

3.6. Doku Total Protein Analizi

Doku homojenatlarındaki total protein konsantrasyonu, Bradford (1976) tarafından tanımlanan kolorimetrik yönteme göre belirlendi. Analizde ticari Bradford reaktifi (SK3021, Bio Basic, Markham, ON, Kanada) kullanıldı ve uygulama üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Yöntem, asidik ortamda bulunan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerin başta arginin ve lizin olmak üzere bazik ve aromatik amino asit

kalıntılarına bağlanması esasına dayanmaktadır. Boya, serbest hâldeyken kırmızımsı-kahverengi (maksimum absorpsiyon 465 nm) renkte iken, proteine bağlandığında anyonik forma geçerek mavi renge dönüşmekte ve maksimum absorpsiyonu 595 nm'ye kaymaktadır. Ortamdaki protein konsantrasyonu 595 nm'de ölçülen absorbansın 465 nm'de ölçülen absorbansa oranı ile doğru orantılıdır ve konsantrasyon, sığır serum albümini (BSA) ile oluşturulan standart eğri üzerinden hesaplandı (Ernst & Zor, 2010).

3.7. Western Blot Analizi

GPX4 ve ACSL4 protein düzeyleri Western blot yöntemi ile belirlendi ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) iç kontrol proteini olarak kullanıldı. Analizlerde preparatlar n=4 olarak alındı.

50 mg doku örneği, RIPA tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli karışımı içerisinde manyetik boncuklar ile 3200 rpm'de homojenize edilmiş ve homojenatlar +4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Protein konsantrasyonları Qubit Protein BR Assay Kit ile Qubit 4 florometre cihazında ölçülmüştür. Örnekler 3:1 oranında ve %10 indirgeyici ajan içeren 4X Laemmli tamponu ile hazırlanarak 70°C'de 10 dakika inkübe edilmiş; jelin ilk kuyucuğuna 5 µL protein markerı, diğer kuyucuklara ise protein örnekleri yüklenmiş ve sistem 110 V'ta 60-90 dakika çalıştırılmıştır. Membran %100 metanol içinde aktive edilip 1X transfer tamponunda dengelendikten sonra, filtre kâğıdı–membran–jel–filtre kâğıdı sıralamasıyla hazırlanan düzenekte Power Blotter XL sistemi kullanılarak transfer gerçekleştirilmiştir. Membran, %5'lik BSA çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat bloklanmış; ardından %3'lük BSA içerisinde 1:2000 oranında GPX4, 1:20,000 oranında ACSL4 ve 1:100,000 oranında GAPDH primer antikorları ile +4 °C'de karanlıkta gece boyunca inkübe edilmiştir. 1X TBS-T ile 5'er dakika olmak üzere beş kez yıkanan membrana, %3'lük BSA içerisinde 1:15,000 oranında anti-rabbit ve 1:6000 oranında anti-mouse sekonder antikorları eklenerek oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübe edilmiş ve yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Görüntüleme, Clarity Western ECL Substrate kullanılarak iBright CL750 sisteminde yapılmış ve elde edilen görüntüler iBright Analysis Software (IBA) ile analiz edilmiştir.

GPX4 ve ACSL4 proteinlerine ait dansite değerleri, aynı örneğe ait GAPDH dansite değerine bölünerek normalize edilmiştir. Analizler için Otto Scientific firmasından hizmet alımı yapılmıştır.

3.8. İstatistiksel Analiz

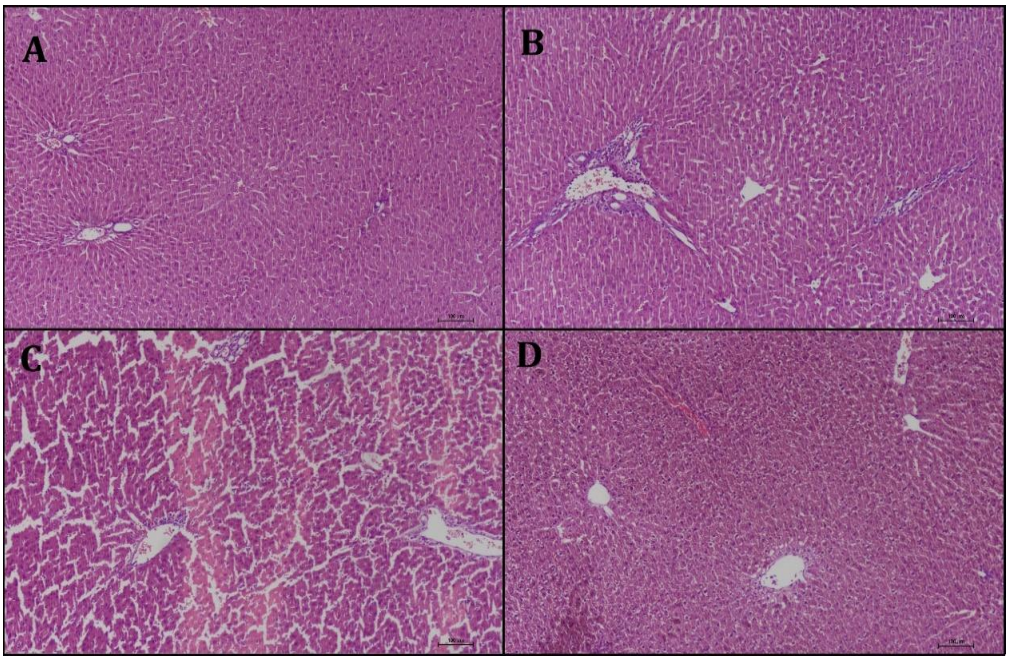
Çalışmadan elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0, IBM Corp., Armonk, ABD) ve GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, ABD) paket programları kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren ve varyansları homojen olan verilerde gruplar arasındaki farklılıklar one-way ANOVA ile incelendi; ANOVA sonucunda anlamlı fark saptanan parametrelerde farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla, çoklu karşılaştırmalarda ortaya çıkan I. tip hata artışını kontrol etmek üzere post-hoc Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Tüm analizler çift yönlü (two-tailed) olarak yapıldı ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hepatik Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

4.1.1. Hematoksilen & Eozin Boyaması

Karaciğer hasarı mononükleer hücre infiltrasyonu, konjesyon ve vakuolleşme açısından bireysel skor derecelendirmesi (0: yok, 1: hafif, 2: orta ve 3: şiddetli) ile değerlendirildi. Fotomikrograflar ve skor değerlendirmeleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Hematoksilen & Eozin ile boyanmış karaciğer doku örneklerinin fotomikrografları (x10)

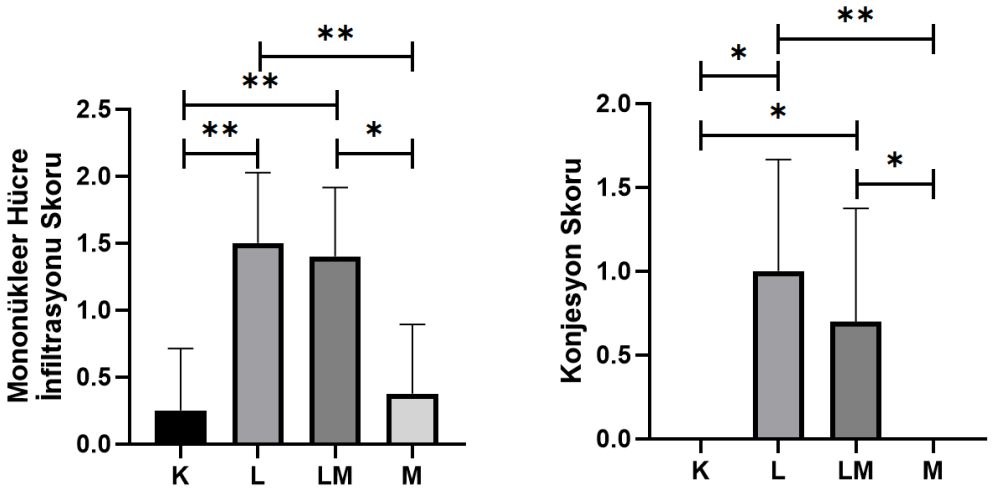
(A=Kontrol Grubu, B=LPS grubu, C=LPS+MFG-E8 grubu, D=MFG-E8 grubu)

Mononükleer hücre infiltrasyonu açısından bakıldığında; LPS grubu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.0042). LPS sonrası MFG-E8 uygulaması LPS grubuna göre azalma gösterdi, ancak bu azalma anlamlı değildi (p>0.05). MFG-E8 uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı fark yoktu (p>0.05).

LPS grubu MFG-E8 grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0.0097). Benzer şekilde, LPS+MFG-E8 grubu hem kontrol grubuna (p=0.0070) hem de MFG-E8 grubuna (p=0.0235) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Konjesyon açısından bakıldığında; LPS grubu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.0012). LPS sonrası MFG-E8 uygulaması, LPS grubuna kıyasla azalma sağlamış olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. LPS grubu MFG-E8 grubuna göre (p=0.0012), LPS+MFG-E8 grubu ise hem kontrol grubuna (p=0.0369) hem de MFG-E8 grubuna (p=0.0012) göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Hiçbir grupta vakuolleşme gözlemlenmedi.



