

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN SIÇAN BÖBREK
DOKUSUNDA QUERCETİNİN APOPTOZİS VE REAL-TİME PCR İLE
TAYİN EDİLEN İNOS GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

M. KENAN KINACI

TEZ DANIŐMANI

DOÇ. DR. NİLÜFER ERKASAP

KASIM, 2008

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SİÇAN BÖBREK DOKUSUNDA QUERCETİNİN APOPTOZİS VE REAL-TİME
PCR İLE TAYİN EDİLEN İNOS GEN İFADESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

M. KENAN KINACI

TEZ DANIŐMANI

DOÇ. DR. NİLÜFER ERKASAP

KASIM, 2008

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mustafa Kenan KINACI'nın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Sıçan Böbrek Dokusunda "İskemi/Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçan Böbrek Dokusunda Quercetin'in Apoptozis Ve Real-Time Pcr İle Tayin Edilen iNOS Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek "KABUL" edilmiştir.

27.10.2008

Üye : Prof. Dr. Ziya KAYGISIZ

Üye : Prof. Dr. Ruhi UYAR

Üye : Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye : Doç. Dr. Nilüfer ERKASAP

Üye : Yrd. Doç. Dr. Selda KABADERE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22/12/2008 tarih ve 370/3566 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmanın amacı quercetin, böbrekte iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı oluşturulmuş sıçanlarda apoptoz ve iNOS gen ekspresyonu üzerine etkisini araştırmaktır. Çalışmada 42 adet Sprague-Dawley türü sıçan kullanılmış ve 3 gruba ayrılmıştır. I; kontrol grubu, II; 2 saat iskemi ve 6 saat reperfüzyon grubu, III; iskemiden 1 saat önce 50 mg/kg quercetin (i.p.) verilmiş ve böbrek dokuları (I/R) hasarına maruz bırakılmıştır. Dokulardan biyokimyasal olarak MDA ve GSH düzeyleri çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda MDA, quercetin ile tedavi sonrası I/R grubuna göre önemli düzeyde düşük bulunmuş ve GSH düzeyi ise I/R grubunda azalırken quercetin tedavisi ile artış göstermiştir.

Histolojik sonuçlarımızda, hematoksilen eosin ile yapılan genel doku değerlendirmesinde I/R grubunda, belirgin derecede ödem, vaskülarizasyon ve yer yer inflamatuvar hücrelere ait infiltrasyon alanları vardı. Quercetin uygulanan gruptaki apoptotik hücre sayısının I/R grubundaki apoptotik hücre sayısına göre daha az olduğu tespit edildi. Real-Time PCR ile yapılan iNOS gen ifadesi analizlerinde I/R grubunda iNOS gen (hedef gen) ekspresyonunun arttığı gözlenmiş ancak bunun GAPDH (referans gen) ile relatif konsantrasyonuna bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Quercetin, böbrek I/R hasarına karşı dokuda apoptotik hücre sayısını azaltarak ve iNOS gen ifadesini düzenleyerek koruyucu bir etki göstermiştir.

SUMMARY

The aim of this study is to evaluate the effects of quercetine on apoptosis and iNOS gene expression on kidney of I/R induced rats. Divided in three groups, 42 Sprague-Dawley rats were used for this study. The animals were. Control group, I/R group (was exposed to two hours ischemia and six hours reperfusion) and quercetin+I/R group (50 mg/kg quercetin, i.p, one hour before the ischemia). After reperfusion, the animals were sacrificed and kidneys were removed. MDA and GSH levels were analyzed by biochemical methods. Compared to the I/R group, MDA levels were significantly decreased in quercetine group, however GSH levels were increased with quercetine treatment.

Histological evaluation of hematoxylene eosine stained tissue sections in the I/R group showed edema vascularisations and local areas of inflammatory cell infiltration. The number of apoptotic cells in the quercetine treatment group was found to be less than the apoptotic cells in the I/R group. iNOS gene expression analysis by Real-Time PCR showed that the expression of iNOS gene (target gene) was increased in the I/R group, but when the concentration was calculated relative to the GAPDH (reference gene), the differences were not statistically significant.

Quercetin, decreased apoptotic cell number and regulates iNOS gene expression, so it has protective effects on renal tissue I/R injury.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ:.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 İskemi/Reperfüzyon	3
2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)	4
2.1.2.Oksidatif Stres.....	7
2.1.3. İskemi/Reperfüzyon hasarı:	8
2.1.3.1. Nitrik Oksit (NO)	9
2.2. Apoptozis:.....	10
A. Hücre içi uyaranlar aracılığı ile hücrenin apoptoza girmesi:.....	12
B. Hücre dışı uyaranlar aracılığı ile hücrenin apoptoza girmesi :	14
2.3. Quercetin:	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar	18
3.1.1. Cerrahi Malzemeler	18
3.1.2 Cihazlar:	18
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler:	19
3.2. Gereç ve Yöntem	20
3.3. Deney Protokolü	20
Grup 1: Kontrol Grubu.....	20
Grup 2: İskemi/Reperfüzyon (İ/R) Grubu.....	21
Grup 3: Quercetin + İskemi/Reperfüzyon (İ/R) Grubu.....	21
3.4. Dokuların Alınması.....	22
3.5. Biyokimyasal Değerlendirme	22
3.5.1. Doku Malondialdehit (MDA) ve GSH Düzeyi Tayini.....	22

3.6. Histolojik Değerlendirme:	23
3.7. Real-Time PCR (RT-PCR).....	23
3.7.1. RNA izolasyonu.....	24
3.7.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	25
3.7.3. cDNA Sentezi	25
3.7.4. Real-Time PCR.....	27
3.7.5. Primer Dizilerinin Hazırlanması	27
3.7.6. Real-Time PCR ürünlerinin jel elektroforezi ile incelenmesi	28
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler.....	29
3.8.1. Biyokimyasal verilerin Değerlendirilmesi:	29
3.8.2. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi:	30
3.8.3. Real-Time PCR Bulguların Değerlendirilmesi:.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	31
4.2. Histolojik Bulgular.....	32
4.3. iNOS Gen ifadesi Bulguları.....	35
4.3.1. iNOS geninin kantitatif analizi:	35
4.3.2. iNOS gen amplifikasyon sonuçları:	37
4.3.3. iNOS mRNA düzeyleri:	38
5. TARTIŞMA.....	39
6. KAYNAKÇA	43
7. Özgeçmiş	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Numaraları.	Şekil Açıklamaları	Sayfa Numaraları
Şekil 1.	Hücre içi uyaranlarla mitokondriden sitokrom c salınımı ve kaspaz 3'ün aktivasyonu.	13
Şekil 2.	Hücre dışı uyaranlarla hücrenin apoptoza girmesi.	15
Şekil 3.	Her gruptan rastgele 2'şer örnek olmak üzere seçilmiş PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	29
Şekil 4.	Doku MDA düzeyleri.	31
Şekil 5.	Doku GSH düzeyleri.	31
Şekil 6.	Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda kortikomeduller bölgenin histolojik görünümü.	33
Şekil 7.	I/R grubuna ait böbrek dokusunda kortikomeduller bölgenin histolojik görünümü	33
Şekil 8.	I/R+Q grubuna ait böbrek dokusunda kortikomeduller bölgenin histolojik görünümü	34
Şekil 9.	I/R grubuna ait böbrek dokusunda apoptotik hücrelerin görünümü	34
Şekil 10.	I/R+Q grubuna ait böbrek dokusunda apoptotik hücrelerin görünümü	35
Şekil 11.	Real-Time PCR melt analizinin yazılım görüntüleri	36
Şekil 12.	Real-Time PCR'da yapılan gen amplifikasyonunun yazılım görüntüleri	37
Şekil 13.	iNOS mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi.	38

TABLolar DİZİNİ

Tablo Numaraları	Tablo Açıklamaları	Sayfa Numaraları
Tablo 1.	cDNA sentezi için kullanılan miks içeriği	26
Tablo 2.	Real-Time PCR için miks içeriği.	27
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan iNOS primerlerinin dizileri, Tm dereceleri	28
Tablo 4.	Histolojik değerlendirme	32
Tablo 5.	Hedef ve referans gene ait kantitatif değerler kullanılarak ortalama gen konsantrasyonlarının hesaplanması	38

SİMGE VE KISALTMALAR

ABH	: Akut böbrek hastalığı
AİF	: Apoptozis indükleyici faktör
ATP	: AdenozinTriFosfat
CAT	: Katalaz
DD	: Ölüm alanı (Dead domain)
DISC	: Death-inducible signaling complex
DNA	: DeoksiriboNukleikAsit
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FADD	: Adaptör protein
FasL	: Fas ligandı
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phospat dehydrogenase
GSG	: Redükte glutatyon
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
GPx	: Glutatyon peroksidaz
İ	: İskemi
İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
ip	: İntraperitoneal
L·	: Lipid radikali
LOO·	: Lipid peroksit radikali
LOOH	: Lipid peroksit
MDA	: Malondialdehit
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂⁻	: Süperoksit
OH·	: Hidroksil radikali
ONOO⁻	: Toksik peroksinitrit
NO	: Nitrik oksit

PCR	: Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
Q	: Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksil flavon)
R	: Reperfüzyon
RNA	: RiboNukleikAsit
RNT	: Reaktif nitrojen türevleri
rpm	: Round per minute
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikali
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa

1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Yapılan araştırmalar, iskemi/reperfüzyon sırasında oluşan doku hasarının etyopatogenezinde, serbest oksijen radikallerinin (SOR) önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (2,3). SOR' leri hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Ayrıca, mitokondri ve hücre zarındaki hücre hasarının başlıca nedeni olan lipid peroksidasyonuna yol aarak zar geçirgenliğinde değişikliğe veya zar bütünlüğünde bozulmaya neden olurlar. Oluşan zar hasarı bütün hücre zarını etkileyebileceği gibi hücre içi organellerin zarlarını da ilgilendirmektedir (34). Lipid peroksidasyonunun, membranın lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile membran işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre hasarına neden olduğu düşünölmektedir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehit (MDA) dır. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçölmesi lipid peroksidasyonun göstergesi olarak değerlendirilir (28).

Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin yanı sıra reaktif nitrojen türevlerinin de [başlıca nitrik oksit (NO) ve onun peroksinitrit gibi toksik metabolitleri olmak üzere] önemli miktarlarda artış gösterdiği söylenmekle birlikte İ/R hasarında NO'in rolünün halen tartışmalı olduğunu savunanlar da vardır (51). İ/R sırasında NO sentezi için iNOS aktivitesi artış gösterir. iNOS tarafından üretilen NO çeşitli dokularda olduğu gibi böbrek İ/R hasarının patofizyolojisinde de önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda böbrek İ/R hasarında, böbrek fonksiyon bozukluklarının iNOS aktivitesinin inhibisyonu ile azaltılabileceği bildirilmişdir (30).

Programlı hücre ölümü anlamına gelen "apoptozis", hem hücre sel homeostazisin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir (4). Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücrelerin, çevreye zarar

vermeksizin ortadan kaldırılır. SOR'lerinin orta düzeyleri birçok farklı hücrede apoptoza neden olur. Son zamanlarda apoptoza karşı koruyucu etki gösteren antioksidanlarla pek çok çalışma yapılmaktadır (22).

Bir antioksidan olan quercetin (Q) (3,5,7,3',4'-pentahidroksil flavon) flavinoid ailesinin önemli bir üyesidir. Quercetin, antioksidan etkisinin dışında anti-inflamatuar, anti-iskemik, anti-peroksidatif özelliklere de sahiptir. Bütün bunların yanı sıra Ishikawa ve arkadaşlarının yapmış olduğu böbrek glomerüler hücre kültürü çalışmalarında quercetin'in anti-apoptotik etkisinin de olduğu gösterilmiştir (22).

