

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETANOLÜN OLUŞTURDUĞU KARACİĞER HASARI ÜZERİNE
QUERCETİNİN ETKİSİ**

Bio. Hamdullah ÇAKAR

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN**

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından 031.TIP.05
Proje Numarası İle Desteklenmiştir**

Tez No: 2005-021

2005 - AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24 / 06 / 2005

Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
ÜYE

Doç. Dr. Tülay KÖKEN
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN
ÜYE

Biyokimya Anabilim Dalı yüksek Lisans öğrencisi Hamdullah ÇAKAR'ın
“Etanolün Oluşturduğu Karaciğer Hasarı Üzerine Quercetin'in Etkisi” başlıklı tezi
2 / 06 / 2005 günü saat 'da lisansüstü eğitim ve öğretim sınav yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yüksel ARIKAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesinde, çalışmaların planlanması ve yürütülmesi esnasında çok kıymetli destek ve yardımlarını gördüğüm değerli tez hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a, eğitimim süresince, yetişmemde değerli katkıları olan, yardım ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Tülay KÖKEN ve Sayın Doç. Dr. Mustafa SERTESER'e minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince maddi ve manevi yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Ratların alınması, tezin deney aşaması ile biyokimyasal analizin çalışılması esnasında yardımlarını gördüğüm ve 2 ay boyunca her türlü kahrımı çeken sevgili arkadaşlarım Bio. Ayhan VURMAZ ile Bio. Fatih GÜRSOY'a, istatistiksel analizlerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen kıymetli amcam Sayın Fahri ÇAKAR'a, yazım metninin düzeltilmesinde yardımcı olan sevgili arkadaşım Uzm. Dr. Sibel KOÇAR ÇELİK'e, bize rahat bir çalışma ortamı sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi Başkanı sayın Doç. Dr. Zehra AKINCI'ya ve Arş. Görv. Özlem GÜCÜYENER'e ve özellikle Rektörlük Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 031.TIP.05 Proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
ÖZET	XIV
SUMMARY	XVI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.2. Biyolojik Sistemlerde Oluşan Reaktif Oksijen Ürünleri	4
2.2.1. Süperoksit Anyon Radikali	5
2.2.2. Hidroksit Radikali	9
2.2.3. Singlet Oksijen Radikali	10
2.2.4. Hidrojen Peroksit	10
2.2.5. Nitrik Oksit	11
2.2.6. Peroksinitrit	12
2.3. Serbest Radikallerin Etkileri	13
2.3.1. Membran Lipidleri Üzerine Etkileri	13
2.3.2. Proteinler Üzerine Etkileri	17
2.3.3. Karbohidratlar Üzerine Etkileri	18
2.3.4. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	18
2.4. KRONİK ALKOL TÜKETİMİ VE OKSİDATİF STRES	19
2.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA	22
2.5.1. Süperoksit Dismutaz	22
2.5.2. Katalaz	24
2.5.3. Glutasyon Peroksidaz	24
2.5.4. Glutasyon Redüktaz	25
2.5.5. Redükte Glutasyon	25
2.5.6. Glutasyon-S-Transferaz	27

2.5.7. Vitamin E	27
2.5.8. Vitamin C	28
2.5.9. Flavonoidler	28
2.5.9.1. Yapı ve oluşumları	28
2.5.9.2. Quercetin	30
2.5.9.3. Quercetin'in canlılar üzerindeki etkileri	30
2.5.9.4. Quercetin'in lipofilik ve hidrofilik antioksidanlarla	32
2.6. SİTOKİNLER	33
2.6.1. Sitokinlerin Tanımı	33
2.6.2. Genel Özellikleri	34
2.6.3. Yapıları	35
2.6.4. Sentez ve Salınmaları	36
2.4.4. Sınıflandırılmaları	36
2.4.5. Etki ve Etki Mekanizmaları	37
2.6.6. Proinlamatuvar Sitokinlerin Etkileri	38
2.6.7. Tümör Nekrozis Faktör	38
2.6.8. İnterferonlar	41
2.7. ALKOL METABOLİZMASI	44
2.7.1. Alkolik Karaciğer Hastalığının Patofizyolojisi	48
2.7.1.1. Yağlı Karaciğer	49
2.7.1.2. Karbohidrat Metabolizması Değişiklikleri	50
2.7.1.3. Oksidatif Hasar	50
2.7.1.4. Asetaldehit Etkisi	51
2.7.1.5. Sitokin Üretimi ve İnflamasyon	52
2.7.1.6. İmmün Cevap	55
2.7.1.7. Fibrozis Oluşumu	55
2.7.2. Alkolik Karaciğer Hastalığında Etkili Faktörler	57
2.7.2.1. Herediter Faktörler	57
2.7.2.2. Cinsiyet	58
2.7.2.3. Beslenme	58
2.7.2.4. Karaciğer Doku Demiri	59
2.7.3. Alkol kullanımını Gösteren Testler	59
2.7.3.1. Carbohydrate deficient transferin	59
2.7.3.2. Gama Glutamil Transferaz	59
2.7.3.3. Transaminazlar	60