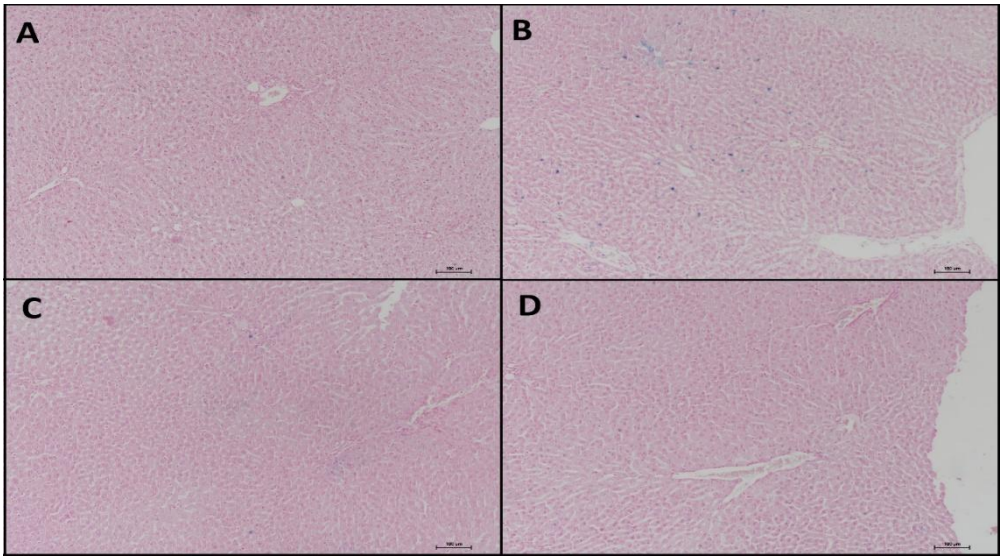
Şekil 4.2. Mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyon skorları

(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)

*(*p<0.05, **p<0.01)*

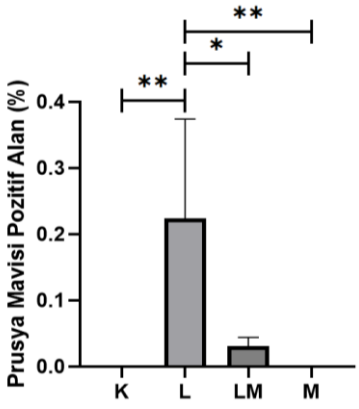
4.1.2. Prusya Mavisi Boyaması

Prusya mavisi ile boyanmış örnekler ve Prusya pozitif alan (%) sonuçları Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. LPS grubu, kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0.0076). LPS sonrası uygulanan MFG-E8'in LPS grubuna göre demir depolarını anlamlı düzeyde azalttığı gözlendi (p=0.0217), LPS grubu MFG-E8 grubuna göre anlamlı derecede yüksektir (p=0.0076).



Şekil 4.3. Prusya mavisi ile boyanmış karaciğer doku örneklerinin fotomikrografları (10x)

(A=Kontrol grubu, B=LPS grubu, C=LPS+MFG-E8 grubu, D=MFG-E8 grubu)



Şekil 4.4. Prusya mavisi pozitif alan grafiği (n=4)

(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)

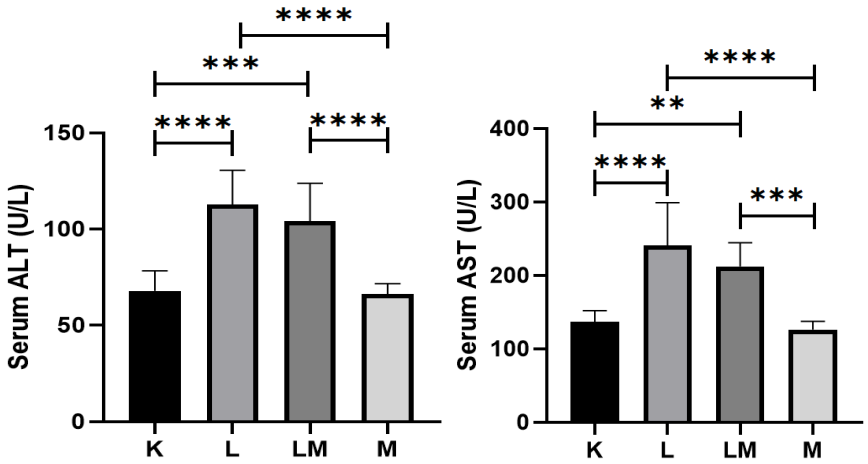
*(*p<0.05, **p<0.01)*

4.2. Serumda Karaciğer Fonksiyon Testleri

Deney gruplarının serum AST ve ALT düzeylerinin karşılaştırması Şekil 4.5'te verilmiştir.

LPS grubunun AST düzeyi (240.4 ± 58.55 U/L) kontrol grubuna (136.6 ± 15.40 U/L) göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.0001$). LPS ve LPS+MFG-E8 (212 ± 32.34 U/L) grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.6899$). Kontrol ve MFG-E8 grupları (126.3 ± 11.02 U/L) arasında anlamlı bir fark yoktu. LPS grubu MFG-E8 grubuna göre anlamlı yüksek ($p<0.0001$), LPS+MFG-E8 grubu ise hem kontrol hem de MFG-E8 gruplarına göre AST düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.0018$, $p=0.0004$).

LPS grubunun ALT değerlerinin (112.9 ± 17.72 U/L) kontrol grubuna (67.95 ± 10.35 U/L) göre yüksekliği anlamlı bulundu ($p<0.0001$). LPS+MFG-E8 grubu (104.2 ± 19.59 U/L) LPS grubuna göre bir düşüş göstermiş, ancak fark anlamlı değildi ($p>0.05$). Kontrol ve MFG-E8 grubu (66.33 ± 5.41 U/L) arasında fark yoktu. LPS grubunun MFG-E8 grubuna olan yüksekliği ($p<0.0001$) ve LPS+MFG-E8 grubunun kontrol ve MFG-E8 gruplarına olan yüksekliği (sırasıyla; $p=0.0002$, $p<0.0001$) anlamlı bulundu.



Şekil 4.5. Serum AST ve ALT düzeyleri

(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)

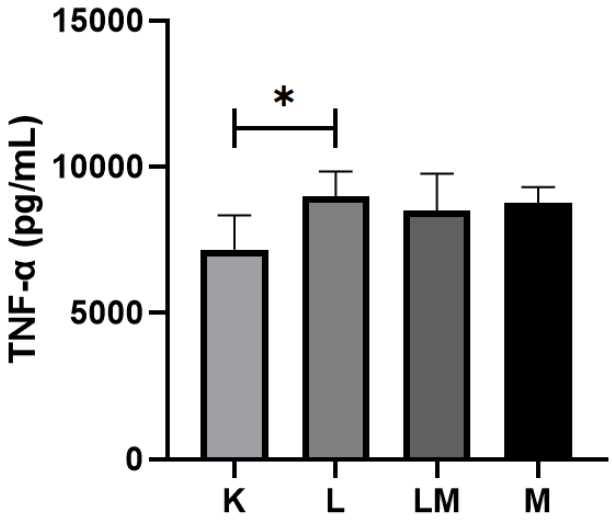
*(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)*

4.3. Karaciğer Dokusunda ELISA Analiz Sonuçları

4.3.1. TNF-α Ölçümü

Deney gruplarının karaciğer TNF-α düzeyleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

TNF-α düzeyleri LPS grubunda (8993 ± 849.4 pg/mL) kontrol grubuna (7166 ± 1184 pg/mL) göre anlamlı yüksek bulundu (p=0.0237). LPS sonrası MFG-E8 uygulanan grupta (8495 ± 1268 pg/mL) LPS grubuna göre azalma olsa da, bu fark anlamlı bulunmadı (p>0.05). Kontrol ve MFG-E8 grubu (8754 ± 556.3 pg/mL) arasında anlamlı fark yoktu (p=0.0877).



Şekil 4.6. Karaciğer dokusunda TNF- α düzeyleri

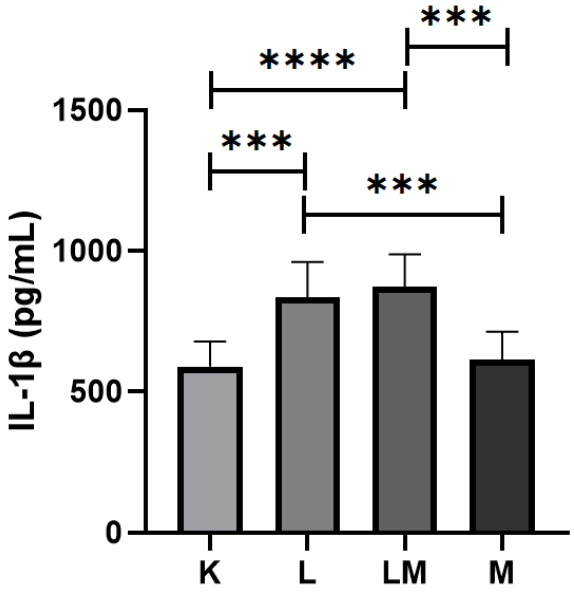
(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)

4.3.2. IL-1β Ölçümü

Deney gruplarının karaciğer IL-1β içeriğinin değişimi Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

LPS grubu IL-1β düzeylerinin (835.8 ± 124.9 pg/mL) kontrol grubuna (589.1 ± 88.98 pg/mL) göre yüksekliği anlamlı bulundu (p=0.0003). LPS sonrası MFG-E8 uygulaması grubu (872.8 ± 115.4 pg/mL) ile LPS grubu arasında anlamlı bir fark yoktu (p>0.05). Kontrol grubu ile MFG-E8 grubu (613.6 ± 99.56 pg/mL) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05).

LPS grubunun IL-1β düzeyleri MFG-E8 grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (p=0.0010) ve LPS+MFG-E8 grubunun düzeyleri K ve MFG-E8 gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla; p<0.0001, p=0.0001).