Bu bilgilerin ışığı altında, İ/R'nun dokuda pek çok hasara yol açtığı ve buna karşı koruma mekanizmalarının araştırıldığı bilinmektedir. İ/R ile oluşturulmuş akut böbrek hastalığı (ABH) modellerinde, SOR' leri doğrudan hücrede hasara yol açmakta ve bu hasarın şiddetine göre hücre ya apoptoz ya da nekroz ile ölüme gittiği ve bütün bunların yanısıra İ/R hasarında iNOS geninin de olaya karıştığı bilinmektedir. Dokuyu bu hasarlardan koruma amaçlı pek çok deneysel çalışmada antioksidan tedavi uygulanmıştır. Bu antioksidan maddelerden flavinoid ailesinin bir üyesi olan quercetin tedavisinin dokuyu oksidatif hasardan koruduğu bilinmekle birlikte iNOS gen ifadesi ve apoptozis ile ilgisi hakkında yeterli bir bilgiye ulaşamamıştır. Bu nedenle laboratuvarımızda yaptığımız çalışmamızda; sıçan böbrek dokusunda quercetin'in apoptozis ve Real-Time PCR ile tayin edilen iNOS gen ifadesi üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

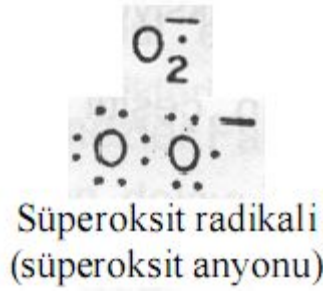
2.1 İskemi/Reperfüzyon

Arterlerde herhangi bir nedenle oluşan tıkanma sonucu, dokuya giden kan akımının bozulması iskemi (İ) olarak tanımlanır. İskemi sonucunda hücre ölümleri ve organ yetmezlikleri çok sık rastlanan bulgulardır (2, 41, 49). İskemi sırasında kan akımının kesilmesi ve taşınan oksijen miktarındaki azalma anaerobik metabolizmayı devreye sokar. Dokuda laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi de hücre hasarına katkıda bulunur (25). İskemik dokuda kan akımının normale dönmesiyle enerji kaynağının geri gelmesine ise reperfüzyon (R) denir. İskemik dokunun reperfüzyonu dokunun hayatta kalabilmesi için çok önemlidir fakat reperfüzyon, iskemik dokuya reperfüzyon hasarı olarak da tanımlanan ek hasarlar getirir (10, 41, 49). Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi ile O₂ kaynaklı serbest radikallerin İ/R hasarında önemli rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (2, 16, 23, 25, 28). İskemi ve reperfüzyon hasarını açıklayan pek çok mekanizma bildirilmiştir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca⁺² artışı ve hücre iskeleti ile zar fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda SOR oluşarak, oksidatif strese neden olmaktadır (5). Reperfüzyon sırasında hem SOR (başlıca hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları olmak üzere) hem de RNT (başlıca nitrik oksit ve onun peroksi nitrit gibi toksik metabolitleri olmak üzere) önemli miktarlarda artış olur (13).

2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Yapılan araştırmalar, İ/R sırasında oluşan doku hasarının etyopatogenezinde, SOR' lerinin önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (16, 23, 25, 28). İ/R sırasında SOR' lerinin çok yüksek oranda oluşumu, nötrofil aktivasyonu ve mikrovasküler fonksiyon bozuklukları doku hasarında artışa neden olur (16) Kardiyak iskemi, serebral iskemi gibi mortalitesi ve morbiditesi yüksek hastalıkların yanı sıra karaciğer dolaşımının azaldığı hemorajik şok, sepsisin geç dönemi gibi tablolarda çeşitli vasküler lezyonlarda ve transplantasyon gibi durumlarda da ortaya çıkan doku hasarından, İ/R sırasında oluşan SOR' leri sorumlu tutulmaktadır (28, 49). Ayrıca İ/R sırasında inflamatuvar reaksiyonlar da aktive olup tümör nekrozis faktör- α , interlökin-1 ve araşıdonik asit metabolitleri gibi inflamatuvar sitokinlerin oluşumuna neden olur (2, 32).

SOR' leri, in vivo olarak hücrede normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan radikaller olduğu kadar, organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara ve doğal durumda serbest radikal metabolitleri oluşturabilen ksenobiotiklere maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler (15). Bu radikaller, atomik yapılarında bir veya daha fazla eşleşmemiş (ortaklanmamış) elektrona sahip kısa ömürlü, kararsız, moleköl ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanırlar (33, 34, 42). Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Bunlar süperoksit (O_2^-), nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahip radikallerdir. (34). Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz (CAT), peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik yolakla daha zayıf etkili ürünlere dönüştürölerek etkisiz kılınır (34, 42).

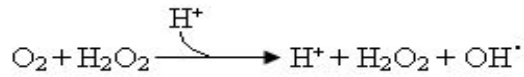


Süperoksit radikalinden enzimatik yolla oluşan H_2O_2 daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikalini ($OH\cdot$) oluşturur. Hidrojen peroksit serbest radikal olmadığı halde serbest oksijen radikalleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{++} veya diğer geçiş metallerinin varlığında **Fenton reaksiyonu**, süperoksit radikalinin varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu** sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşur (33, 48).

Fenton Reaksiyonu



Haber-Weiss Reaksiyonu



SOR' leri hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Bu yüksek reaktif moleküller hücre zarlarında doymamış yağ asitleri, DNA' da nükleotidler, proteinlerde kritik sülfidril bağları ile reaksiyona girerek doku hasarı oluştururlar (42). Bu serbest radikaller mitokondri ve hücre zarındaki hücre hasarının başlıca nedeni olan lipid peroksidasyonu yoluyla zar geçirgenliğinde değişikliğe veya zar bütünlüğünde bozulmaya neden olur (13, 42).

Lipid peroksidasyonu, bir radikalın membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir H atomu uzaklaştırılması ile

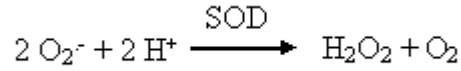
başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit radikali ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit, hidroksil radikaline dönüşerek etkili oldukları için, lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikalın hidroksil radikali olduğu görüşü benimsenmektedir. Hücre zarlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (33)

Hücre zarlarında lipid serbest radikalleri ($L\cdot$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO\cdot$) oluşması, SOR'nin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Lipid radikallerinin moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipid peroksit radikalleri, zar yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine ($LOOH$) dönüşürler. Bu olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Oluşan zar hasarı bütün hücre duvarını etkileyebileceği gibi hücre içi organellerin zarlarını da ilgilendirmektedir. Lipid peroksidasyonunun, membranın lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile membran işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir (15, 33)

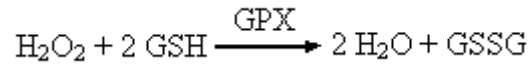
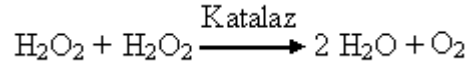
Lipid peroksitleri yıkılınca biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehit (MDA) dır. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve böylece iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksidasyonun göstergesi olarak değerlendirilir (33, 34).

2.1.2.Oksidatif Stres

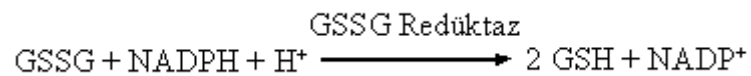
Vücutun antioksidan savunması ile serbest radikal üretimi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulmasına oksidatif stres adı verilir. (33, 34). İ/R sırasında da dokudaki koruyucu enzim sistemlerinin aktivitesine ve düzeylerine bağlı olarak oksidatif hasar oluşur. SOR' nin zararlı etkileri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi tarafından dengelenir. Enzimatik savunma yolağında en iyi bilinenler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX)'dir (41). SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eden önemli bir enzimidir (17, 48).



Normal koşullarda hücrede oluşan H_2O_2 radikaline karşı katalaz ve glutatyon peroksidaz etki gösterir. H_2O_2 'i suya dönüştürerek detoksifiye ederler ve daha fazla toksik ürünlerin oluşumunu önlerler (42,48).



Antioksidan etkinliğin devam edebilmesi için okside glutatyonun (GSSG) tekrar redükte (GSH) glutatyonla dönüştürülmesi gereklidir. Bu işlem NADPH bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz tarafından yerine getirilir (33).



2.1.3. İskemi/Reperfüzyon hasarı:

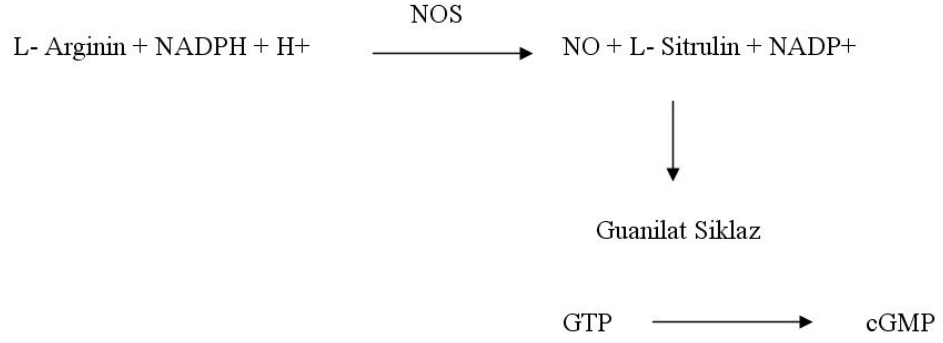
İskemik dokunun reperfüzyonu sonucu oluşan doku hasarında SOR' leri önemli rol oynamaktadır. Bu hipoteze göre, iskemi sırasında yeterince oksijen sağlanamaması ve metabolitlerin birikmesi ayrıca reperfüzyonda da organın tekrar kanlanmasıyla dokuya gelen oksijenin dokuda oksijen radikallerine dönüşmesi hep birlikte hücre hasarına neden olur (5, 49).

İ/R esnasında ortaya çıkan süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikaller mitokondri ve hücre membrandaki lipidlerin peroksidasyonu yoluyla membran geçirgenliğinde artışa veya membran bütünlüğünde bozulmaya neden olur (13).

Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin yanı sıra reaktif nitrojen türevlerinin (RNT) de (başlıca nitrik oksit NO ve onun peroksinitrit gibi toksik metabolitleri olmak üzere) önemli miktarlarda artış gösterdiği söylenmekle birlikte (13, 49) İ/R hasarında NO'in rolünün halen tartışmalı olduğunu savunanlarda vardır (41).

2.1.3.1. Nitrik Oksit (NO)

Endotel türevli ve çok önemli bir endojen vazodilatör olan nitrik oksitin biyolojik sistemler üzerinde çeşitli fizyolojik ve patolojik etkisi bulunmaktadır. NO enzimatik olarak NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L- argininin terminal guanido nitrojen atomunun oksidasyonu ile yapılır (12, 30, 40, 41, 51).



Üç farklı NOS enzimi vardır; endotelial izoform (eNOS), nöronal izoform (nNOS) ve üçüncüsü de normal koşullarda üretilmeyen ancak inflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenebilen (iNOS) dur. Ayrıca iNOS, endotoksemi, hemorajik şok, sepsis gibi olaylarda da rol alır. (7, 12, 20, 41, 49, 51). nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için Ca^{++} bağımlı iken iNOS bağımsızdır (7, 51).

NO ve süperoksit anyonu spontan olarak toksik peroksinitrit (ONOO^-) iyonunu oluşturmak üzere reaksiyona girerler. Peroksinitrit oldukça kuvvetli ve değişken bir oksidan olup lipid, protein ve DNA ile reaksiyona girer (30, 50). Bu reaksiyonlar NO' in çok sayıdaki sitotoksik etkisini açıklayabilir. Çünkü hem süperoksit anyonu hemde NO dokuda İ/R hasarına katkıda bulunur (50). Peroksinitrit, protein tirozin nitrasyonu yoluyla veya OH ve NO' e ayrışarak dokuda direk oksidan hasara neden olur (30). Özellikle böbrekte peroksinitrit oluşumu İ/R patofizyolojisinde rol oynar (10).

İ/R sırasında NO sentezi için iNOS aktivitesi artış gösterir (2). iNOS tarafından üretilen NO çeşitli dokularda (13, 51) olduğu gibi böbrek İ/R hasarının patofizyolojisinde de önemli bir rol oynamaktadır (2). Yapılan çalışmalarda böbrek İ/R hasarında, böbrek fonksiyon bozukluklarının iNOS aktivitesinin inhibisyonu ile azaltılabileceği bildirilmiştir (10, 26, 30, 49). İn vivo ve in vitro böbrek çalışmalarında, iNOS aktivitesinin veya birikiminin inhibisyonunda, iNOS

yokluğunda böbrek İ/R hasarının düzelebileceği veya tamamen engellenebileceği gösterilmiştir (10, 26, 30, 49).