	2.7.3.4. Ortalama Korpuskuler Hacim	61
	2.7.3.5. Belirleyicilerin Birlikte Kullanımı	61
	2.7.3.6. 5-Hidroksitriptofol	61
	2.7.3.7. Beta-Hekzoaminidaz	61
	2.7.3.8. Asetaldehit Bileşimleri	61
	2.7.3.9. Diğer Laboratuvar Testleri	61
3.	MATERYAL VE METOD	63
	3.1. Hayvanlar	63
	3.2. Biyokimyasal Analiz	65
	3.2.1. Karaciğer TBARS Düzeylerinin Ölçümü	65
	3.2.2. Karaciğer Protein Karbonil Grupları Tayini	66
	3.2.3. Karaciğer Sülfhidril (-SH) Grupları Tayini	67
	3.2.4. Karaciğer GSH Düzeylerinin Ölçümü	68
	3.2.6. Karaciğer CAT Aktivitelerinin Ölçümü	69
	3.2.7. Karaciğer SOD Aktivitelerinin Ölçümü	70
	3.2.8. Karaciğer Sitokin Düzeylerinin Ölçümü	72
	3.3. İstatiksel Analiz	74
4.	BULGULAR	75
	4.1. Karaciğer TBARS Düzeyleri	75
	4.2. Karaciğer Protein Karbonil Grupları	75
	4.3. Karaciğer Sülfhidril (-SH) Grupları	76
	4.4. Karaciğer Redükte Glutasyon Düzeyleri	77
	4.5. Karaciğer CAT Aktiviteleri	78
	4.6. Karaciğer SOD Aktiviteleri	78
	4.7. Karaciğer Sitokin Düzeyleri	79
	4.7.1. TNF- α Düzeyleri	79
	4.7.2. INF- γ düzeyleri	80
	4.8. Plazma AST ve ALT Düzeyleri	81
5.	TARTIŞMA	82
6.	SONUÇ	93
	REFERANSLAR	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
AA	: Asetaldehit
ADH	: Alkol dehidrogenaz
AKH	: Alkolik karaciğer hastalığı
ALDH	: Aldehit dehidrogenaz
ALT	: Alanin transaminaz
AP-1	: Aktivatör Protein-1
AST	: Aspartat transaminaz
β	: Beta
CAT	: Katalaz
$\text{CH}_3\text{C}(\cdot)\text{HOH}$: α -hidroksietil radikali
COX	: Siklooksijenaz
CYP450 2E1	: Sitokrom P450 2E1
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNL	: Denovo Lipogenez
DNP	: Dinitrofenil hidrazin
DTNB	: 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit
e^-	: Elektron
ELAM-1	: Endotelyal lökosit adhezyon molekül-1
eNOS	: Endotelyal Nitrik oksit sentaz
EtOH	: Etanol
$\text{F}_2 \alpha\text{-IP}$: $\text{F}_2 \alpha$ -İzoprostanlar
FA-CoA	: Fatty asil-Coa
γ	: Gama
g	: Gram
GC	: Gaz Kromatografisi
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
GGT	: Gama-glutamil transferaz