Şekil 4.7. Karaciğer dokusunda IL-1β düzeyleri

(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)
*(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)*

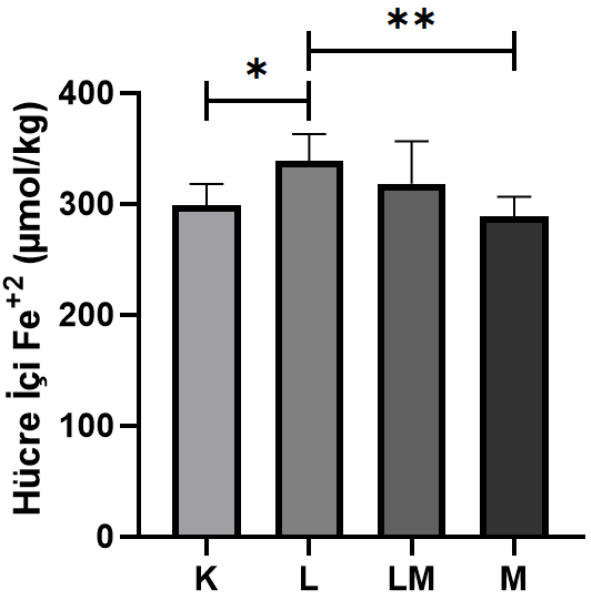
4.4. Karaciğer Dokusunda Metabolik Analizlerinin Sonuçları

4.4.1. Hücre İçi Fe^{+2} Düzeyinin Ölçümü

Deney gruplarının hücre içi Fe^{+2} düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

LPS grubunun (338.8 ± 24.17 µmol/kg ıslak doku) kontrol grubuna göre (298.5 ± 19.17 µmol/kg ıslak doku) hücre içi Fe^{+2} düzeyleri anlamlı yüksek bulundu (p=0.0212). LPS+MFG-E8 grubunun düzeyi (318.2 ± 38.33 µmol/kg ıslak doku) LPS grubuna göre düşüktü ancak bu düşüş anlamlı değildi (p=0.5839). Kontrol grubu ile MFG-E8 grubu (288.9 ± 17.49 µmol/kg ıslak doku) arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

LPS grubu hücre içi Fe^{+2} düzeyleri MFG-E8 grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (p=0.0028).



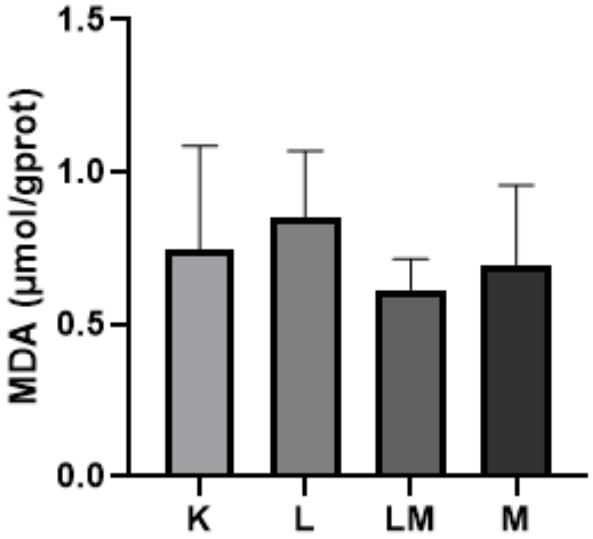
Şekil 4.8. Karaciğer dokusunda hücre içi Fe^{+2} düzeyleri

(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)
*(*p<0.05, **p<0.01)*

4.4.2. MDA Ölçümü

Deney gruplarının MDA düzeyleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

LPS grubunun MDA düzeyi kontrol grubuna göre yüksek ancak anlamlı değildi ($p>0.05$). LPS sonrası MFG-E8 uygulanan grupta LPS grubuna ($p=0.1901$) kıyasla gözlenen azalma anlamlı bulunmamıştır. Diğer grup karşılaştırmalarında MDA düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktu. Doku MDA düzeyleri kontrol grubunda 0.74 ± 0.33 µmol/gprot, LPS grubunda 0.85 ± 0.21 µmol/gprot, LPS+MFG-E8 grubunda 0.61 ± 0.10 µmol/gprot, MFG-E8 grubunda ise 0.69 ± 0.26 µmol/gprot olarak ölçüldü.



Şekil 4.9. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri

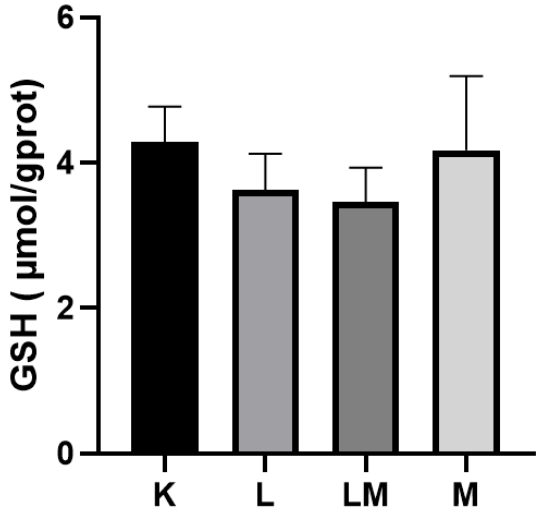
(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)

4.4.3. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Düzeyi Ölçümü

Deney gruplarında GSH değişimleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

GSH düzeyleri kontrol grubunda 4.28 ± 0.49 µmol/gprot, LPS grubunda 3.62 ± 0.49 µmol/gprot, LPS+MFG-E8 grubunda 3.45 ± 0.47 µmol/gprot ve MFG-E8 grubunda 4.17 ± 1.01 µmol/gprot olarak ölçülmüştür.

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 4.10. Karaciğer dokusunda hücre içi GSH düzeyleri

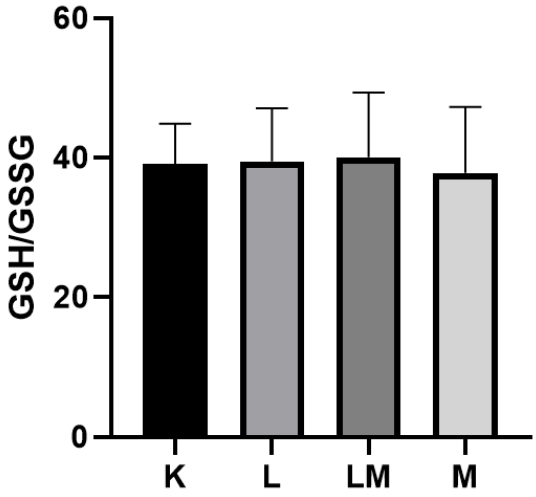
(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)

4.4.4. Total Glutatyon (T-GSH)/Yükseltgenmiş Glutatyon (GSSG) Oranı Ölçümü

Deney gruplarında T-GSH/GSSG oranları Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

GSH/GSSG oranları kontrol grubunda 39.13 ± 5.78, LPS grubunda 39.50 ± 7.57, LPS+MFG-E8 grubunda 40.09 ± 9.23 ve MFG-E8 grubunda 37.82 ± 9.46 olarak ölçüldü.

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 4.11. Karaciğer dokusunda gruplar arası GSH/GSSG oranları

(K= Kontrol grubu, L= LPS grubu, LM= LPS+MFG-E8 grubu, M= MFG-E8 grubu)

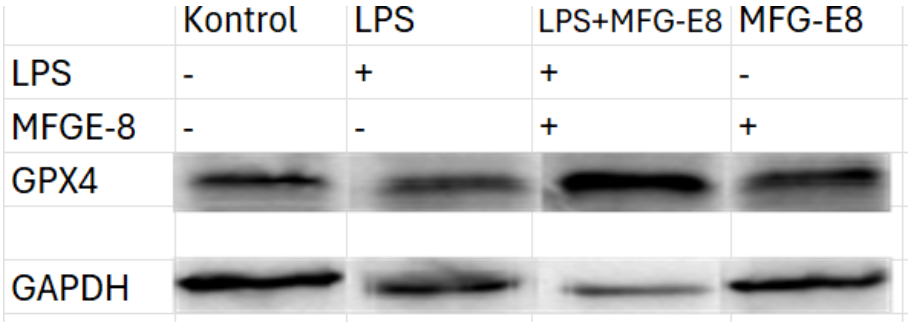
4.5. Western Blot Analiz Sonuçları

4.5.1. GPX4 Protein Ekspresyonu Analizi

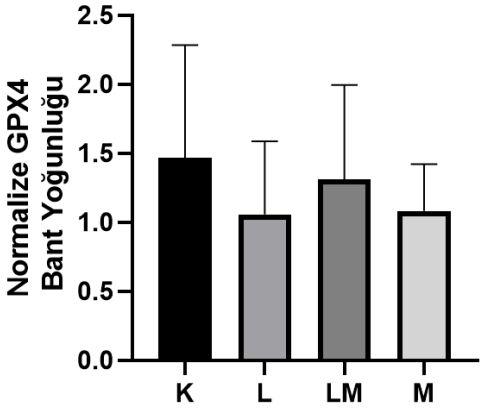
Deney gruplarının normalize GPX4 bant yoğunluğu değişimleri Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de gösterilmiştir (Her grup için n=4).

GPX4 protein bant yoğunluğu kontrol grubunda 1.46 ± 0.81, LPS grubunda 1.05 ± 0.52, LPS+MFG-E8 grubunda 1.31 ± 0.68, MFG-E8 grubunda ise 1.08 ± 0.34 olarak ölçülmüştür.

Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). LPS grubunun GPX4 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre azalma gösterdi, ancak anlamlı değildi ($p>0.05$). LPS sonrası MFG-E8 uygulaması ise LPS grubuna göre protein ekspresyonunu arttırdı ancak anlamlı değildi ($p>0.05$).