2.2. Apoptozis:

Programlı hücre ölümü anlamına gelen “apoptozis”, hem hücrel homeostazisin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir. Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücrelerin, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Bu işlem hem çok hücreli organizmaların normal gelişim süreci olan embriyogenezis sırasında, hem de erişkinlerde nerdeyse bütün dokularda hücrel çoğalma ve yenilenme arasındaki homeostatik dengenin ve doku içeriğinin kararlılığının korunması için gereklidir (6, 27, 38). Fetusda normal doku gelişimin temel özelliğidir. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Çeşitli uyaranlar apoptozis mekanizmasını uyarır. Bunlara örnek olarak, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), hücre içi kalsiyum düzeyinin artışı, glikokortikoidler, reaktif oksijen ürünleri, UV ışık, radyasyon, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir (19, 27).

Apoptozda asıl morfolojik olay, çekirdeğin yoğunlaşması ve parçalara ayrılmasıdır. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve hücre şişerken zar yapısı bozulur. Daha sonra zarda tomurcuklanmalar oluşur ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınıp fagosite edilirler. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma zarındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre zarının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle zarın dış tabakasına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfotidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (1).

Apoptozisde hücre sel yapının bozulmasının nedeni, Na, K ve Cl taşıyıcı sistemin durması sonucu hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptoz uyarısını alan hücre çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovilluslarını kaybeder. Elektron mikroskopunda gözlenen değişiklikler ise öncelikle hücre zarının şekli bozulmasıdır ve bunu takiben kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapılar ‘zeiozis’ adını alırlar. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP’ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanması ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz 30– 60 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanır. Elektron mikroskopunda apoptozis sırasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma zarının kabarması, mitokondri dış zarında şişme, mitokondrial membran aralığına sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptozis İndükleyici Faktör (AİF) salınımı en önemli morfolojik değişikliklerdir (1).

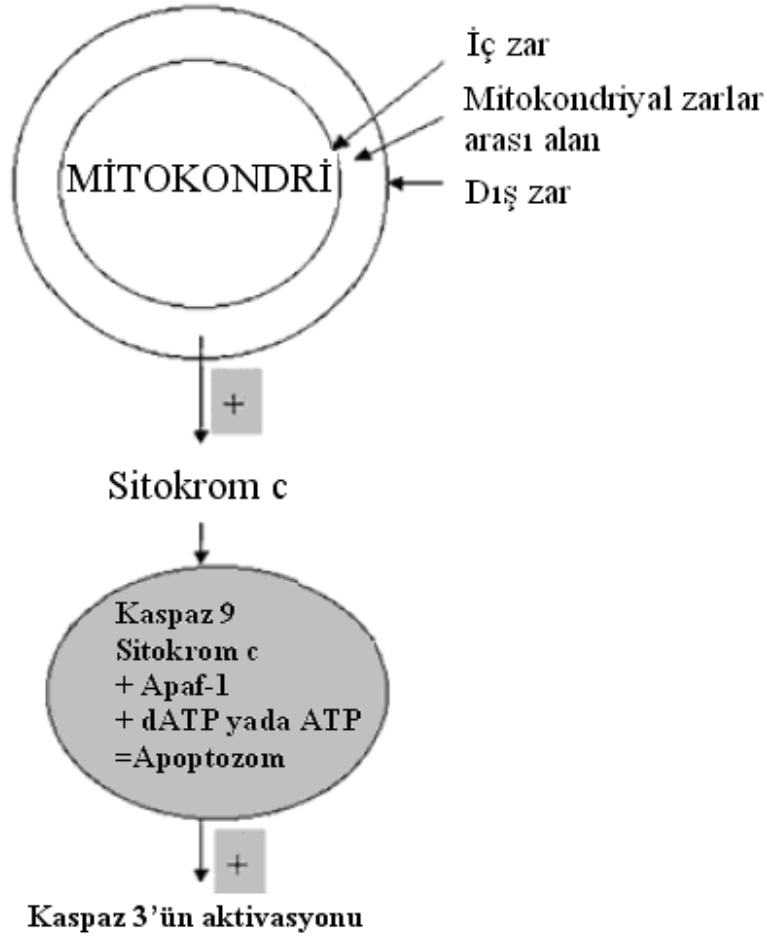
Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Apoptoz mekanizması henüz tam anlaşılacakla birlikte asıl önemli olan araç kaspazların aktivasyonudur (6). Proteaz ailesinden olan ve yapılarında sistein içeren bu enzimler tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar. Ölüm sinyali olarak da kabul edilen kaspazlara karşı çeşitli virüslerde kaspaz inhibitörleri saptanmıştır (29). Uyarana bağlı olmak üzere 2 temel mekanizma aracılığıyla apoptozis başlatılır (6, 27, 44).

A. Hücre içi uyarılar aracılığı ile

B. Hücre dışı uyarılar aracılığı ile

A. Hücre içi uyarılar aracılığı ile hücrenin apoptoza girmesi:

Birçok apoptotik uyarı, sonuçta mitokondri/apoptozom ölüm yolağı oluşturacak hücre organellerinde metabolik strese neden olabilirler. Apoptozisin çeşitli uyarıları doğrudan ya da dolaylı mitokondriden sitokrom c serbestlenmesine etki eder. Sitokrom c'nin sitoplazmaya sızması mitokondri/apoptozom bağımlı (intirinsik) ölüm yolağında anahtar olaydır. Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri bu yolağın kontrolünde önemli rol oynarlar. Bcl-2 gen ailesi üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine antagonist çalışarak apoptozu uyarıya engelleyen bcl-2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden pro-apoptotik olanlar (Bax, Bak, Bok, Bad, bid, Bim, Bmf) apoptozu uyarırken anti-apoptotik olanlar (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w) apoptozu engellerler (5, 37, 46). Bcl-2 gen ailesi üyelerinin oranı, hücrelerin yaşamasını veya ölmesini belirler. Bunların ekspresyon düzeyleri ve aktivasyon aşaması sitokrom c, prokaspaz -2, -3, -9, AİF (apoptoz içeren faktör), endonükleaz G, Smac/DIABLO gibi apoptoza yol açan moleküllerin salınımına etki eder. Bütün bu faktörler Bax/Bak kanalları ya da mitokondriyal membrandaki spesifik olmayan porlar tarafından serbestlenir. Prokaspaz -9'un aktivasyonu dATP ya da ATP'nin varlığında Apaf-1 ve sitokrom c tarafından kolaylaştırılır. Sitokrom c, Apaf-1, kaspaz -9 ve dATP ya da ATP birleşerek moleküler ağırlığı yaklaşık 700 – 1400 kDa olan apoptozom ile büyük bir bileşik oluşturur. Apoptozom üretimindeki anahtar oyuncu mitokondridir. Bununla birlikte kaspaz -9, aktive olur ve apoptotik hücre ölümü yolağında kaspaz -3, 6, 7 aktive edilir ve apoptozis gelişir (38, 44).



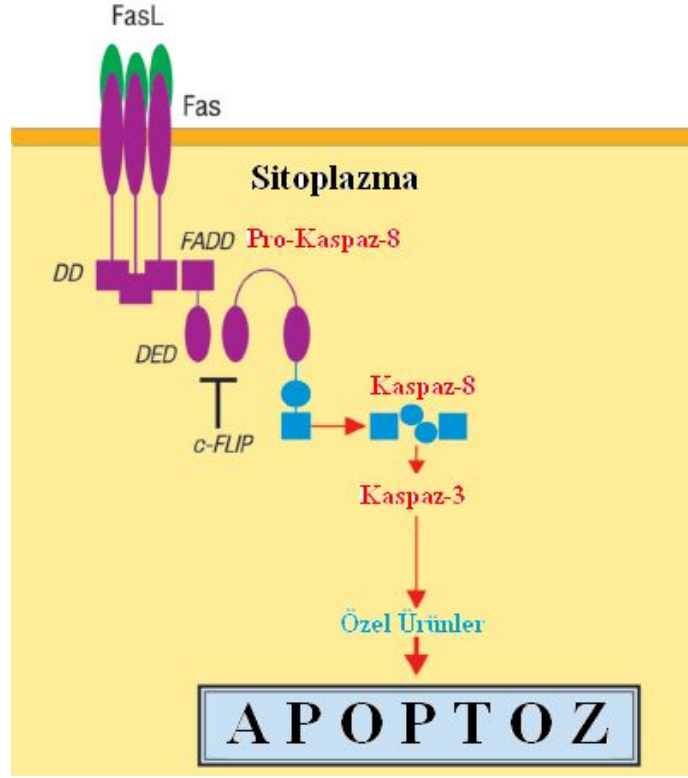
Şekil 1. Hücre içi uyarılarla mitokondriden sitokrom c salınımı ve kaspaz 3'ün aktivasyonu.

B. Hücre dışı uyarılar aracılığı ile hücrenin apoptoza girmesi :

Bir diğer yolak da tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinden, ölüm reseptörlerinin aracılık yaptığı hücre dışı uyarılar aracılığı ile oluşur. Bu yolak ölüm ligandının kendi reseptörüne bağlanması ile başlatılır. Şu ana kadar, ölüm reseptör ailesinin insanda en az sekiz tanesi tanımlanmıştır. Bunlar; Fas (CD95), TNF-R1, DR-3 (Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR-6, EDA-R (ektodermal displazi reseptörü) ve NGF-R'dir. Ölüme neden olan reseptörler sitoplazma içinde ölüm alanı (DD, "dead domain") olarak adlandırılan

bir bölge taşırlar. Ölüm reseptörü olan Fas (CD95), hücre yüzey reseptörü olup tümör nekroz faktör ailesinin en iyi tanımlanmış ölüm reseptörlerindendir. Apoptotik işaretin uyarıcısı olan Fas, birçok hücre tipinde sergilenir. Fas ligandı da (FasL) TNF ailesinin bir üyesidir. FasL'nın hedef hücredeki Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Bu mekanizma, bir immün tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs infekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar (38, 46).

Ligandın hedef hücredeki reseptörüne bağlanmasını DISC (death-inducible signaling complex) formasyonunun oluşumu takip eder. (37, 38, 44). Ölüm reseptörüne kendi ligantlarının bağlanması hücre içinde adaptör proteinin de (FADD) reseptöre bağlanmasına yol açar. FADD, bu kompleks içerisinde sırasıyla pro-kaspaz-8 ve -10'nun çalışmasına olanak verir. DISC'deki bu proenzimlerin yakın ilişkisi bunların katalitik aktivitesine, muhtemelen bir allosterik mekanizma tarafından pro-kaspaz-8 veya -10 molekülleri arasındaki dimerizasyona neden olur. Pro-kaspaz 8 aktif hale geçince kaspaz-8 oluşur ve kaspaz-8 direk hedef proteinleri bölerek apoptoza yol açan kaspaz-3'ü aktive eder.(37, 44). DISC içindeki kaspazların aktivasyonu hücre içi proteinlerden FLICE-inhibitör proteini (cFLIP) tarafından inhibe edilebilir. Bu proteinler hem DISC'i çalıştırabilir hem de kaspaz-8 ve -10'nun aktivasyonunu baskılar (44).



Şekil 2. Hücre dışı uyananlarla hücrenin apoptoza girmesi.

Eksojen H_2O_2 gibi SOR'lerinin orta düzeyleri birçok farklı hücrede apoptoza neden olur. Endojen üretilen SOR'lerinin hücre içinde bulunması da apoptotik hücre ölümüne yol açmada çok önemlidir ve UV, kanser tedavi edici ilaçlar ve sitokinler gibi birçok uyarılar tarafından tetiklenir (43). Son zamanlarda apoptoza karşı koruyucu etki gösteren antioksidanlarla yapılmış pek çok çalışma vardır (8, 21, 52)

2.3. Quercetin:

Quercetin (Q) (3,5,7,3',4'-pentahidroksil flavon) flavinoid ailesinin önemli bir üyesidir. Flavinoidler meyve, sebze ve kırmızı şarap gibi besinlerde bulunur (35). Günlük besin ile 50-500 mgr kadar quercetin alınabileceği tahmin edilmektedir (23, 24). Quercetin, Fe ve Cu aracılığı ile hidroksil radikali oluşumunu önleyerek oksidatif hasara karşı koruma yapan çok güçlü bir antioksidandır. Serbest oksijen

radikallerinden $\cdot\text{OH}$ ve single oksijen $\text{O}^{\cdot-}_2$ gibi yapıları temizlediği ve ksantin oksidaz ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Deneysel olarak İ/R hasarı oluşturulmuş modellerde de quercetin dokuyu İ/R hasarından koruduğu gösterilmiştir (23, 24,25).