GM-CSF	: Granülosit-Monosit koloni uyarıcı faktör
GPer	: Glutasyon peroksidaz
GSH	:Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GSSGR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
·OH	: Hidroksil radikali
4-HNE	: 4-hidroksinonenal
5-HIAA	: 5-hidroksiindol-3-asetik asit
5-HTOL	: 5-hidroksitriptofol
HO ₂ ·	: Perhidroksil radikali
HOCl	: Hypoklorik asid
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ICAM-1	: İntraselüler adhezyon molekül-1
IFN	: İnterferon
I-KB	: İnhibitör-KB
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik oksit sentaz
JAK	: Janus kinaz
KC	: Karaciğer
KYT	: Karbohidrat yetersiz transferrin
L	: Litre
L·	: Lipid radikali
LAF	: Lenfosit aktive edici faktör
LAK	: Lenfokine-activated killer
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LO·	: Alkoksil radikali
LOO·	: Peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksit
LOX	: Lipooksijenaz

LPS	: Lipopolisakkarit
μ	: Mikro
M	: Molar
MAA	: MDA-Asetaldehit
MAF	: Makrofaj Aktive edici faktör
MAP-K	: Mitojen Aktive protein kinaz
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
MDA	: Malondialdehit
MEOS	: Mikrozomal etanol okside edici sistem
MFF	: Makrofaj füzyon faktör
MHC	: Major histokompatibiliti kompleks
MIF	: Göçü önleyici faktör
MIP-2	: Makrofaj İnflamatuvar protein-2
MPO	: Miyeloperoksidaz
MS	: Kütle spektrofotometresi
NaOH	: Sodyum hidrokisit
NEFA	: Non esterifiye yağ asitleri
NF-KB	: Nükleer faktör-KB
NK	: Natural killer (Doğal öldürücü) hücreler
nNOS	: Nöronal Nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
1O_2	: Singlet oksijen
O_2	: Moleküler oksijen
$O_2^{\cdot-}$: süperoksit anyon radikalleri
ONOO $^-$: Peroksinitrit
PI-3K	: Fosfotidil inozitol-3 kinaz
PL	: Fosfolipid
PTK	: Protein trozin kinaz
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
R $^{\cdot}$: Aril radikali

RNA	: Ribonükleikasit
SH	: Sülfidril grupları
SOD	: Süperoksit dismutaz
STAT	: Signal transducer and activator of transcription
TBARS	: Tiyo barbitürik asit reaktif ürünleri
TCA	: Trikarboksilik asit
TG	: Trigliserid
TGF	: Transforming growth faktör
TNF	: Tümör nekroz faktör
VCAM-1	: Vasküler hücre adhezyon molekül-1
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
XD	: Ksantin dehidrogenaz
XO	: Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1. Reaktif oksijen ürünlerinin kaynakları ve meydana gelen reaksiyonlar	5
Şekil 2.2.1.1. Mitokondriyal kaynaklı reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ve lipid peroksidasyonu	6
Şekil 2.2.5.1. Reaktif nitrojen türleri ve reaktif oksijen ürünlerinin kaynakları, etki mekanizmaları ve birbirleriyle olan ilişkileri	12
Şekil 2.3.1.1. Lipid peroksidasyonunda meydana gelen reaksiyonlar ve ürünler	14
Şekil 2.4.1. CYP450 2E1'in fizyolojik ve toksik rolü	19
Şekil 2.4.2. Reaktif oksijen ürünlerinin ve TNF- α rasındaki etkileşim	21
Şekil 2.5.5.1.a. Redükte glutatyonun (GSH) yapısı ve b. Okside glutatyonun (GSSG) yapısı	25
Şekil 2.5.5. Glutatyon redoks döngüsü	27
Şekil 2.5.9.1.1. Flavonoidlerin temel yapısı	28
Şekil 2.5.9.1.2. Çeşitli Flavanoidler	29
Şekil 2.5.9.1.3. Rutinin yapısı	30
Şekil 2.5.9.2.1.a. Quercetinin yapısı; b. Quercetinin serbest radikal yakalama bölgeleri	30
Şekil 2.6.8.1. Makrofajlardan TNF- α 'nın salınması	40
Şekil 2.7.1. Etanolün oksidasyonu	45
Şekil 2.7.2. EtOH metabolizması sonucu laktik asit düzeyinin artışı	48
Şekil 2.7.1.1. Kronik alkol tüketiminin çeşitli organ ve dokular üzerindeki etkisi	49
Şekil 2.7.1.1.1. Kronik etanol tüketiminde lipid metabolizması ve VLDL-TG sentezi	50
Şekil 2.7.1.5.1.a. TNF- α 'nın apoptozu ile indüklemesi	53
Şekil 2.7.1.5.1.b. TNF- α 'nın nekrozu ile indüklemesi	53
Şekil 2.7.1.7.1. Kollajen doku sentezi ve firozis mekanizması	57
Şekil 3.2.6.1. SOD standart grafiği	72