Şekil 4.12. GPX4 Western Blot jel görüntüsü



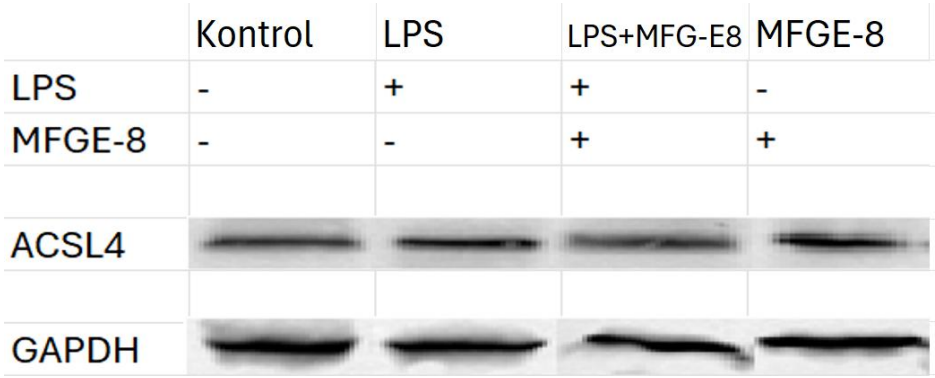
Şekil 4.13. Normalize GPX4 bant yoğunlukları

4.5.2. ACSL4 Protein Ekspresyonu Analizi

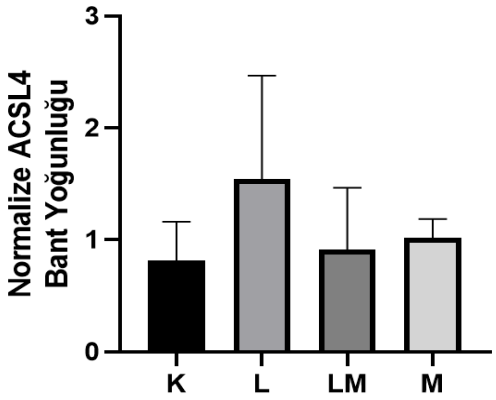
Deney gruplarında normalize ACSL4 bant yoğunluğunun değişimi Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir.

ACSL4 proteini bant yoğunluğu kontrol grubunda 0.81 ± 0.34, LPS grubunda 1.54 ± 0.92, LPS+MFG-E8 grubunda 0.91 ± 0.55, MFG-E8 grubunda 1.01 ± 0.16 olarak ölçülmüştür.

Gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). LPS grubunun ACSL4 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre artış gösterdi, ancak anlamlı değildi ($p>0.05$). LPS sonrası MFG-E8 uygulaması ise LPS grubuna göre protein ekspresyonunu azalttı ancak anlamlı değildi ($p>0.05$).



Şekil 4.14. ACSL4 Western Blot jel görüntüsü



Şekil 4.15. Normalize ACSL4 bant yoğunlukları

5. TARTIŞMA

Sepsis, vücudun enfeksiyona karşı verdiği aşırı ya da dengesiz tepki nedeniyle gelişen ve yaşamı tehdit eden bir organ yetmezliği tablosudur. Karaciğer bu süreçte en sık etkilenen organlardan biridir. Bunun nedeni bakteriyel klirensin, akut faz protein sentezi ve inflamasyona metabolik adaptasyon gibi işlevlerinin doğrudan karaciğer tarafından gerçekleştirilmesidir. Demire bağımlı, lipit peroksidasyonuyla ilerleyen bir hücre ölümü biçimi olan ferroptoz son yıllarda sepsise bağlı organ hasarının önemli bir bileşeni olarak öne çıkmaktadır.

Apoptotik hücrelerin temizlenmesinde görev alan ve anti-inflamatuar özellikleriyle bilinen MFG-E8'in de bu süreci düzenleyebileceği düşünülmektedir. Literatürde yapılan çalışmaların tamamı CLP modelinden ve nispeten daha uzun zaman noktalarından (12-24. saat) yapılmıştır. MFG-E8'in erken sepsis döneminde ferroptotik biyobelirteçler üzerinde bir etkisi olup olmadığı bilinmemektedir. LPS ile oluşturulan steril endotoksemi, uygulama kolaylığı, yüksek tekrarlanabilirliği ve doza bağlı olarak kontrollü şiddette bir fenotip oluşturabilmesi nedeniyle literatürde en sık kullanılan sepsis modelidir (Kannan ve ark., 2024). Cerrahi bir işlem gerektiren ve enfeksiyon yükü hayvandan hayvana değişebilen CLP'nin aksine, LPS tek bir enjeksiyonla standart ve öngörülebilir bir inflamatuar yanıt oluşturur; bu da grup içi değişkenliği azaltarak ölçülen biyobelirteçlerdeki farkları incelemede kolaylık sağlar.

Literatürdeki bu gereksinim göz önüne alınarak planlanan bu çalışmada, LPS ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde gelişen akut karaciğer hasarında ekzojen MFG-E8 uygulamasının ferroptotik biyobelirteçler ve ilişkili protein düzeyleri üzerine etkisi ilk kez araştırılmıştır. Bununla birlikte doku düzeyindeki histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesinin yanı sıra sistemik inflamatuar biyobelirteçler ve serum karaciğer fonksiyon testleri de analiz edilmiştir.

LPS ile indüklenen sepsis modeli incelendiğinde; tek doz 2 mg/kg LPS uygulanan hayvanların karaciğerinde altıncı saatte kontrole göre anlamlı mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyon saptanmış, buna doku TNF-α düzeyinde %25'lik ve IL-1β düzeyinde %42'lik bir artış eşlik etmiştir. Oluşturulan model, altıncı saatte hem hepatosellüler hasarı hem de sistemik ve doku düzeyinde bir inflamatuar yanıtı

beklendiği gibi oluşturmuştur. Elde ettiğimiz bulgular; literatürde farklı deney hayvanı modelleriyle gerçekleştirilen ve sepsisin erken dönemini kapsayan çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (Fang ve ark., 2018; L. Xie ve ark., 2023).

Sepsise bağlı karaciğer hasarının biyokimyasal ve histopatolojik bulguları incelendiğinde; serum aminotransferaz enzimlerindeki yükselmeler önemli bir hasar göstergesidir. AST düzeyi LPS grubunda kontrole göre yaklaşık %76, ALT düzeyi ise yaklaşık %66 oranında artmıştır. Bu iki enzimin sitozolde bulunması ve hepatosit membran bütünlüğünün bozulmasıyla dolaşıma salınması nedeniyle, altıncı saatte gözlenen belirgin yükselme hepatosellüler hasarın geliştiğini düşündürmektedir. Bu biyokimyasal değişikliklere mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyonun eşlik etmesi, karaciğer hasarını histopatolojik açıdan da desteklemektedir. Serum karaciğer fonksiyon testleri ile histopatolojik bulguların uyumlu olması, LPS uygulamasının karaciğer dokusunda hasara yol açtığını düşündürmektedir. Nitekim benzer bulgular, Zhao ve arkadaşlarının LPS ile indüklenmiş sepsis fare modelinde artemisitenin karaciğer hasarına etkisini inceleyen çalışmasında, LPS uygulamasının AST ve ALT düzeylerini belirgin şekilde yükselttiği, buna karaciğer dokusunda konjesyon ve inflamatuar hücre infiltrasyonunun eşlik ettiği gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2023). Benzer şekilde Wang ve arkadaşlarının güncel bir çalışmasında da 25 mg/kg LPS uygulanan farelerde serum AST, ALT düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 3-4 kat arttığı, buna karaciğer dokusunda yaygın inflamatuar hücre infiltrasyonun eşlik ettiği rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2026). Kullanılan LPS dozu ve değerlendirme zaman noktaları farklı olsa da her iki çalışmada elde edilen biyokimyasal ve histopatolojik bulgular, çalışmamızda gözlenen aminotransferaz yükselmesi ile mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyonun eşlik ettiği hepatosellüler hasar tablosuyla örtüşmektedir. Bu örtüşme, çalışmamızdaki LPS ile indüklenen akut karaciğer hasarının biyokimyasal ve histopatolojik seyrinin literatürdeki diğer örnekle uyumlu olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda LPS sonrası MFG-E8 uygulaması, serum AST düzeyinde %12 ve ALT düzeyinde %8'lik bir azalma sağladı, ancak anlamlı değildi. Shah ve ark. çalışmasında, CLP modelinde beşinci saatte intravenöz verilen 20 μg/kg MFG-E8'in 20. saatte AST'yi %45, ALT'yi %27 oranında azalttığını; dozla birlikte bu etkinin arttığını bildirmiştir (Shah ve ark., 2012). Wu ve arkadaşlarının çalışmasında ise, CLP

sonrası uygulanan 20 µg/kg MFG-E8'in 24. saatte AST düzeyinde %30.3 ve ALT düzeyinde %25.8 oranında anlamlı azalma sağlamıştır (Wu ve ark., 2022).

Bu sonuçlar, çalışmamızda kullanılan LPS dozunun veya örneklem toplama zamanının (altıncı saat) söz konusu parametrede belirgin bir sapma oluşturmak için yeterli olmadığını düşündürmektedir. Shah ve ark. çalışması, 20 µg/kg'ın etkili en düşük doz olduğunu göstermiştir (Shah ve ark., 2012). Çalışmamızda kullandığımız tek ve alt sınırdaki bu doz LPS'nin yarattığı yoğun uyarıyı dengelemekte yetersiz kalmış olabilir. MFG-E8 aracılı biyolojik yanıtın, efferositozun gerçekleşmesi ve tamamlanması ile ilişkili olduğu düşünüldüğünde, altıncı saatte gerçekleştirilen değerlendirme söz konusu etkinin belirginleşmesi için erken kalmış olabilir. Bunlarla birlikte literatürdeki MFG-E8 ile sepsise bağlı karaciğer hasarını inceleyen bu iki çalışma kalıcı bir enfeksiyon odağı ve yaygın apoptozla seyreden CLP modelini kullanmaktadır. LPS endotoksemisinde inflamasyon daha erken zirve yapıp gerilerken, CLP'ye özgü immünsupresyon tablosu da oluşmamaktadır (Kannan ve ark., 2024; Remick ve ark., 2000). Dolayısıyla, polimikrobiyal sepsis modeli olan CLP'nin sunduğu karmaşık enfeksiyon tablosunda saptanan iyileşme verilerinin, LPS'nin tetiklediği ani ve şiddetli inflamatuar yanıt ile karakterize olan bu modelde aynı seviyede gözlenmemesi olasıdır.