Quercetin, antioksidan etkisinin dışında anti-inflamatuar, anti-iskemik, anti-peroksidatif özelliklere de sahiptir (24, 25) Quercetin trombosit agregasyonu inhibe ettiği ve vasküler düz kaslar üzerine vazodilatör etki göstererek antihipertansif gibi davrandığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (23). Quercetin vazodilatasyon, döngüsel fosfodiesteraz tarafından kan pulcuğu kümeleşmesini engellediği gibi vazoaaktif özellikleri ile de bilinir. Quercetin gastrik mast hücrelerinden salınan histamini önlediği ve anti-ulserojenik ajan potesiyeli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca tümör promotörü ve karsinogenik ajan olduğu hakkında da veriler vardır. (24).

Bütün bunların yanı sıra Ishikawa ve arkadaşlarının yapmış olduğu glomerüler hücre kültürü çalışmalarında quercetin anti-apoptotik etkisinin de olduğu gösterilmiştir (22). Yine Ishikawa quercetin H_2O_2 ile oluşturulan mezenşiyal hücre apoptozisinde aktivatör protein-1 (AP-1) yolağı aracılığıyla apoptozisin önlendiğini bildirilmiştir (21).

Akciğer adenokarsinom hücre kültürü çalışmalarında quercetin, iNOS'un translasyon seviyesini baskıladığı, nitrik oksit ürünlerini ve protein miktarlarını azalttığı gösterilmiştir. iNOS'un quercetin tarafından inhibisyonu anti-imflamatuvar etkiye cevap olan bir mekanizmadır (18)

Bu bilgilerin ışığı altında, İ/R'nun dokuda pek çok hasara yol açtığı ve buna karşı koruma mekanizmalarının araştırıldığı bilinmektedir. İ/R, doku ve organ fonksiyonlarının bozulmasında en önemli nedenlerden birisidir. Özellikle böbrek dokusunda, böbrekte fonksiyon bozuklukları ve hasarlara yol açmakta böylece klinikte gözlenen böbrek hastalıkları oluşmaktadır. Bilindiği gibi iskemik dokuda eğer hücreler geri dönüşümlü hasar görmüşse veya bu hasardan etkilenmemişse sadece kan akımının düzeltilmesi bu hücrelerin geri kazanılmasına yol açar. Ancak

bu iskemik hasarın yoğunluk ve süresine bağımlı olmakla birlikte, pek çok hücrede kan akımı tekrar sağlandıktan sonra apoptozis ve nekroz ile hücreler ölmektedir. İskemi sonucu oluşan akut böbrek hasarı (ABH) da diyalize ihtiyaç duyan yoğun bakım hastalarında yüksek ölüm riski oluşturan en önemli sorunlardan birisidir. Deneysel olarak İ/R ile oluşturulmuş ABH modellerinde, SOR direk hücrede hasara yol açmakta ve bu hasarın şiddetine göre hücre ya apoptoz ya da nekroz ile ölüme gittiği gösterilmiştir. Bütün bunların yanısıra İ/R hasarında iNOS geninin de olaya karıştığı bilinmektedir.

Dokuyu bu hasarlardan koruma amaçlı pek çok deneysel çalışmada antioksidan tedavi uygulanmıştır. Bu antioksidan maddelerden flavinoid ailesinin bir üyesi olan Quercetin tedavisinin dokuyu oksidatif hasardan koruduğu bilinmekle birlikte iNOS gen ekspresyonu ve apoptozis ile ilgisi hakkında yeterli bir bilgiye ulaşılamamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1. Cerrahi Malzemeler

Bisturi

Cerrahi makas

Portegu

Hemostatik pens

Penset

Steril iğneli 5/0 ipek cerrahi dikiş malzemesi

Bulldog klemp

3.1.2 Cihazlar:

Real-time PCR Cihazı (Corbett Rotor Gene 6000)

Spektrofotometre (Wealtec Spectro Art 200) 200

Spektrofotometre Küvetleri (Wealtec Spectro Art 200) 200

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Hermle)

Thermal cyclers (Corbett Palm Cyclers)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Wealtec Dolphin-DOC)

Yatay jel elektroforez cihazı (Wealtec Mini GES Cell Complete System)

Güç kaynağı (Wealtec ELITE 300)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Vorteks (Heidolph)

Tissue-Lyser II (Qiagen VX350 Series 2 WPS 3601C12)

Pipet uçları (10'lük, 100'lük ve 1000'lük)

Deep-freeze (Jouran)
Buzdolabı (Arçelik)
Santrifüj tüpleri (Greiner Bio-One)
Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler:

Ketalar (Pfizer 50mg/ml)
Romphun (Bayer %2)
Quercetin (Sigma)
RNA later (Qiagen)
 β -mercaptoethanol (Sigma)
Buffer RLT (Qiagen)
% 70 lik Etanol (Merck)
Buffer RW1 (Qiagen)
Buffer RPE (Qiagen)
RNase Free Water (Qiagen)
10X Buffer RT 2 μ g (Qiagen)
dNTP Miks 2 μ g (Qiagen)
Oligo-dT Primer (10 μ M) 2 μ g (Qiagen)
RNase inhibitör (10ünite/ μ l) 1 μ g (Qiagen)
Omniscript Reverse Transcriptase 1 μ g (Qiagen)
Distile su
TBE (Versagene RNA 5X TBE)
Etidyum Bromür (Sigma)
Agaroz (SeaKem LE Agarose Lonsa)

3.2. Gereç ve Yöntem

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilimdalı laboratuvarında 03.07.2008 tarihli 67/2008 sayılı etik kurul kararıyla yapılmıştır. Çalışmada Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilen 5–6 aylık, ağırlıkları 250–300 gr arasında değişen her iki cinse ait *Sprague-Dawley* türü sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar standart sanayi yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Çalışmada 3 grup oluşturulmuş ve her bir gruptan 8 adet sıçan histoloji ve biyokimya araştırmaları için, diğer 6 adet sıçan da Real-Time PCR çalışmaları için olmak üzere toplam 42 adet sıçan kullanılmıştır.

Grup I. Kontrol (n=8+6)

Grup II. İ/R (n=8+6)

Grup III. İ/R + Q (n=8+6)

3.3. Deney Protokolü

Sıçanlar 50 mg/kg ketamin ile birlikte 20mg/kg romphun intraperitoneal (ip) enjeksiyon ile uygulanarak genel anestezi altında uyutulduktan sonra operasyon masasına alınarak abdominal median laparotomi uygulanmıştır.

Grup 1: Kontrol

Bu gruptaki sıçanlara abdominal median laparotomi uygulandıktan hemen sonra herhangi bir işlem uygulanmaksızın sol böbrek çıkarılmıştır.

Grup 2: İskemi/Reperfüzyon

Bu gruptaki sıçanlara iskemiden 1 saat önce i.p olarak 1 ml serum fizyolojik verilmiş ve sol böbrek arteri non-travmatik mikrovasküler klemp (bulldog klemp) ile 2 saat klempe edilerek böbrek dokusu iskemiye maruz bırakılmıştır. Bu iskemi

süresinde laparotomi kesisi 3/0 ipek ile kapatılmıştır. İskemi süresini takiben laparotomi kesisi tekrar açılıp böbrek arterindeki klemp çıkarılarak 6 saat reperfüzyona maruz bırakılmak üzere laparotomi kesisi tekrar sütüre edilerek kapatılmıştır. 6 saatlik reperfüzyon sonucunda sol böbrek çıkarılmıştır

Grup 3: Quercetin + İskemi/Reperfüzyon

Bu gruptaki sıçanlara da sol böbrek arterine klemp konularak iskemiye maruz bırakılmadan 1 saat önce quercetin 50 mg/kg olacak şekilde 1 ml serum fizyolojik ile süspansiyon oluşturularak intraperitoneal olarak verildi. Daha sonra abdominal insizyonla laparotomi yapılarak sol böbrek arteri non-travmatik mikrovasküler klemp ile 2 saat klempe edilerek böbrek dokusu iskemiye maruz bırakıldı ve laparotomi kesisi 3/0 ipek ile sütüre edilerek kapatıldı. İskemi süresini takiben laparotomi kesisi tekrar açılıp sol böbrek arterindeki klemp çıkarılarak 6 saat reperfüzyona maruz bırakılmak üzere laparotomi kesisi tekrar sütüre edilerek kapatıldı. 6 saatlik reperfüzyon sonucunda sol böbrek çıkarıldı.

3.4. Dokuların Alınması

Deney süresi sona erdiğinde sıçanlara servikal dislokasyon uygulandıktan sonra laparotomi kesisi açıldı. Sol böbrek hızlı bir şekilde çıkarıldı. Biyokimya ve histoloji için alınan sol böbrek dikey olarak ikiye bölündükten sonra yarısı biyokimyasal değerlendirmeler (MDA ve GSH) için -80°C'de derin dondurucuda diğer yarısı da histolojik çalışmalar için nötral formalin içinde muhafaza edildi.

3.5. Doku MDA ve GSH Düzeyleri Tayini

Doku örneklerinin homojenizasyonu 1/10 oranında 0.1 M fosfat tamponu (pH:7.4) ile IKA T18 Basic marka (Wilmington NC, USA) homojenizatör ile yapıldı. Homojenatlar 8000 rpm, +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar numune olarak kullanıldı. MDA ve GSH düzeyleri Agilent 1100 Series marka HPLC sisteminde Chromsystems Diagnostics (Munich, Germany) firmasına ait kolon ve kitler kullanılarak ölçüldü. Tüm doku örneklerinde sonuçlar miligram doku proteini başına verilmiştir. (53).

3.6. Histolojik Değerlendirme:

Histopatolojik değerlendirme Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı tarafından yapıldı. Dokular %10' luk nötral formaline konularak 3 gün süreyle fikse edildi. Fiksasyon sonrası örnekler rutin histolojik parafin takip metodu kullanılmak suretiyle alkol ve ksilen serilerinden geçirilmek suretiyle takip edilerek parafine gömüldü. Rutin histolojik boyama metodu olan H&E metodu ile boyama yapmak için her örnekten 5 µ kalınlığında kesitler alındı ve boyanmış örnekler ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Parafin blokları hazırlanan dokuların her birinden 5 µ kalınlığında kesitler polylysine kaplı lama alınarak apoptozis değerlendirmesi amacıyla kullanıldı. Alınan örnekler Fragel DNA Fragmentation Detection kit (Calbiochem, Darmstadt) kullanılarak TUNEL metodu ile boyandı. Örnekler rehidrate edildikten sonra Proteinase K'da 20 dakika bekletilerek doku permeabilizasyonu sağlandı. Buffer uygulanması sonrası enzim uygulanarak işaretleme yapıldı ve 90 dakika 37 °C'de inkübasyon yapıldı. Sonrasında konjugat uygulanan örnekler, kromojen olarak DAB ve en son basamakta zıt boyama için Metil green ile boyandı.

Boyanan örnekler ışık mikroskobu altında x40 objektif büyütmede incelendi. 10 farklı alandaki pozitif hücreler UTHSCSA Image Tool Image Analysis isimli bir program ile sayılmak suretiyle hesaplandı (4).

3.7. Real Time-PCR

Deney süresi sona erdiğinde her bir gruba ait sıçanlara servikal dislokasyon uygulandıktan sonra laparotomi kesisi açılarak sol böbrek hızlı bir şekilde çıkarıldı. Real-Time PCR çalışmaları için dokular RNA later içinde muhafaza edildi.

3.7.1. RNA izolasyonu

1. Böbrek dokusu eppendorf tüp içerisine alındı ve tüm dokuyu kaplayacak şekilde RNA Later stabilizasyon solüsyonu ilave edildi. Doku içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacı ile 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra -20°C'de muhafaza edildi.

2. Dokular RNA later içerisinden çıkartılarak 600 µl Buffer RLT+6 µl β-mercaptoethanol (β-ME) çözeltisi ile birlikte içerisinde 1 adet steril çelik bilye bulunan plastik tüplere konuldu ve bir homojenizasyon cihazı (Tissue Lyser) ile 2 dakika 30 Hz olacak şekilde homojenize edildi.

3. Homojenizasyon işleminden sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüp içerisine alındı ve 3 dakika 13.000 rpm devirde santrifüj edildi.

4. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı ve üzerine 600 µl %70'lik etanol eklendi. Daha sonra pipetle dikkatli bir şekilde karıştırıldı.

5. Ependorf tüpü içerisindeki süpernatanın 700 µl'si kolonlara (RNeasy mini spin colon 2 ml) yüklendi. Daha sonra 20 saniye 8.000 g de santrifüj edildi ve altdaki toplama tüpünde kalan sznt döküldü. Spernatanın geri kalanı tekrar kolonlara yüklendi ve yeniden 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpü değiştirildi kolonlara (RNeasy mini spin colon) 700 µl Buffer RW1 eklendi. Böylece kolon istenmeyen parçalardan temizlenmiş oldu. Sonra 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

7. Altteki toplama tüpü döküldü ve kolon üzerine 500 µl Buffer RPE eklenip 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

8. Aynı işlem tekrarlanarak 2 dakika 8.000 g devirde santrifüj edildi.

9. Altteki toplama tüpü döküldü ve kuruması için 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi.

10. Altteki toplama tüpü atıldı ve kolon yeni temiz ependorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 40µl RNase Free Water tam orta kısıma gelecek şekilde dikkatlice eklendi ve 1 dakika 8.000 g devirde sanrifj edildi.

11. Ependorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80° C de saklandı.

3.7.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla 995 µl distile su + 5 µl RNA olacak şekilde vortekslenerek karıştırıldı ve spektrofotometride 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

3.7.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve cDNA sentez işlemi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

<i>Karışım</i>	<i>Miktar(µl)</i>
10X Buffer RT	2
dNTP Miks	2
Oligo-dT Primer (10µM)	2
RNase inhibitör (10ünite/µl)	1
Omniscript Reverse Transcriptase	1
RNase Free Water	*
RNA	*
Toplam	20

Tablo 1. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

Thermal cycler koşulları;

65° C'de 5 dk

37° C'de 60 dk

3.7.4. RT- PCR

<i>Karışım</i>	<i>Miktar (µl)</i>
Primer Miks (iNOS veya GAPDH)	1.25
2 X Miks	12.5
H ₂ O	6.25
cDNA	5
Toplam	25

Tablo 2. RT PCR için miks içeriği.

Toplam 25 µl RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95° C'de	15 dk	
95° C'de	15 s	} 50 döngü
60° C'de	60 s	
55° C'de	1 dk	

Melt: 55° C-95° C

3.7.5. Primer Dizilerinin Hazırlanması

SYBR green tekniği, özgül gen ekspresyonu kantitasyonunda sıklıkla kullanılan bir tekniktir (20).PCR tüpünde polimerize olan çift zincirli PCR ürününe katılan ve interkale edici bir floresan boya olan SYBR Green boyasının ürün miktarı ile orantılı floresans vermesi prensibine dayanmaktadır. SYBR Green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli noktadır. Bu tekniğin

başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Benzer şekilde RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu SYBR Green tekniğinin başarısını etkileyen bir diğer durumdur. cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, amplicon uzunluklarının kısa tutulması (120-250 baz), primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi PCR reaksiyonu koşullarının olası bir DNA kontaminasyonunda DNA dizisini çoğaltmaması için optimize edilmesi gereklidir (elongasyon süresinin kısıtlı tutulması). Bu prensipler göz önüne alınarak kullanılan primerler, NCBI Gene veritabanı erişim numaraları, ve amplicon uzunlukları tablo-1'de verilmiştir.

Gen	No		Oligonükleotid Dizisi	Tm
iNOS	NM_012611	Sense	CACCACCCTCCTTGTTCAAC	56,7
		Anti-Sense	CAATCCACAACCTCGCTCCAA	56,5

Tablo 3. Çalışmada kullanılan iNOS primerlerinin dizileri, Tm dereceleri

3.7.6. RT- PCR ürünlerinin jel elektroforezi ile incelenmesi

Real-Time PCR reaksiyonu sonrası amplifikasyon ürünlerinin sadece hedef gene (iNOS) özgül olup olmadığını tespit etmek amacıyla % 1.5 agaroz jel (1×TBE içerisinde) hazırlanarak jelde yürütüldü. 10 µl PCR ürünü alınıp, üzerine 2.5 µl 6X lik yükleme tamponundan konarak karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi ve

100 voltta yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alındı.



Şekil 3. Her gruptan rastgele 2'şer örnek olmak üzere seçilmiş PCR ürünlerinin jel görüntüsü. 1. kuyucuk marker , sırasıyla 2. ve 3. kuyucuklar kontrol grubu, 4. ve 5. kuyucuklar İ/R grubu, 6. ve 7. kuyucuklar İ/R+Q tedavi grubuna aittir.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmede SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v10.0 paket programı kullanıldı.

3.8.1. Biyokimyasal verilerin Değerlendirilmesi:

Böbrek örneklerinden ölçülen doku MDA ve GSH düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. Anlamlılık eşik değeri olarak $p < 0,05$ kullanılmış ve bulgularda yer alan şekilde (*) olarak gösterilmiştir.

3.8.2. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi:

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak Mann Whitney-U testi kullanılmak suretiyle test edildi. İstatistiksel analiz için SPSS for Windows 10.0 programı kullanıldı.

3.8.3. RT-PCR Bulguların Değerlendirilmesi:

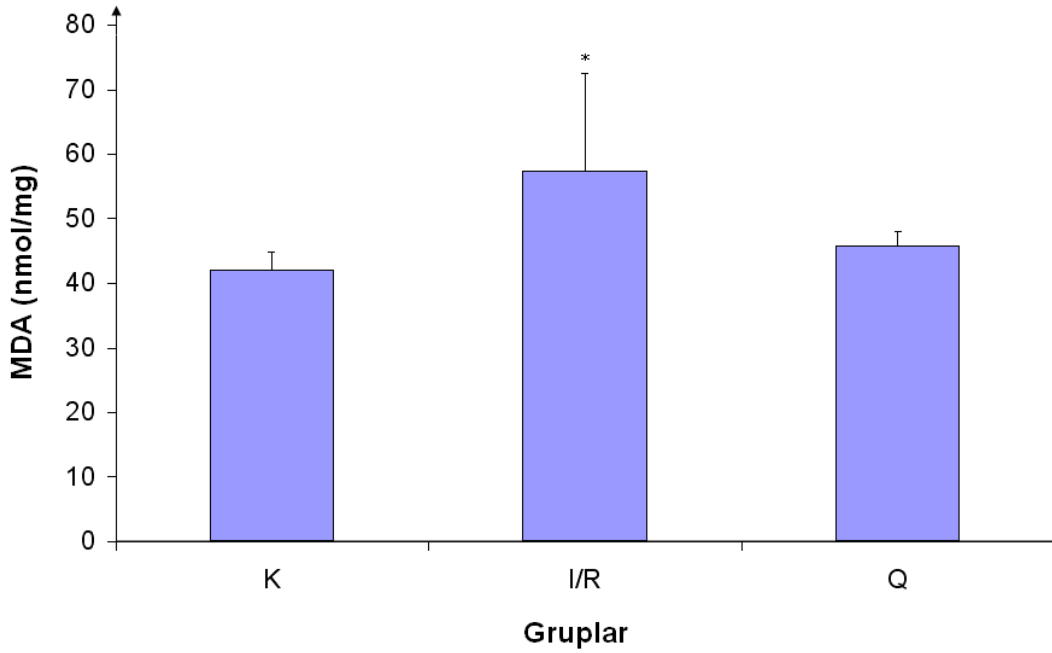
Böbrek örneklerinden ölçülen iNOS gen ifadesi düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. Anlamlılık eşik değeri olarak $p < 0,05$ kullanılmış ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

4. BULGULAR

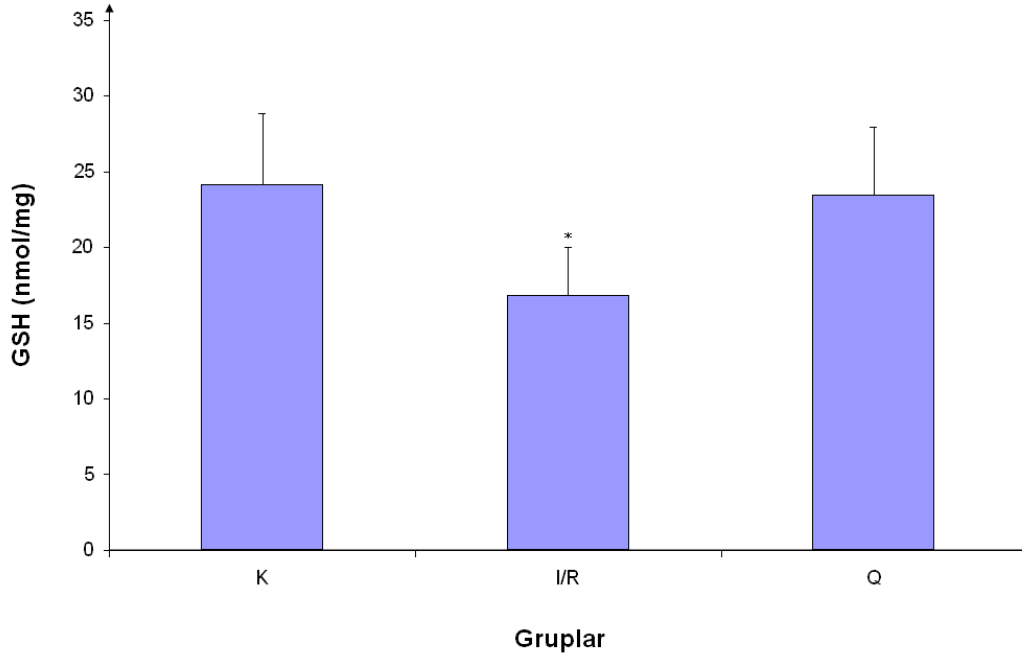
4.1. Biyokimyasal Bulgular

Böbrek dokusu MDA düzeylerine bakıldığında, İ/R grubu hem kontrol grubundan ve hem de İ/R+quercetin ile tedavi grubundan anlamlı düzeyde artış göstermişti (* $p<0.05$) (Şek.4.). Kontrol ve quercetin ile tedavi grubu arasında ise herhangi bir fark bulunamadı.

GSH düzeylerine bakıldığında ise, İ/R grubunda hem kontrol grubundan ve hem de İ/R+quercetin ile tedavi grubundan anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi (* $p<0.05$) (Şek.5.). Kontrol ve quercetin ile tedavi grubu arasında herhangi bir fark bulunamadı.



Şekil 4. Doku MDA düzeyleri. (* $p<0.05$)



Şekil 5. Doku GSH düzeyleri. (* $p < 0.05$)

4.2. Histolojik Bulgular

Yapılan ışık mikroskopik incelemede;

H&E ile yapılan genel doku değerlendirmesinde I/R grubunda, kontrol grubuna ve I/R+quercetin ile tedavi edilen gruba göre belirgin derecede ödem, vaskülarizasyon ve yer yer inflamatuvar hücrelere ait infiltrasyon alanları tespit edildi (Şek. 7.). Quercetin tedavisi uygulanan grupta ödem, vaskülarizasyon ve infiltrasyon alanları I/R grubuna göre oldukça azdı ve daha zayıf özellikteydi (Şek. 5.). Kontrol grubundaki sıçanlarda ise normal böbrek dokusuna ait bulgular elde edildi (Şek. 6.).