Şekil 3.2.7.1. TNF- α Standart grafiği	73
Şekil 3.2.7.2. IFN- γ Standart grafiği	74
Şekil 4.1.1. Karaciğer TBARS düzeyleri	75
Şekil 4.2.1. Karaciğer protein karbonil grupları düzeyi	76
Şekil 4.3.1. Karaciğer sülfhidril grupları düzeyi	77
Şekil 4.4.1. Karaciğer redükte glutatyon (GSH) düzeyleri	77
Şekil 4.5.1. Karaciğer SOD aktiviteleri	78
Şekil 4.6.1. Karaciğer Katalaz aktiviteleri	79
Şekil 4.7.1. Karaciğer TNF- α düzeyleri	80
Şekil 4.8.1. Karaciğer IFN- γ düzeyleri	80
Şekil 4.9.1. Plazma ALT Düzeyleri	81

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.2.6.1. Reaktif oksijen ürünlerinin tahmini yarı ömürleri	13
Tablo 2.5.1. Biyolojik sistemlerdeki antioksidanlar	22
Tablo 2.4.5.1. Sitokinlerin sınıflandırılması	37
Tablo 2.6.9.1. İnterferonlar ve sınıflandırılmalar	42
Tablo 4.1.1. Karaciğer TBARS düzeyleri	75
Tablo 4.2.1. Karaciğer protein karbonil grupları düzeyi	76
Tablo 4.3.1. Karaciğer sülfhidril grupları düzeyi	77
Tablo 4.4.1 Karaciğer glutatyon (GSH) düzeyleri	77
Tablo 4.5.1. Karaciğer SOD aktiviteleri	78
Tablo 4.6.1. Karaciğer Katalaz aktivitele	79
Tablo 4.7.1.1. Karaciğer TNF- α düzeyleri	80
Tablo 4.8.2.1. Karaciğer IFN- γ düzeyleri	80
Tablo 4.9.1. Plazma ALT Düzeyleri	81

ÖZET**Etanolün Oluşturduğu Karaciğer Hasarı Üzerine Quercetin Etkisi**

Alkolik karaciğer hastalığı, kronik etanol tüketiminin neden olduğu önemli bir sağlık sorunudur. Etanol tüketimini takiben sırasıyla inflamasyon, nekroz, steatohepatit, fibrozis ve siroz gelişebilmektedir. Bu patolojik durumlar inflamasyon ve oksidatif hasarın rolü ile açıklanabilir.

Quercetin (3,5,7,3',4'-Pentahidroksiflavon) eksojen kaynaklı bir antioksidan flavonoid olup, çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasarı ve hücre ölümünü engellerler; oksijen radikallerini temizler, lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar. Antiinflamatuvar, antioksidan, antitrombotik, antibakteriyal, antiviral, antialerjik ve antitümöral gibi klinik özellikleri vardır.

Bu çalışmanın amacı ratlarda alkolik karaciğer hastalığında oksidatif stres ve inflamasyona karşı quercetin tedavisinin koruyucu bir rolünün olup olmadığını değerlendirmektir.

Bu amaçla, 25 Adet Sprague-Dawley yetişkin erkek rat 4 gruba ayrıldı: 1. Kontrol grubu (K); İntragastrik olarak serum fizyolojik (SF) verildi (2 ml/gün). 2. Alkol grubu (EtOH); İntragastrik olarak %80 (v/v)'lik EtOH (1 ml/gün) ve SF (1 ml/gün) verildi. 3. Quercetin grubu (Q); quercetin (1 ml/3 gün) ve SF (1 ml/gün) verildi. 4. Alkol+Quercetin grubu (EtOH+Q); Alkol verilmeden 2 saat önce quercetin verildi. Quercetin (3 g) 100 ml SF ile süspanse edildi. 30 gün sonra ratların karaciğer numuneleri alındı ve çalışılincaya kadar -20 °C'de saklandı.