MFG-E8 uygulamasının AST ve ALT düzeyleri ile histopatolojik skorlar üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bulgular genel olarak olumlu yönde bir eğilim göstermiştir. Bu eğilim, MFG-E8'in hepatoprotektif bir potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, söz konusu etkinin istatistiksel anlamlılığa ulaşmaması nedeniyle, MFG-E8'in koruyucu rolünün ortaya konulabilmesi için farklı doz ve zaman noktalarını içeren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

LPS ile oluşturulan inflamatuar yanıt ve MFG-E8'in olası anti-inflamatuar etkisi incelendiğinde; LPS uygulaması sonrasında TNF-α düzeyinde %25, IL-1β düzeylerinde ise %42 oranında artış gözlemlenmesi, sepsisin erken evresindeki proinflamatuar profil ile paralellik göstermektedir. LPS uygulaması sonrasında MFG-E8 verilen grupta TNF-α düzeylerinde LPS grubuna kıyasla yaklaşık %6'lık bir azalma gözlenmiş olmakla birlikte, bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildir. IL-1β

düzeylerinde ise LPS grubuna göre yaklaşık %4'lük bir artış saptanmıştır. Bu sonuçlar, mevcut deney koşullarında MFG-E8'in incelenen proinflamatuar belirteçler üzerinde anlamlı bir düzenleyici etki oluşturamadığını düşündürmektedir.

Elde edilen veriler, MFG-E8'in sepsiste anti-inflamatuar ve organ koruyucu etkilerini bildiren literatürle ilk bakışta çelişir gibi görünmektedir. Ancak bu durum molekülün etki mekanizmasıyla ilişkili olabilir. Muendlein ve ark. yaptıkları çalışmada, MFG-E8'in yoğun TNF-α varlığında efferositozun anti-inflamatuar etkisinin azalabileceği ve bunun IL-1β'nın hızlı olgunlaşmasını destekleyen proinflamatuar bir sürece dönüşebildiği gösterilmiştir (Muendlein ve ark., 2025). Bu nedenle IL-1β'daki artışın, MFG-E8'in etkisiz kalmasından çok, altıncı saatteki yoğun inflamatuar ortamda efferositozun beklenenin aksine proinflamatuar yöne kaymış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bunların yanında Cannon ve ark.'nın çalışmasında, TNF-α düzeylerinin LPS sonrası ilk birkaç saat içinde en yüksek düzeye ulaşıp gerilemeye başladığını, buna karşılık IL-1β yanıtının daha yavaş yükselip saatler boyunca artmaya devam ettiğini öne sürülmüştür (Cannon ve ark., 1990). IL-1β'nın yükselen bir eğride olması, verilen MFG-E8 dozunun olası baskılayıcı etkisinin bu artan üretim hızının önüne geçememiş olabileceğini düşündürmektedir.

MFG-E8'in ferroptoz ile ilişkili demir metabolizmasına etkisi incelendiğinde; prusya mavisi boyaması ile gösterilen demir pozitif alanları LPS grubunda anlamlı artmış, MFG-E8 uygulaması sonrasında ise bu artış anlamlı bir biçimde azalmıştır. Kolorimetrik yöntemle ölçülen hücre içi Fe^{2+} düzeyleri de LPS grubunda kontrole göre yaklaşık %14 oranında yüksek bulunmuştur. LPS sonrası uygulanan MFG-E8'in ise yaklaşık %6 oranında azalma gözlenmiş olmakla birlikte, bu değişiklik anlamlı değildir. Birbirinden bağımsız iki yöntemle elde edilen bulguların aynı yönde olması, LPS uygulamasının hücre içi demir birikimini artırdığı ve MFG-E8'in bu birikimi azaltma yönünde bir eğilim oluşturduğu yönündeki değerlendirmeyi desteklemektedir.

Sepsis sırasında gözlenen hepatik demir birikimi, konağın patojenlerin demire erişimini kısıtlamaya yönelik bir savunma yanıtını temsil eder (Drakesmith & Prentice, 2012). Bununla birlikte, bu yanıt hücre içi labil demir havuzunu genişleterek Fenton

reaksiyonları aracılığıyla ferroptozu tetikleyebilir (L. Li ve ark., 2022; Tian ve ark., 2026). Zhang ve ark., sepsiste hepatositlerde NCOA4 aracılı ferritinofajinin arttığını, bunun ferritin yıkımı ve Fe^{2+} birikimi yoluyla ferroptozu başlattığını, ferrostatin-1 ile de bu sürecin baskılanabildiğini göstermiştir (Zhang ve ark., 2024). Bu veriler bizim gözlemlediğimiz demir birikiminin, ferroptotik mekanizmanın erken basamağı olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, MFG-E8'in LPS'ye bağlı karaciğer hasarında da oksidatif stresi azaltabileceği de bilinmektedir (Zhao ve ark., 2023).

MFG-E8'in ferroptoz ile ilişkili antioksidan mekanizması üzerine etkisi incelendiğinde; indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri, LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %15 oranında azalmış; ancak MFG-E8 uygulaması bu azalmayı tersine çevirememiştir. Ferroptoza karşı hücresel savunmada temel rol oynayan GPX4 protein ekspresyonunda ise farklı bir eğilim gözlenmiştir. GPX4 bant yoğunluğu, LPS grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık %28 oranında azalırken, MFG-E8 uygulaması sonrasında LPS grubuna kıyasla yaklaşık %25 oranında artarak kısmen düzelme sağlamıştır. Bununla birlikte, söz konusu değişikliklerin hiçbiri istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır.

Hücre içi GSH büyük ölçüde sistem Xc^- aracılığıyla yenilenir; bu yüzden GSH tükenmesi genellikle bu sistemdeki bir bozulmayı izleyen ikincil bir bulgudur. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon arasındaki oran, hücrenin redoks çevresini yansıtan duyarlı bir gösterge olarak kabul edilir ve bu oranın düşmesi artan oksidatif stresle ilişkilendirilir (Schafer & Buettner, 2001). T-GSH/GSSG oranı da gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiş, tüm gruplarda birbirine oldukça yakın değerlerde ölçülmüştür. Bu sonuçlar redoks dengesinin altıncı saatte henüz belirgin biçimde bozulmadığını, antioksidan sistemin bu erken dönemde sınırlı kaldığını düşündürmektedir. Çalışmamızda sistem Xc^- (SLC7A11) düzeyinin değerlendirilmemiş olması nedeniyle, GSH düzeyindeki sınırlı azalmanın sistem Xc^- işlevinde henüz belirgin bir bozulma olmadığını mı, yoksa bu bozulmanın kompansatör mekanizmalar ile dengelendiğini mi yansıttığını ayırt etmeyi güçleştirmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, demir metabolizmasında anlamlı bozulma gözlenmesine karşın lipid peroksidasyonu ve GSH/GPX4 ekseninde belirgin bir

değişiklik saptanmaması, ferroptotik sürecin aşamalı ve zamana bağlı doğasıyla uyumlu olabilir. Bu çerçevede, demir birikimi erken dönemde ortaya çıkan bir değişiklik olarak değerlendirilirken, GSH tükenmesi, GPX4 düzeylerindeki azalma ve lipid peroksidasyonu sürecin ilerleyen aşamalarında belirginleşebilir. Wu ve arkadaşlarının yaptığı CLP çalışmasında, GPX4 ekspresyonu düşüşünün ancak yirmi dördüncü saatte anlamlı hâle geldiği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2022). Bu nedenle çalışmamızdaki altıncı saatin, demirin etkilendiği ancak lipit ve GSH/GPX4 ekseninin henüz belirgin biçimde bozulmadığı bir "erken ferroptotik evreye" karşılık geldiğini düşündürmektedir.

MFG-E8'in ferroptoz ile ilişkili lipit metabolizmasına etkisi incelendiğinde; LPS grubundaki doku MDA düzeyinin kontrole göre yaklaşık %15 oranında yükseldiği, ancak istatistiksel anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Ferroptoza duyarlılığı arttıran ACSL4 enziminin ekspresyonunda da benzer bir eğilim gözlenmiştir. ACSL4 protein düzeyi, LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık iki kat artarken, MFG-E8 uygulaması sonrasında LPS grubuna göre yaklaşık %41 oranında azalarak kontrol düzeyine yaklaşmıştır. Bununla birlikte, bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak gruplar arasındaki bu değişiklikler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.

ACSL4, hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerini aktive ederek fosfolipitlere esterleşmesini katalizler ve ferroptoza duyarlı bir membran lipit profili oluşmasına katkıda bulunur. LPS grubunda bu proteinin artması, hücrelerin lipit peroksidasyonuna duyarlılığını arttırdığını düşündüren erken bir bulgudur. Bununla birlikte, lipid peroksidasyonunun geç dönem ürünlerinden biri olan MDA düzeylerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması, ferroptotik sürecin henüz erken bir evresinde olunabileceğini düşündürmektedir.

Bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde; LPS uygulaması sonrasında altıncı saatte hem sistemik hem de doku düzeyinde inflamatuvar yanıt ile birlikte hepatik demir birikimi gözlenmiştir. Bu tabloya, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, GPX4 ekspresyonundaki azalma ve ACSL4 ekspresyonundaki artış eşlik etmiştir. Bu bulgular, karaciğerde ferroptotik sürecin erken evresine girilmiş olabileceğini düşündürmektedir. İnflamasyon ve demir metabolizmasındaki bu

değişiklikler, serum transaminaz düzeylerindeki yükselme ve histopatolojik hasar bulgularıyla birlikte karaciğer hasarının oluştuğunu desteklemektedir.

MFG-E8 uygulamasının bu patolojik süreçte en belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı etkisi, hepatik demir birikiminde gözlenmiştir. Diğer parametrelerdeki değişiklikler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamış olsa da çoğunlukla iyileşme yönünde bir eğilim göstermiştir. Bulguların genel olarak aynı yönde olması, MFG-E8'in olası hepatoprotektif etkisinin öncelikle demir metabolizmasının düzenlenmesiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu olası mekanizmanın doğrulanması için farklı zaman noktalarını ve ferroptozun ilgili moleküler bileşenlerini kapsayan ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Elde edilen bulgular çalışmamızın hipotezini kısmen desteklemektedir. MFG-E8 uygulamasının hepatik demir birikimini anlamlı biçimde azaltması, bildiğimiz kadarıyla, LPS ile indüklenen sepsis modelinde ilk kez gösterilen bir bulgudur. Bu sonuç, MFG-E8'in olası koruyucu etkisinde demir metabolizmasının rol oynayabileceğini ve bu yolun ileri çalışmalarda öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Ayrıca, deney tasarımına yalnızca MFG-E8 uygulanan bir grubun dâhil edilmesi, MFG-E8'in tek başına inflamasyon, oksidatif stres ve doku hasarı üzerindeki etkilerinin ayrıca değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Yalnızca MFG-E8 uygulanan grupta sağlıklı karaciğer dokusunda toksik etkiyi düşündüren bir bulgu gözlenmemiştir.

Sonuç olarak, çalışmamız MFG-E8'in sepsise bağlı karaciğer hasarı üzerindeki etkisini LPS ile oluşturulan fare modelinde ilk kez inceleyen, MFG-E8'in etkisini bu modelde altıncı saat gibi erken bir zaman penceresinde ilk kez araştıran ve MFG-E8'in ferroptoza duyarlılığı belirleyen ACSL4 protein ekspresyonu üzerindeki olası etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

Çalışmanın sınırlılıkları değerlendirildiğinde; çalışmamızın temel sınırlılıklarından biri, değerlendirmenin yalnızca tek bir zaman noktasında (altıncı saat) gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu tercih, LPS ile indüklenen sepsis modelinin başarısını doğrulamak ve ferroptotik sürecin başlangıç evresini yakalamak açısından

literatürle uyumlu olsa da patolojinin zaman içindeki dinamik seyrinin izlenmesine olanak tanımamıştır. Diğer taraftan, MFG-E8'in başlıca etki mekanizması olan efferositozun organoprotektif etkilerinin altıncı saatte henüz belirginleşmemiş olması mümkündür.

Diğer bir çalışma sınırlılığımız, yalnızca tek bir MFG-E8 dozu (20 µg/kg) kullanılmış olmasıdır. Literatürde dozun 40-160 µg/kg'a çıkarılmasıyla anlamlı ek iyileşme sağlandığı bildirildiğinden (Shah ve ark., 2012), dozumuzun LPS'nin yoğun uyarısını dengelemekte yetersiz kalmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Son olarak, çalışmamızın bir diğer sınırlılığı, deneysel bir hayvan modeli olan sıçanlarda gerçekleştirilmiş olmasıdır. Kontrollü laboratuvar koşullarında (sabit sıcaklık, aydınlatma döngüsü ve standart beslenme), tek bir tür, cinsiyet (yalnızca erkek) ve yaş/ağırlık aralığındaki hayvanlarla yürütülen bu tasarım insan sepsisinde görülen yaş, cinsiyet ve komorbiditeyi yansıtamamaktadır. Bu nedenle çalışmamızın bulguları, insan sepsisinin karmaşık ve çok değişkenli klinik tablosuna doğrudan aktarılmadan önce, farklı yaş, cinsiyet ve komorbidite gruplarını içeren ileri çalışmalarla desteklenmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, lipopolisakkarit ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde gelişen akut karaciğer hasarında ekzojen MFG-E8 uygulamasının ferroptotik biyobelirteçler üzerine etkisi araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

Tek doz 2 mg/kg LPS uygulaması, altıncı saatte sıçan karaciğerinde anlamlı düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyon oluşturmuş; serum AST ve ALT aktiviteleri ile doku TNF-α ve IL-1β düzeylerini anlamlı biçimde yükseltmiştir. Buna karşılık hiçbir grupta vakuolleşme gözlenmemiştir. Bu bulgular, kullanılan modelin akut karaciğer hasarını ve inflamatuar yanıtı başarıyla oluşturduğunu, ancak altıncı saatte hasarın henüz yaygın hepatosellüler dejenerasyona ilerlemediğini göstermektedir.

LPS uygulaması hepatik demir birikimine yol açmıştır. Prusya mavisi pozitif alan yüzdesi ve kolorimetrik yöntemle ölçülen doku ferröz demir (Fe^{2+}) düzeyi, LPS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. LPS uygulamasından bir saat sonra verilen 20 µg/kg MFG-E8, Prusya mavisi ile gösterilen hepatik demir birikimini anlamlı biçimde azaltmıştır. Bu bulgu, çalışmanın en belirgin anlamlı pozitif sonucudur ve MFG-E8'in olası koruyucu etkisinin öncelikle demir metabolizması üzerinden aranması gerektiğine işaret etmektedir.

MFG-E8 uygulaması; serum AST ve ALT düzeylerinde, histopatolojik hasar skorlarında ve doku TNF-α ile IL-1β düzeylerinde sayısal iyileşmeler sağlamakla birlikte, bu değişiklikler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Doku MDA ve GSH düzeyleri ile GPX4 ve ACSL4 protein ifadelerinde de gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bununla birlikte GPX4'ün LPS grubunda azalma, ACSL4'ün ise artma yönündeki eğilimi, ferroptoza duyarlılığın arttığına işaret eden ancak istatistiksel güç yetersizliği nedeniyle doğrulanamayan bulgular olarak değerlendirilmiştir.

Demir birikiminin anlamlı biçimde artmasına karşılık lipit peroksidasyonu, glutatyon tüketimi ve GPX4 kaybının anlamlı düzeye ulaşamaması, LPS ile indüklenen akut karaciğer hasarında altıncı saatin ferroptotik sürecin henüz

tamamlanmadığı bir zaman penceresine karşılık geldiğini düşündürmektedir. MFG-E8'in yalnızca demir birikimi üzerinde anlamlı etki göstermesi, bu bulguyla tutarlıdır.

Sonuç olarak, çalışmanın hipotezi kısmen doğrulanmıştır: MFG-E8, LPS ile indüklenen akut karaciğer hasarında hepatik demir birikimini azaltmakla birlikte, kullanılan doz ve zaman noktasında inflamatuar yanıt ile ferroptozun aşağı basamaklarındaki belirteçler üzerinde anlamlı bir koruma sağlamamıştır. Bu sonuçlar MFG-E8'in LPS ile indüklenen sepsiste akut karaciğer hasarındaki potansiyelini dışlamamakta; aksine, etkinin ortaya çıkması için gerekli doz ve zaman koşullarının belirlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda bundan sonra yapılacak çalışmalar için aşağıdaki öneriler geliştirilmiştir:

- MFG-E8'in etkisi, tek bir zaman noktası yerine çoklu zaman noktalarında (örneğin 6., 12., 24. ve 48. saatler) değerlendirilmeli; böylece hem ferroptotik sürecin zamansal seyri hem de tedavinin etkili olduğu zaman penceresi belirlenebilir.

- Literatürde MFG-E8 için doza bağımlı yarar bildirildiğinden, 20 µg/kg dozun yanı sıra daha yüksek dozları (40, 80 ve 160 µg/kg) ve tekrarlayan uygulamaları içeren bir doz-yanıt çalışması planlanabilir.

- İntraperitoneal uygulamanın yanı sıra intravenöz uygulama yolu da karşılaştırmalı olarak değerlendirilebilir.

- Tedavinin klinik anlamlılığının ortaya konabilmesi için sağkalım analizi içeren çalışmalar planlanmalı; ayrıca sepsis yanıtındaki cinsiyet farklılıkları göz önünde bulundurularak dişi hayvanlar da çalışmaya dâhil edilmelidir.

- Deney hayvanlarında endojen MFG-E8 düzeyleri ölçülmeli; LPS uygulamasının endojen MFG-E8 ifadesini ne ölçüde baskıladığı belirlenerek ekzojen uygulamanın telafi kapasitesi değerlendirilmelidir.