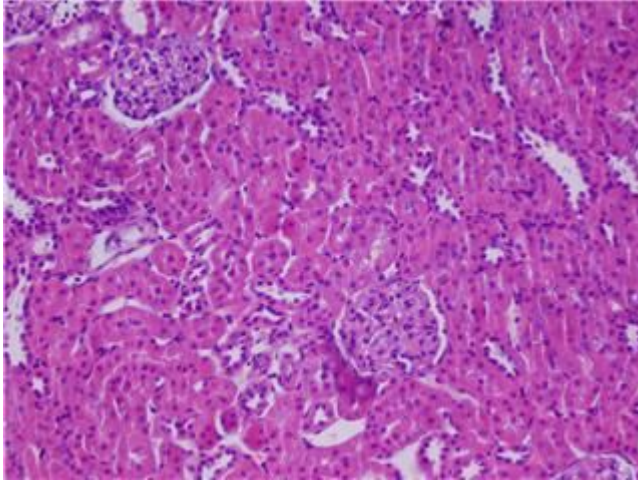
Apoptoz tespiti amacıyla yapılan boyamada;

I/R grubunda apoptotik hücre sayısı oldukça artış göstermişti (Şek. 9.). Quercetin uygulanan gruptaki apoptotik hücre sayısının I/R grubundaki apoptotik hücre sayısına göre az sayıda olduğu ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu

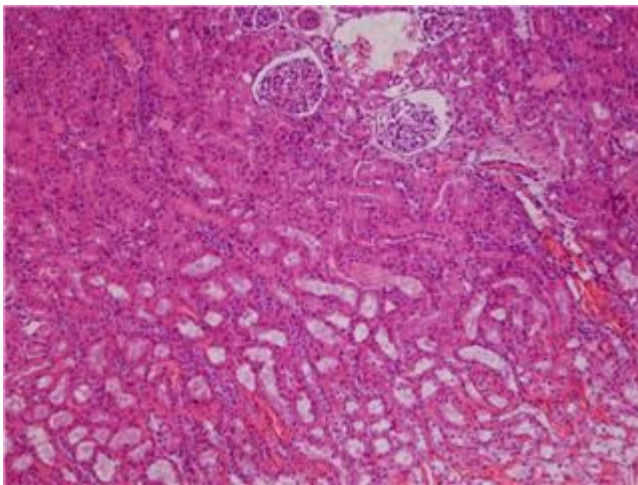
tespit edildi (Şek. 8.). ($p<0.05$). Kontrol grubundaki sıçanlarda hiçbir apoptotik hücreye rastlanmadığı için istatistiksel analiz içine alınmadı.

Histolojik Değerlendirme (Ort.)	Kontrol Grubu	I/R Grubu	I/R + Q Grubu
Ödem	0	++	+
Vaskülarizasyon	0	+++	+
İnfiltrasyon	0	++	+

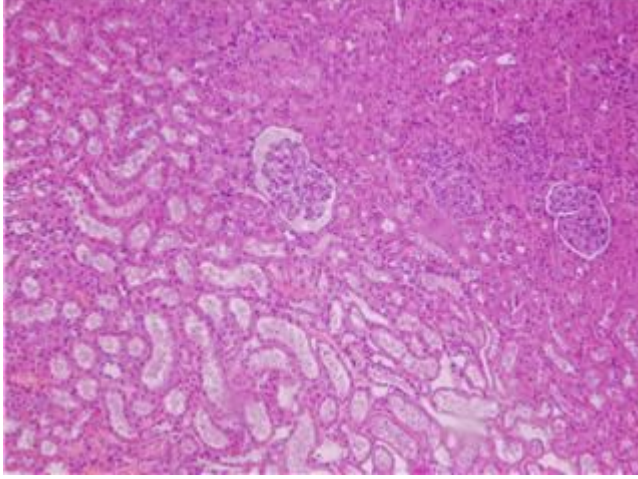
Tablo 4. H&E ile yapılan genel doku değerlendirmesi



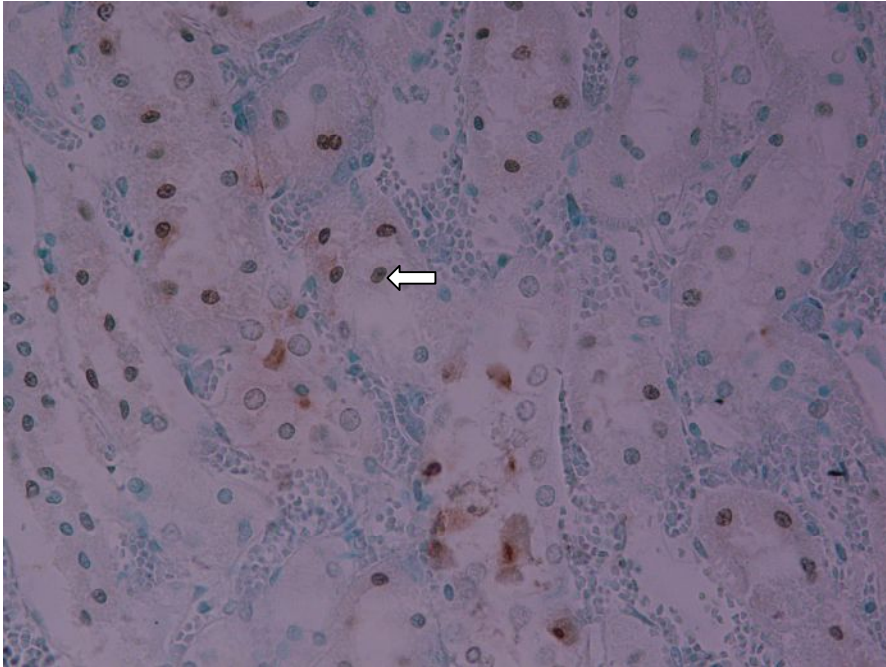
Şekil 6. Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda kortikomeduller bölgenin histolojik görünümü (HE x100)



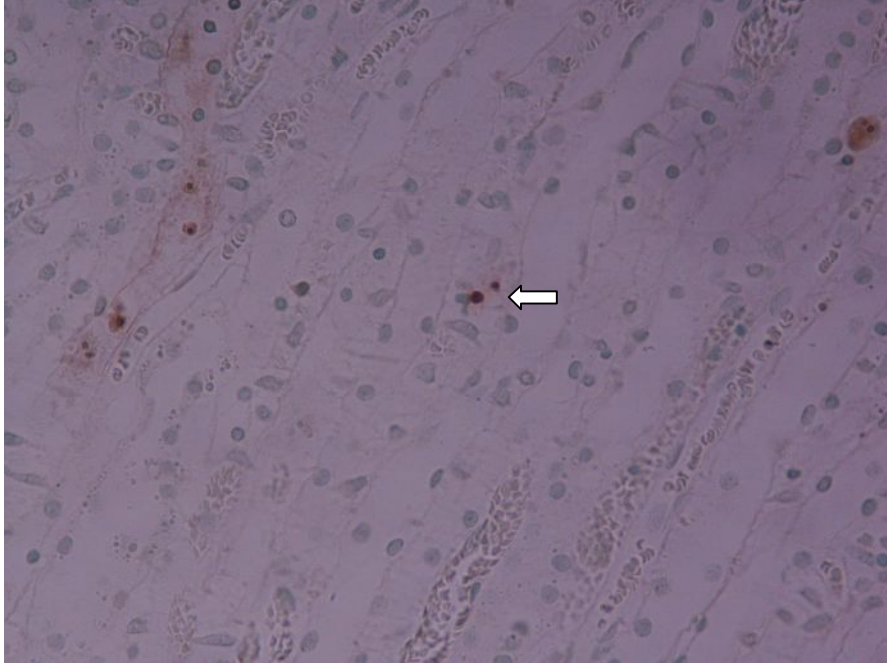
Şekil 7. I/R grubuna ait böbrek dokusunda kortikomeduller bölgenin histolojik görünümü (HE x100)



Şekil 8. I/R+Q grubuna ait böbrek dokusunda kortikomeduller bölgenin histolojik görünümü (HE x100)



Şekil 9. I/R grubuna ait böbrek dokusunda apoptotik hücrelerin görünümü (x100)



Şekil 10. I/R+Q grubuna ait böbrek dokusunda apoptotik hücrelerin görünümü (x100)

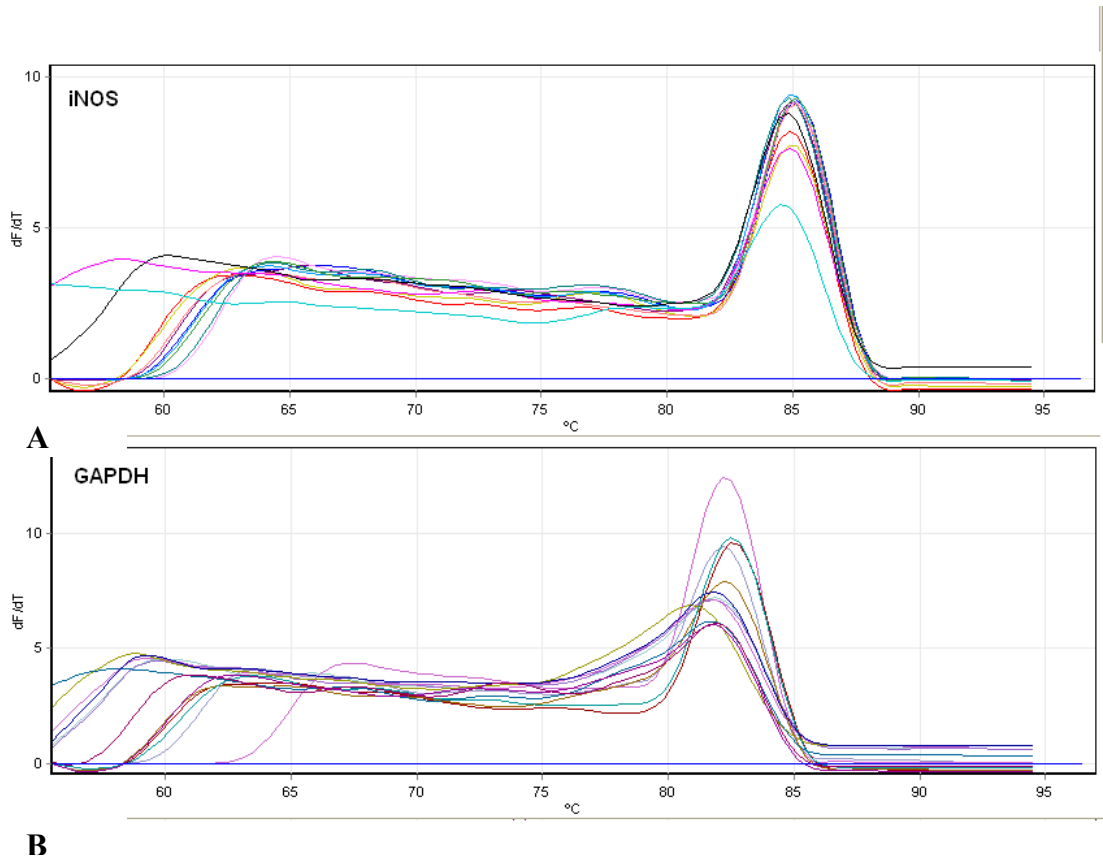
4.3. iNOS Gen ifadesi Bulguları

4.3.1. iNOS geninin kantitatif analizi:

Kontrol, İ/R uygulanan ve İ/R uygulanıp 50 mgr/kg quercetin ile tedavi edilen böbrek örneklerinde, İ/R hasarının moleküler belirleyicileri iNOS gen ifade düzeyleri RT-PCR tekniğiyle analiz edilmiş ve referans gen olarak kullanılan GAPDH ile normalize edilmiştir. Floresan boya olarak seçilen Sybr Green' in DNA dizisine özgül olmayan bir şekilde bağlandığından dolayı primer seçimi ve deneylerin optimizasyonu çok dikkatli yapılmıştır. Standart eğrilerin çizilebilmesi için kontrol böbrek örneğinden 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.