Karaciğer homojenatında, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak tiyo barbitürikasit reaktif ürünleri (TBARS) düzeyleri, protein oksidasyonunun göstergesi olarak da protein karbonil düzeyleri, antioksidan kapasitenin

göstergesi olarak redükte glutatyon (GSH) ile protein sülfidril (SH) gruplarının düzeyleri ve katalaz (CAT) ile süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri, inflamatuvar proçesin göstergesi olarak da proinflamatuvar sitokinlerden tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve interferon-gama (IFN- γ) düzeyleri ölçüldü.

Yapılan çalışmalar sonucunda EtOH grubunda kontrol grubuna göre artmış TBARS, protein karbonil seviyeleri, TNF- α ve IFN- γ düzeyleri ile azalmış GSH, SH düzeyleri ve düşük CAT aktivitesi gözlemlendi. EtOH+Q grubunda ise EtOH grubuna göre azalmış TBARS, protein karbonil düzeyleri, TNF- α ve IFN- γ düzeyleri ile artmış CAT aktivitesi, GSH ve SH düzeyleri bulundu. SOD aktivitesi ise gruplar arasında farklılık göstermedi.

Sonuç olarak, quercetin'in karaciğer TBARS, karbonil, TNF- α ve IFN- γ düzeylerini azaltarak, SH ve GSH düzeyleri ile CAT aktivitesini artırarak, alkolik karaciğer hastalığı patogenezi üzerine olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Quercetin'in antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinden dolayı alkolün neden olduğu hasara karşı karaciğer hücrelerini koruduğunu gösterdik.

Anahtar Sözcükler: Etanol, interferon-gama (IFN- γ), oksidatif stres, quercetin, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α).

SUMMARY

The Effect of Quercetin on Ethanol-Induced Hepatic Injury

Alcoholic liver disease is a primary health problem of chronic ethanol consumption. Inflammation, necrosis, steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis of liver could develop after ethanol consumption, respectively. The pathogenesis could be explained by role of inflammation and oxidative damage.

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone) is an exogen antioxidant flavonoid. It prevents oxidant injury and cell death via several mechanisms; such as scavenging oxygen radicals, protecting against lipid peroxidation, and chelating metal ions. It has been recognized for having clinical properties, such as antiinflammatory, antioxidant, antithrombotic, antibacterial, antiviral, antihistaminic, antitumoral activities.

The aim of the present study is to evaluate whether the quercetin treatment could have a protective effect against oxidative stress and inflammation in alcoholic liver injury in rats or not.

For this purpose, twenty five male Sprague-Dawley rats (adult) were divided four groups: 1. Control group (C); received saline, intragastrically (2 ml/day). 2. Alcohol group (EtOH); received EtOH, (1 ml/day, 80% v/v) intragastrically and saline (1 ml/day). 3. Quercetin group (Q); received quercetin (1 ml/3day) and saline (1 ml/day). 4. Alcohol+Quercetin group (EtOH+Q): Quercetin (1 ml/3day) was introduced 2 h before EtOH administration (1ml 80% v/v). Quercetin (3 g) was suspended in 100 ml of saline. Liver samples were taken after 1 month and stored at -20 °C until the analyses.

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels as an indicator of lipid peroxidation, content of protein carbonyl as an indicator of protein oxidation, the levels of reduced glutathion (GSH) and protein sulphhydryl groups (SH) and catalase (CAT) and superoxid dismutase (SOD) activities as indicator antioxidant capacity and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ) levels from proinflammatory cytokines, as an indicator of inflammatory process and have been estimated in the homogenates of liver.

As a result of these measurements, it has been shown that increased tissue TBARS, protein carbonyl groups, TNF- α and IFN- γ and decreased GSH, SH levels and decreased CAT activities in EtOH group were found when compared to C group. Decreased plasma TBARS, protein carbonyl groups, TNF- α and IFN- γ levels and increased GSH and SH levels and increased CAT activities in EtOH+Q group were also found when compared to EtOH group. The SOD activities were not significantly different from other groups.

In conclusion, it has been shown that quercetin has positive effects on pathogenesis of alcoholic liver disease by decreasing the levels of TBARS, carbonyl, TNF- α and IFN- γ , increasing the levels of SH and GSH and activities of CAT. We shown that quercetin is of benefit by protecting cells from the harmful effects of alcohol or at least it reduces the damage.

Key Words: Ethanol, Interferon-gamma (IFN- γ), oxidative stress, quercetin, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).