- Sepsisli hastalarda serum MFG-E8 düzeyi ile karaciğer fonksiyon testleri, demir parametreleri ve hastalık şiddet skorları arasındaki ilişkiyi inceleyen klinik çalışmalar planlanarak, deneysel bulguların klinik karşılığı araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

Akin, A. T., Kaymak, E., Ceylan, T., Kuloglu, N., Karabulut, D., & Toluk, A. (2025). Unveiling the Protective Potential of Crocin in Septic Acute Liver Injury via Assessment of TLR4/HGM1/NF-κB Signaling Pathway, Oxidative Stress and Heat Shock Response. *Cell Biochemistry and Function*, *43*(2). https://doi.org/10.1002/cbf.70058

Albus, E., Sinningen, K., Winzer, M., Thiele, S., Baschant, U., Hannemann, A., Fantana, J., Tausche, A.-K., Wallaschofski, H., Nauck, M., Völzke, H., Grossklaus, S., Chavakis, T., Udey, M. C., Hofbauer, L. C., & Rauner, M. (2016). Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor 8 (MFG-E8) Is a Novel Anti-inflammatory Factor in Rheumatoid Arthritis in Mice and Humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, *31*(3), 596–605. https://doi.org/10.1002/jbmr.2721

Bi, J., Zhang, J., Ren, Y., Du, Z., Zhang, Y., Liu, C., Wang, Y., Zhang, L., Shi, Z., Wu, Z., Lv, Y., & Wu, R. (2020). Exercise hormone irisin mitigates endothelial barrier dysfunction and microvascular leakage–related diseases. *JCI Insight*, *5*(13). https://doi.org/10.1172/jci.insight.136277

Boada-Romero, E., Martinez, J., Heckmann, B. L., & Green, D. R. (2020). The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *21*(7), 398–414. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0232-1

Cannon, J. G., Tompkins, R. G., & Gelfand, J. A. (1990). J Infect Dis. *1990;161(1):79-84*. https://doi.org/10.1093/infdis/161.1.79

Caraballo, C., & Jaimes, F. (2019). Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *92*(4), 629–640.

Chen, J., & Wei, H. (2021). Immune Intervention in Sepsis. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.718089

Cui, Q., Liu, H.-C., Liu, W.-M., Ma, F., Lv, Y., Ma, J.-C., Wu, R.-Q., & Ren, Y.-F. (2024). Milk fat globule epidermal growth factor 8 alleviates liver injury in severe acute pancreatitis by restoring autophagy flux and inhibiting ferroptosis in hepatocytes. *World Journal of Gastroenterology*, *30*(7), 728–741. https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i7.728

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, *149*(5), 1060–1072. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042

Dixon, S. J., & Olzmann, J. A. (2024). The cell biology of ferroptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. https://doi.org/10.1038/s41580-024-00703-5

Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology*, *10*(1), 9–17. https://doi.org/10.1038/nchembio.1416

Dixon, S. J., Winter, G. E., Musavi, L. S., Lee, E. D., Snijder, B., Rebsamen, M., Superti-Furga, G., & Stockwell, B. R. (2015). Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chemical Biology*, *10*(7), 1604–1609. https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00245

Doran, A. C., Jr, Y. A., & Tabas, I. (2020). Efferocytosis in health and disease. *Nat Rev Immunol*. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0240-

Drakesmith, H., & Prentice, A. M. (2012). Hepcidin and the iron-infection axis. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1224577

Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (38). https://doi.org/10.3791/1918

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. https://doi.org/10.1172/JCI1112

Fang, H., Liu, A., Chen, X., Cheng, W., Dirsch, O., & Dahmen, U. (2018). The severity of LPS induced inflammatory injury is negatively associated with the functional liver mass after LPS injection in rat model. *J Inflamm (Lond)*. https://doi.org/10.1186/s12950-018-0197-4

Ganz, T. (2013). Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev*. https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2013

Gray, A. P., Chung, E., Hsu, R. L., Araki, D. T., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Swetschinski, L. R., Wool, E. E., Han, C., Mestrovic, T., Ikuta, K. S., Abbas, N., Abbasi, M., Abd ElHafeez, S., Abdisa, W. M., Abdoun, M., Abdullahi, A., Abebe, M., Abejew, A. A., … Naghavi, M. (2025). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2021: a systematic analysis. *The Lancet Global Health*, *13*(12), e2013–e2026. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(25)00356-0

Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. https://doi.org/10.1038/417182a

Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2004). Autoimmune Disease and Impaired Uptake of Apoptotic Cells in MFG-E8-Deficient Mice. *Science*, *304*(5674), 1147–1150. https://doi.org/10.1126/science.1094359

Hotchkiss, R. S., & Karl, I. E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. https://doi.org/10.1056/NEJMra021333

Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J. L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45

Kannan, S. K., Kim, C. Y., Heidarian, M., Berton, R. R., Jensen, I. J., Griffith, T. S., & Badovinac, V. P. (2024). Mouse Models of Sepsis. *Curr Protoc*. https://doi.org/10.1002/cpz1.997

Kim, T. S., & Choi, D. H. (2020). Liver dysfunction in sepsis. *Korean J Gastroenterol*. https://doi.org/10.4166/kjg.2020.75.4.182

Koppula, P., Zhuang, L., & Gan, B. (2021). Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell*. https://doi.org/10.1007/s13238-020-00789-5

Kuroda, M., Nomura, K., Wada, A., Hatano, Y., Ogawa, M., Okamoto, S., Ishikawa, E., Izumi-Mishima, Y., Yasui-Yamada, S., Tsutsumi, Y. M., Harada, N., Tsutsumi, R., & Sakaue, H. (2026). Adipose tissue–derived MFG-E8 promotes hepatic inflammation and fibrosis through macrophage activation in a mouse MASH model. *Npj Metabolic Health and Disease*, *4*(1), 8. https://doi.org/10.1038/s44324-026-00099-0

Lei, G., Zhuang, L., & Gan, B. (2022). Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer. *Nat Rev Cancer*. https://doi.org/10.1038/s41568-022-00459-0

Lei, X. L., Zhao, G. Y., Guo, R., & Cui, N. (2022). Ferroptosis in sepsis: The mechanism, the role and the therapeutic potential. *Front Immunol*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956361

Lerouge, I., & Vanderleyden, J. (2002). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(1), 17–47. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x

Li, D., Rongchun, W., Lu, W., & Ma, Y. (2024). Exploring the potential of MFG-E8 in neurodegenerative diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–15. https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2417800

Li, J., Cao, F., Yin, H., Huang, Z., Lin, Z., Mao, N., Sun, B., & Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death & Disease*, *11*(2), 88. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2

Li, L., Wang, K., Jia, R., Xie, J., Ma, L., Hao, Z., Zhang, W., Mo, J., & Ren, F. (2022). Ferroportin-dependent ferroptosis induced by ellagic acid retards liver fibrosis by impairing the SNARE complexes formation. *Redox Biol*. https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102435

Li, Y., Feng, D., Wang, Z., Zhao, Y., Sun, R., Tian, D., Liu, D., Zhang, F., Ning, S., Yao, J., & Tian, X. (2019). Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. *Cell Death & Differentiation*, *26*(11), 2284–2299. https://doi.org/10.1038/s41418-019-0299-4

Li, Y., Yang, Y., & Yang, Y. (2022). Multifaceted Roles of Ferroptosis in Lung Diseases. *Front Mol Biosci*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.919187

Lu, J., Liu, J., & Li, A. (2022). Roles of neutrophil reactive oxygen species (ROS) generation in organ function impairment in sepsis. *J Zhejiang Univ Sci B*. https://doi.org/10.1631/jzus.B2101075

Mancias, J. D., Wang, X., Gygi, S. P., Harper, J. W., & Kimmelman, A. C. (2014). Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature13148

Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*. https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1

Matsuda, A., Jacob, A., Wu, R., Zhou, M., Aziz, M., & Wang, P. (2013). Milk fat globule–EGF factor VIII ameliorates liver injury after hepatic ischemia-reperfusion. *Journal of Surgical Research*, *180*(1), e37–e46. https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.03.021

McDonald, P. P., Fadok, V. A., Bratton, D., & Henson, P. M. (1999). Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol*.

Miao, R., Fang, X., & Zhang, Y. (2023). Cell Death Dis. *2023;14(3):186*. https://doi.org/10.1038/s41419-023-05708-0

Miliaraki, M., Briassoulis, P., Ilia, S., & Sepsis, O. S. I. I. in. (2022). Antioxidants (Basel). *2022;11(2):231*. https://doi.org/10.3390/antiox11020231

Muendlein, H. I., Connolly, W. M., Leiriao, J., Nolan, M. A., Judge, J., Smirnova, I., Batorsky, R., & Poltorak, A. (2025). TNF switches homeostatic efferocytosis to lytic caspase-8-dependent pyroptosis and IL-1β maturation. *Sci Immunol*. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.adq0043

Pan, L., Gong, C., Sun, Y., Jiang, Y., Duan, X., Han, Y., & Wang, Y. (2022). Induction mechanism of ferroptosis: A novel therapeutic target in lung disease. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1093244

Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. https://doi.org/10.1038/emm.2013.97

Pei, Q., Zhang, J., Li, M., Yang, P., Jing, F., & Yi, Q. (2025). MFG-E8 in Kawasaki Disease: Role in Endothelial Injury and Diagnostic Potential. *Journal of Inflammation Research*, *Volume 18*, 16365–16383. https://doi.org/10.2147/JIR.S547634

Pierrakos, C., Velissaris, D., Bisdorff, M., Marshall, J. C., & Vincent, J.-L. (2020). Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Critical Care*, *24*(1), 287. https://doi.org/10.1186/s13054-020-02993-5

Qiu, B., Zandkarimi, F., Bezjian, C. T., Reznik, E., Soni, R. K., Gu, W., Jiang, X., & Stockwell, B. R. (2024). Phospholipids with two polyunsaturated fatty acyl tails promote ferroptosis. *Cell*, *187*(5), 1177-1190.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.01.030

Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414

Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med*. https://doi.org/10.1084/jem.20101157

Reichert, C. O., de Freitas, F. A., Sampaio-Silva, J., Rokita-Rosa, L., Barros, P. de L., Levy, D., & Bydlowski, S. P. (2020). Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8765. https://doi.org/10.3390/ijms21228765

Reichert CO, de F. F. A., & Sampaio-Silva, J. (2020). Int J Mol Sci. *2020;21(22):8765*. https://doi.org/10.3390/ijms21228765

Remick, D. G., Newcomb, D. E., Bolgos, G. L., & Call, D. R. (2000). Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. *Cecal Ligation and Puncture*. https://doi.org/10.1097/00024382-200013020-00004