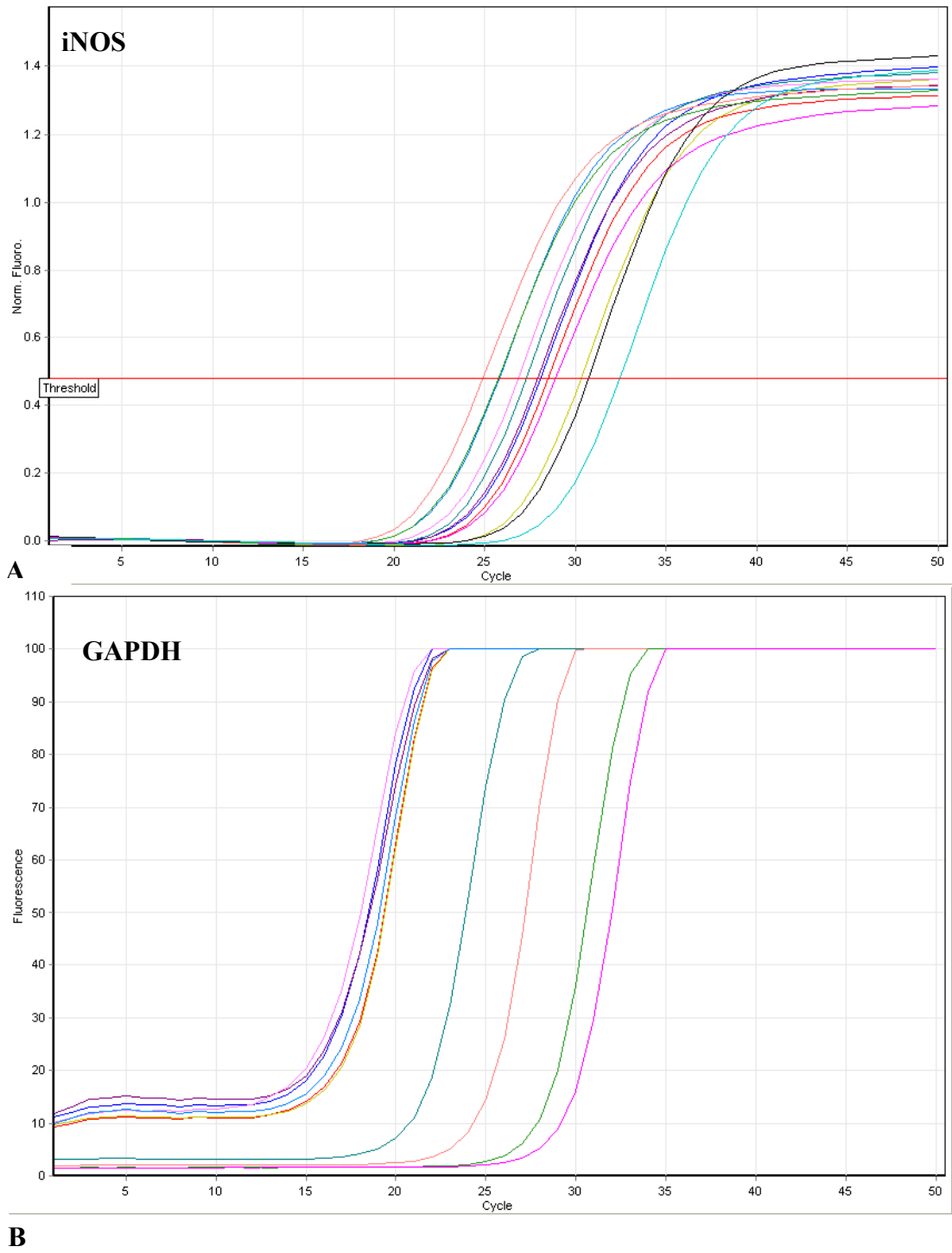
Yapılan analizlerde iNOS gen primeri ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin beklenen ürün ile uyumlu olduğu, primer-dimer oluşturmadığı ve özgül

olmayan amplifikasyon ürünü vermediğini göstermiştir (Şek. 11.). iNOS ve GAPDH geninin amplifikasyon sonuçlarına bakılacak olursa her ikisinde de artış gözlenmektedir (Şek. 12.). Hedef ve referans gene ait kantitatif değerler kullanılarak ortalama gen konsantrasyonları hesaplanmıştır (Tablo 5.). Elde edilen iNOS mRNA düzeylerinin GAPDH ile oranlanması sonucu elde edilen relatif değerler yüzde artışı ilişkisi şeklinde gösterilmiştir (Şek. 13).



Şekil 11. Real-Time PCR melt analizinin yazılım görüntüleri; **A-** iNOS geninin melt analizi, **B-** GAPDH geninin melt analizi

4.3.2. iNOS gen amplifikasyon sonuçları:



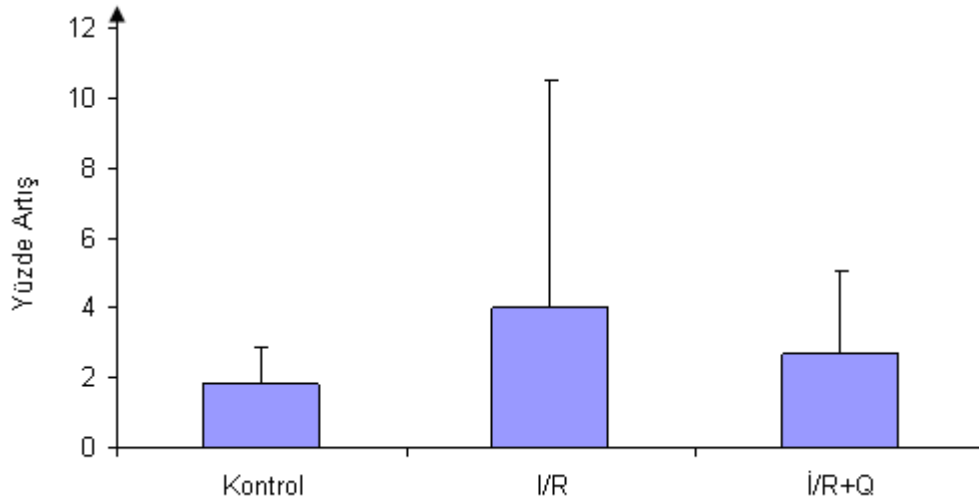
Şekil 12. Real-Time PCR’da yapılan gen amplifikasyonunun yazılım görüntüleri; **A-** iNOS geninin amplifikasyonu **B-** GAPDH geninin amplifikasyonu

Gruplar	Hedef gen konsantrasyonu	Referans gen konsantrasyonu	Relatif konsantrasyon
Kontrol	2.185.442	1.038.395	1,81
İ/R	70.374.713	36.431.244	3,99
İ/R + Quercetin	20.896.443	8.113.298	2,69

Tablo 5. Hedef ve referans gene ait kantitatif değerler kullanılarak ortalama gen konsantrasyonlarının hesaplanması

4.3.3. iNOS mRNA düzeyleri:

RT-PCR ile yapılan iNOS gen ifadesi analizlerinde, İ/R grubunda iNOS gen (hedef gen) ifadesinin arttığı gözlenmiş ancak bunun relatif konsantrasyonuna (GAPDH referans gen ile oranına) bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 13. iNOS mRNA düzeyleri yüzde artışı ilişkisi.

5. TARTIŞMA

Böbrekte İ/R, oksidatif strese neden olur ve böylece reaktif oksijen ürünleri artarken antioksidan savunma sistemi kaybolur. Sıçan böbrek dokusunda İ/R hasarı oluşturduğumuz çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında, İ/R ile oluşturulmuş böbrek hasarının quercetin tarafından önemli düzeyde azaltıldığı gözlenmiştir. Böbrek dokusu MDA değerleri incelendiğinde, İ/R hasarının böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunda önemli bir artışa neden olduğu ve quercetin tedavisi ile doku MDA düzeyinin önemli düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Gene GSH düzeyine bakıldığında, İ/R grubunda azalırken quercetin tedavisi ile artış gösterdiği gözlenmiştir.

Histoloji sonuçlarımızda ise, H&E ile yapılan genel doku değerlendirmesinde I/R grubunda, quercetin uygulanan grup ve kontrol grubuna göre belirgin derecede ödem, vaskülarizasyon ve yer yer inflamatuvar hücrelere ait infiltrasyon alanları tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra quercetin uygulanan gruptaki apoptotik hücre sayısının I/R grubundaki apoptotik hücre sayısına göre daha az sayıda olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızın RT-PCR ile yapılan iNOS gen ifadesi analizlerinde, İ/R grubunda iNOS gen (hedef gen) ifadesinin arttığı gözlenmiş ancak bunun relatif konsantrasyonuna (GAPDH referans gen ile oranına) bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

İ/R sonrası böbrek hasarının patofizyolojisi oldukça karmaşıktır ve çok sayıda mediyatör işe karışır. İ/R sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP' nin azalması, hücre içi Ca^{+2} artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipidlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri oluşarak, oksidatif strese neden olur (5). Oksidatif stresde ise serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar arasındaki

denge serbest radikaller lehine bozulur (33, 41). Serbest oksijen radikalleri de hücrede DNA hasarına ve bunu takiben hücre ölümüne yol açar (10).

Deneyisel olarak İ/R ile oluşturulmuş böbrek hasarında, serbest oksijen radikalleri direk hücrede hasara yol açmakta ve bu hasarın şiddetine göre hücre ya apoptoz ya da nekroz ile ölüme gittiği gösterilmiştir (49). Vinas ve arkadaşları böbrek İ/R hasarından sonra apoptoz (+) hücre sayısında artış olduğunu göstermiştir. Bunların yanısıra İ/R hasarında iNOS geninin de olaya karıştığı bilinmektedir. Böbreklerde, I/R hasarı oluşturulup immünohistolojik olarak çalışmalar yapılmış sonuç olarak artmış apoptotik hücelere ilaveten iNOS mRNA düzeyinin de arttığı gösterilmiştir (49). Ancak Mark ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmalarda iskemik ve iskemik olmayan böbrek dokusunda iNOS gen ifadesinin benzer olduğunu ancak bölgesel bir takım farklılıklar oluşturabildiğini belirtmişlerdir (30). Dolayısıyla İ/R ile oluşturulan böbrek hasarında apoptotik hücre sayısı artmakla birlikte iNOS gen ifadesi düzeyinde çelişkili bilgiler vardır.

Quercetin ile yapılan pek çok çalışmaya rağmen böbreği İ/R hasarına karşı nasıl koruduğu halen açık değildir. Bir olası sebep; quercetin hücre kültürü çalışmalarında apoptozu baskıladığı gözlenmiştir. Glomerüler hücreler üzerine anti-apoptotik etki göstermiştir (22). Gene quercetin, süperoksit ve hidroksil radikali gibi serbest oksijen radikallerini temizleme ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme özelliğinin olduğu bilinmektedir (25).

Ancak böbrek dokusu İ/R hasarında quercetin iNOS ile olan ilişkisi tam olarak bilinmemektedir. Karaciğer İ/R da quercetin ile tedavi sonucunda Western blot ile yapılan çalışmalarda iNOS ifadesinin baskılandığı gösterilmiştir (14). Morales ve arkadaşları kadmiyum ile oluşturulan böbrek disfonksiyonunda, Western blot analizlerinde quercetin tedavisinin artmış iNOS birikimini azalttığını bildirmişlerdir (35).

Yapılan kaynak taramalarında, böbrek İ/R hasarında quercetin tedavisinin aynı anda hem apoptozis ve hem de Real-Time PCR analizi ile iNOS gen ifadesi

üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda böbrek dokusu İ/R hasarında iNOS artışı, protein düzeyinde immnositokimyasal olarak veya Western blot analizi ile gösterilmiştir (14, 35). Real-Time PCR ile iNOS gen ifadesi sadece hipoksik retina dokusunda çalışılmış ve hipoksik grupta iNOS mRNA düzeyinin artış gösterdiği bildirilmiştir (20). Bizim alışmamızda ise ilk kez böbrek İ/R hasarında Real-Time PCR ile iNOS mRNA düzeyleri llmştr. iNOS mRNA düzeyi İ/R grubunda yükselmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Bunun birkaç olası sebebi olabilir. Chen Z ve arkadaşları olfaktor epitel dokusunda yaptıkları çalışmada apoptoz sırasında iNOS düzeyinin çok kısa bir süre yükseldiğini ancak bunu takiben hızla düşüş gösterdiğini bildirmişleridir (11). Bizim alışmamızda da apoptozis ilişkili genlerden olan iNOS düzeyi, İ/R sonucu oluşan apoptozis sırasında çok kısa bir süre yükselmiş ve sonra hızla düşmüş olabilir. Gene Aram G ve arkadaşlarının karaciğer apoptozisi ile ilgili yaptığı bir çalışmada da iNOS eksikliğinin apoptozise neden olduğu bildirilmektedir (3). Bu gibi nedenlerle bizim alışmamızda İ/R grubunda iNOS düzeyi yükselmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamış olabilir. iNOS düzey artışının İ/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasının bir diğer olası sebebi ise GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase) referans geni ile ilişkili olabilir. Real-Time PCR çalışmalarında bilindiği üzere GAPDH gibi bir referans gen kullanılmaktadır (20). Yaptığımız kaynak taramalarında RT-PCR ile iNOS mRNA düzeylerinin ölümü çalışmalarında son yıllara kadar referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda kaynak bilgilerine dayanarak referans gen olarak GAPDH kullandık. Referans gen ile yapılan çalışmalar sonunda hedef genin sonuçları referans genin sonuçları ile oranlanarak normalize edilir. Referans gen olarak kullandığımız GAPDH normal koşullarda hücre içinde glikolitik yolda rol oynar.. Tanaka ve arkadaşları beyin İ/R hasarında immnositokimyasal olarak GAPDH birikimine bakmış ve İ/R ile GAPDH oranının arttığını tespit etmişlerdir (45). Yani GAPDH iskemik hasarın gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır.

Bizim alışmamızda da Real-Time PCR ile yapılan iNOS gen ifadesi analizlerinde, İ/R grubunda iNOS gen (hedef gen) birikiminin arttığı gözlenmiş ancak bunun relatif konsantrasyonuna (GAPDH referans gen ile oranına)

bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bunun olası sebebi olarak; İ/R koşullarında dokuda GAPDH oranının zaten artmış olduğu ve referans gen olarak da GAPDH kullanıldığı için iNOS/GAPDH oranının İ/R grubunda quercetin ve kontrol grubuna göre artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık koşullarında olmadığı söylenebilir. İ/R grubunda iNOS oranı ne kadar artarsa artsın referans gen olarak GAPDH kullanıldığı için iNOS/GAPDH oranlanıp da hesaplandığı için iNOS artışı istatistiksel anlamlılık vermemiş olabilir.

Bu tez çalışmasının sonuçları, sıçan böbrek dokusunda İ/R hasarının quercetin ile tedavi sonucu oksidatif stres, apoptozis ve apoptozis ilişkili iNOS gen ifadesi gibi çeşitli yollar üzerinden etki göstererek hasarın azaltıldığını göstermiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak klinikte böbrek vasküler cerrahisi veya böbrek nakli gibi ameliyatlarda, ameliyat öncesi quercetin kullanımı ile ameliyat sırasında gelişebilen İ/R hasarından korumada etkili olabileceği sonucuna varılabilir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Akşit, H., Bildik, A., 2008, Apoptozis, Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg., 19(1):55-63.
2. Aragno, M., Cutrin, J., C., Mastrocola, R., Perrelli, M., G., Restivo, F., Poli, G., Danni, O., Boccuzzi, G., 2003, Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: Attenuation by dehydroepiandrosterone, *Kidney International*, 64:836-843.
3. Aram, G., Potter, J., J., Liu, X., Torbenson, M., S., Mezey, E., 2008, Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration, *Hepatology*. 47(6):2051-8.
4. Arıkan, Y., Tosun, M., Şaykol, V., Kalkan, S., Erdem, S., 2007, p53 expression and apoptosis in liver and spleen during CO₂ pneumoperitoneum,
5. Aydoğdu, N., Kaymak, K., Yalçın, Ö., 2005, Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri, *Fırat Tıp Dergisi* 10(4); 151-155.
6. Burlacu, A., 2003, Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, *J. Cell. Mol. Med.*, 7(3):249-257.
7. Cauwels, A., 2007, Nitric oxide in shock, *Kidney International*, 72:557-565.
8. Chao, C., L., Hou, Y., C., Chao, P., D., L., Weng, C., S., Ho, F., M., 2008, The antioxidant effects of quercetin metabolites on the prevention of high glucose-induced apoptosis of human umb. Kaynaklar dizini devam ediyor. *Nutr.*, 14:1-6.

Kaynaklar dizini devam ediyor.

9. Chatterjee, P.,K., Brown P.,A.,J., Cuzzocrea, S., Zacharowski, K., Stewart, K.,N., Mota-Filipe, H., McDonald, C.,M., Thiernemann, C., 2001, Calpain inhibitor-1 reduces renal ischemia-reperfusion injury in the rat, *Kidney International* 59:2073-2083.
10. Chatterjee, P.,K., Patel, N.,S.,A., Kvale, E.,O., Cuzzocrea, S., Brown P.,A.,J., Stewart, K.,N., Mota-Filipe, H., Thiernemann, C., 2002, Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury, *Kidney International*, 61:862-871.
11. Chen, Z., Ni, D., Gao, Y., Lin, J., 2007, Apoptosis related genes –Bcl-2, bax and iNOS expressed in the olfactory epithelium of mice in mice infected with influenza virus, *21(11):510-2*.
12. Cuzzocrea, S., Salvemini, D., 2007, Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes, *Kidney International*, 71:290-297.
13. Çakan, M., Çakan, T., Aydos, T., Yilmazer, D., Ögüş, E., Kılıç, A.,S., 2007, Sıçan testisindeki iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerine ketoprofenin koruyucu etkisi, *Türk Üroloji Dergisi*, 33:50-55.
14. Dias, A.,S., Porawski, M., Alonso, M., Marroni, N., Collado, P.,S., Gonzalez-Gallego, J., 2005, Quercetin decreases oxidative stress, NF-κB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Nutr.* 135:2299-2304.
15. Erden, M.,T., 1992, Serbest Radikaller, *Klin Tıp Bilimleri*, 12.
16. Erkasap, N., Uzuner, K., Serteser, M., Köken, T., Aydın, Y., 2003, Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by

ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats, *Peptides*, 24:1181-1187.

17. Fridovich, I., 2004, Mitochondria: are they the seat of senescence?, *Aging Cell*, 3(1):13-6.
18. Garcia-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P.,S., Esteller, A., Sanchez-Campos, S., Tunon, M.,J., Gonzalez-Gallego, J., 2007, The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells, *European Journal of Pharmacology*, 557:221-229.
19. Gulbins, E., Dreschers, S., Bock, J., 2003, Role of mitochondria in apoptosis, *Experimental Physiology*, 88:85-90.
20. He, T., Xing, Y., Q., Zhao, X., H., Ai, M., 2007, Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice, *Arch. Med. Res.*, 39(2):261-3.
21. Ishikawa, Y., Kitamura, M., 2000, Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways, *Kidney International*, 58:1078-1087.
22. Ishikawa, Y., Kitamura, M., 2000, Bioflavonoid quercetin inhibits mitosis and apoptosis of glomerular cells in vitro and in vivo, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279:629-634.
23. İközler, M., Erkasap, N., Dernek, S., Kural, T., Kaygısız, Z., 2007, Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment, *Anadolu Kardiyol. Derg.* 7:404-10.

Kaynaklar dizini devam ediyor.

24. Kahraman, A., Erkasap, N., Köken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap S., 2003, The antioksidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions, *Toxicology*, 183:133-142.
25. Kahraman, A., Erkasap, N., Serteser, M., Köken, T., 2003, Protective effect of quercetin on renal ischemia-reperfusion injury in rats, *J. Nephrol*, 16:219-224.
26. Kher, A., Meldrum, K.,K., Wang, M., Tsai, B.,M., Pitcher, J.,M., Meldrum, D.,R., 2005, Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia-reperfusion injury, *Cardiovascular Research*, 67:594-603.
27. Koçtürk, S., Kayatekin, B.,M., Resmi, H., Açıköz, O., Kaynak, C., Özer, E., 2008, The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats, *Eur. J. Appl. Physiol.* 102:515-524.
28. Köken, T., İnal, M., 1999, The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver, *Clinica Chimica Acta*, 288:55-62.
29. Kültürsay, H., Kayıkçioğlu, M., 2002, Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar, *Anadolu Kardiyoloji Derg.*, 4:323-9.
30. Mark, L.,A., Robinson, A.,V., Schulak, J.,A., 2005, Inhibition of Nitric Oxide Synthase reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury, *Journal of Surgical Research*, 129:236-241.
31. Matsuyama, M., Nakatani, T., Hase, T., Kawahito, Y., Sano, H., Kawamura, M., Yoshimura, R., 2004, The expression of cyclooxygenases and lipoxygenases in renal ischemia-reperfusion injury, *Transplantation Proceedings*, 36:1939-1942.

Kaynaklar dizini devam ediyor.

32. Matsuyama, M., Yoshimura, R., Hase, T., Kawahito, Y., Sano, H., Nakatani, T., 2005, Study of cyclooxygenase-2 in renal ischemia-reperfusion injury, *Transplantation Proceedings*, 37:370-372.
33. Memişoğulları, R., 2005, Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 3:30-39
34. Mercan, U., 2004, Toksikolojide serbest radikallerin önemi, *Y.Y.U. Vet. Fak. Derg.*, 15(1-2):91-96.
35. Morales, A.,I., Vicente-Sanchez, C., Jerkic, M., Santiago, J.,M., Sanchez-Gonzales, P.,D., Perez-Barriocanal, F., Lopez-Nova, J.,M., 2006, Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 210:128-135.
36. Morales, A.,I., Vicente-Sanchez, C., Sandoval, J.M.S., Egido, J., Mayoral, P., Arevalo, M.,A., Fernandez-Tagarro, M., Lopez-Nova, J.,M., Perez-Barriocanal, F., 2006, Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties, *Food and Chemical Toxicology*, 44:2092-2100.
37. Orrenius, S., 2007, Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death, *Drug Metabolism Reviews*, 39:443-455.
38. Philchenkov, A., 2004, Caspases: potential targets for regulating cell death, *J. Cell. Mol. Med.*, 8(4):432-444.
39. Ramazan, M., 2005, Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39.

Kaynaklar dizini devam ediyor.

40. Rhoden, E.,L., Rhoden, C.R., Lucas, M.L., Pereira-Lima, L., Zettler, C., Bello-Klein, A., 2002, The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats, *Transplant Immunology*, 10:277-284.
41. Sasaki, M., Takashi, J., 2006 Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40:1-12
42. Sert, C., Çelik, M.,S., 1995, Radyasyondan Koruyucu Ajanlar, *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 16:292-298.
43. Shen, H.,M., Liu, Z.,G., 2006, JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species, *Free Radical Biology & Medicine* 40:928–939.
44. Sprick, M.,R., Walczak, H., 2004, The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*1644:125-132.
45. Tanaka, R., Mochizuki, H., Suzuki, A., Katsube, N., Ishitani, R., Mizuno, Y., Urabe, T., 2002, Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 22:280-288
46. Tomatır, A.,G., 2003, Apoptoz: Programlı hücre ölümü, *T. Klin. Tıp Bilimleri* 23:499-508.
47. Twomey, C., McCarthy, J., V., 2005, Pathways of apoptozis and importance in development, *J. Cell. Mol. Med.* 9(2):345-359.
48. Valko, M., Rhodes, C.,J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160:1-40.

Kaynaklar dizini devam ediyor.

49. Vinas, L.,J., Sola, A., Genesca, M., Alfaro, V., Pi, F., Hotter, G., 2006, NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia-reperfusion, *Free Radical Biology & Medicine*40:992-1003.
50. Walker, L.,M., Walker, P.,D., Imam, S.,Z.,Ali, S.,F., Mayeux, P.,R., 2000, Evidence for Peroxynitrite Formation in Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Studies with the Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor $L-N^6-(1\text{-Iminoethyl})\text{lysine}^1$, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 295:417-422.
51. Wang, L.,M., Tian, X.,F., Song, Q.,Y., Gao, Z.,M., Luo, F.,W., Yang, C.,M., 2003, Expression and role of inducible nitric oxide synthase in ischemia-reperfusion liver in rats, *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2:252-258.
52. Wang, Y., Pei, D.,S., Ji, H.,X., Xing, S.,H., 2008, Protective effect of a standardized Ginkgo extract (ginaton) on renal ischemia/reperfusion injury via suppressing the activation of JNK signal pathway, *Phytomedicine*, 15(11):923-931.
53. Watanabe, M.,D., Yamaguchi, K., Chijiiwa, K., Tanaka, M., 2001, FR167653 Improves Survival and Pulmonary Injury after Partial Hepatectomy under Ischemia/reperfusion in rats, *Journal of surgical research*, 101:146-151.

Mustafa Kenan KINACI

Doğum Tarihi : 04.02.1981
Doğum Yeri : Malatya
Uyruğu : T.C.

Eğitim Durumu :

2006 – **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (Eskişehir)**
Sağlık Bil. Enst. Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans
2000 – 2005 **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (Eskişehir)**
Biyoloji Bölümü
1994 – 1998 **Hacı Ahmet Akıncı Lisesi**
Lise
1991 – 1994 **Erkenek Lisesi**
Orta Okul
1986 – 1991 **30 Ağustos İlkokulu**
İlk Okul

Yabancı Diller :

İngilizce
(İyi Seviyede)

Bilgisayar Bilgisi : * Microsoft İşletim Sistemleri
* Linux – Unix İşletim Sistemleri
* Microsoft Office

İlgilenilen Alanlar: Spor, Sinema, Müzik