Ren, Y., Cui, Q., Zhang, J., Liu, W., Xu, M., Lv, Y., Wu, Z., Zhang, Y., & Wu, R. (2021). Milk Fat Globule-EGF Factor 8 Alleviates Pancreatic Fibrosis by Inhibiting ER Stress-Induced Chaperone-Mediated Autophagy in Mice. *Front Pharmacol*. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.707259

Rochette, L., Dogon, G., Rigal, E., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2022). Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1), 449. https://doi.org/10.3390/ijms24010449

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(11), 1191–1212. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4

Shah, K. G., Wu, R., Jacob, A., Molmenti, E. P., Nicastro, J., Coppa, G. F., & Wang, P. (2012). Recombinant human milk fat globule-EGF factor 8 produces dose-dependent benefits in sepsis. *Intensive Care Medicine*, *38*(1), 128–136. https://doi.org/10.1007/s00134-011-2353-7

Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J.-L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, *315*(8), 801. https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287

Stubbs, J. D., Lekutis, C., Singer, K. L., Bui, A., Yuzuki, D., Srinivasan, U., & Parry, G. (1990). cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(21), 8417–8421. https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8417

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, *140*(6), 805–820. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022

Tian, Y., Li, Z., Tian, T., Zhu, H., Zhou, M., Long, X., & Wang, S. (2026). Ferroptosis suppressor protein 1-mediated ferroptosis suppression in sepsis: non-canonical antioxidant pathways, inflammatory regulation, and therapeutic perspectives. *Frontiers in Immunology*, *17*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2026.1892904

Wang, a Y., Li, M., Liang, Z., Wang, Y., Li, H., Li, S., Jiao, X., Guo, N., Dai, G., Zhang, G., Lu, X., & Yao, J. (2026). MAGL-18c attenuates LPS-induced sepsis-associated liver injury by inhibiting TGF-β/Smad signaling and remodeling medium- and long-chain fatty acid metabolism. *Front Immunol*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2026.1712807

Ward, D. M., & Kaplan, J. (2012). Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta*. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.03.004

Wen, Q., Liu, J., Kang, R., Zhou, B., & Tang, D. (2019). The release and activity of HMGB1 in ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.090

Wu, W., Wang, J., Chen, J., Lu, J., Lao, Y., Huang, K., & Lin, J. (2022). MFG-E8 has guiding significance for the prognosis and treatment of sepsis. *Scientific Reports*, *12*(1), 20916. https://doi.org/10.1038/s41598-022-25601-8

Xiao, W., Mindrinos, M. N., Seok, J., & humans, A. genomic storm in critically injured. (2011). J Exp Med. *2011;208(13):2581-2590*. https://doi.org/10.1084/jem.20111354

Xiao, Z., Zhang, J., Qiu, Z., Liu, H., Ding, H., Li, H., Liu, Y., Zou, X., & Long, J. (2024). Ferroptosis and inflammation are modulated by the NFIL3-ACSL4 axis in sepsis associated-acute kidney injury. *Cell Death Discovery*, *10*(1), 349. https://doi.org/10.1038/s41420-024-02113-0

Xie, L., Zhou, C., Wu, Y., Fu, X., Zhang, G., Han, X., Xie, S., Chen, G., Xu, H., Deng, B., Liu, B., Zhou, Y., & Li, A. (2023). Wenqingyin suppresses ferroptosis in the pathogenesis of sepsis-induced liver injury by activating the Nrf2-mediated signaling pathway. *Phytomedicine*, *114*, 154748. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154748

Xie, Y., Kang, R., Klionsky, D. J., & Tang, D. (2023). GPX4 in cell death, autophagy, and disease. *Autophagy*, *19*(10), 2621–2638. https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2218764

Yang, L., Cao, L. M., Zhang, X. J., & Chu, B. (2022). Targeting ferroptosis as a vulnerability in pulmonary diseases. *Cell Death Dis*. https://doi.org/10.1038/s41419-022-05070-7

Yang, W. L., Sharma, A., Wang, Z., Li, Z., Fan, J., & Wang, P. (2015). Milk fat globule epidermal growth factor-factor 8-derived peptide attenuates organ injury and improves survival in sepsis. *Crit Care*. https://doi.org/10.1186/s13054-015-1094-3

Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(34), E4966–E4975. https://doi.org/10.1073/PNAS.1603244113

Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell*, *156*(1–2), 317–331. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010

Yi, Y. S. (2016). Functional Role of Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor VIII in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses and Inflammatory/Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm*. https://doi.org/10.1155/2016/5628486

Zhang, H, Li, H, Liu, S, Zheng, J., & L., & P. (2026). Ferrostatin-1 attenuates sepsis-induced lung injury by inhibiting ferroptosis via activation of the SLC7A11/GSH/GPX4 signaling pathway. *Journal of Chromatography B, 1273, 124962*. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2026.124962

Zhang, P., Liu, W., Wang, S., Wang, Y., & Han, H. (2024). Ferroptosisand Its Role in the Treatment of Sepsis-Related Organ Injury: Mechanisms and Potential Therapeutic Approaches. *Infect Drug Resist*. https://doi.org/10.2147/IDR.S496568

Zhao, C., Xiao, C., Feng, S., & Bai, J. (2023). Artemisitene Alters LPS-Induced Oxidative stress, inflammation and Ferroptosis in Liver Through Nrf2/HO-1 and NF-kB Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1177542

Zhou, Q., Meng, Y., Le, J., Sun, Y., Dian, Y., Yao, L., Xiong, Y., Zeng, F., Chen, X., & Deng, G. (2024). Ferroptosis: mechanisms and therapeutic targets. *MedComm*, *5*(12). https://doi.org/10.1002/mco2.70010

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Caner YILDIRIM
Eğitim	
Lise	İnegöl Zeki Konukoğlu Anadolu Lisesi
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü (2017-2022)
Yüksek Lisans	Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2023-)
Doktora	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	İyi derecede (YDS: 92.5 Ekim 2022)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Kuruluş Adı	

EKLER

EK-1. Etik kurul izin belgesi

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Çağış Yerleşkesi, (Bigadiç yolu üzeri 17. km) 10145, BALIKESİR-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU DEĞERLENDİRME FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*"Lipopolisakkarit ile İndüklenen Deneysel Akut Karaciğer Hasarında MFG-E8/Laktadherin Uygulamasının Ferroptotik Biyobelirteçler Üzerine Etkisinin Araştırılması"*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Dr. Öğr. Üyesi Merve AKIŞ YILMAZ BAÜN TF Tıbbi Biyokimya AD.
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Dr. Öğr. Üyesi Aslı KARAKILIÇ BAÜN TF Fizyoloji AD. Dr. Öğr. Üyesi Arzu YILDIRIM ÖZLÜK BAÜN TF Patoloji AD. Caner YILDIRIM, YL Öğrencisi BAÜN SBE Tıbbi Biyokimya AD.
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Yüksek Lisans
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.06.2025 – 01.06.2027
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	SIÇAN – 36 Adet

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	**Belge Adı**	**Tarihi**
	HADYEK BAŞVURU FORMU	**15/04/2025**

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 2025/4-2**	**Tarih: 24/04/2025**

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi.

Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırıcıya iletilmesine oy birliği ile karar verildi.

1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması,
2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması,
3) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması,
4) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	**Uzmanlık Dalı**	**Kurumu**	**İlişki (*)**	**İmza**
Prof. Dr. Mehmet Faruk AYDIN Başkan	Histoloji ve Embriyoloji	Veteriner Fakültesi	☐E ☒H	
Prof. Dr. Recai KULAKSIZ Başkan Vekili	Dölerme ve Suni Tohumlama	Veteriner Fakültesi	☐E ☒H	

Sayfa 1 / 2

Prof. Dr. Cengiz CEYLAN Üye	Veterinerlik Cerrahisi	Veteriner Fakültesi	☐E ☒H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Ziya İLHAN Üye	Veterinerlik Mikrobiyolojisi	Veteriner Fakültesi	☐E ☒H	
Prof. Dr. Dilek TÜRKER Üye	Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐E ☒H	
Prof. Dr. Hatice YILDIRIM Üye	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Fen Edebiyat Fakültesi	☐E ☒H	
Doç. Dr. Pelin PALAS KARACA Üye	Ebelik	Sağlık Bilimleri Fakültesi	☐E ☒H	
Doç. Dr. Muharrem EROL Üye	Veterinerlik Cerrahisi	Veteriner Fakültesi	☐E ☒H	
Doç. Dr. İhsan KISADERE Üye	Veterinerlik Fizyolojisi	Veteriner Fakültesi	☐E ☒H	
Doç. Dr. Nevzat SAAT Üye	Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi	Veteriner Fakültesi	☐E ☒H	
Doç. Dr. Yasin BAYKALIR Üye	Biyoistatistik	Veteriner Fakültesi	☐E ☒H	
Dr. Öğr. Üyesi Fatih UGÜN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Tıp Fakültesi	☐E ☒H	
Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan KORKUT Üye	Tıbbi Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐E ☒H	
Dr. Mustafa H. YARANOĞLU Üye	Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi	BAUNDEHAM	☐E ☒H	
Vet. Hek. Hüdayi TANRIKULU Üye	Veteriner Hekim	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	☐E ☒H	
Zir. Müh. Mustafa YILDIRIM Üye	Ziraat Mühendisi	Sivil Üye	☐E ☒H	

(*) Başvurulan Projelerde Proje Sahibi veya Yardımcı Araştırmacılardan birinin Yerel Etik Kurul Üyesi veya 1. Derece Akrabası olması halinde ilgili üye proje kurul görüşmesine katılamaz.

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ

2006

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...

Balıkesir Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası
Çağış Yerleşkesi/BALIKESİR

(0 266) 612 14 62
sagbilen@balikesir.edu.tr
http://www.balikesir.edu.tr