

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU

**DENEYSEL MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK  
YETMEZLİĞİNDE ROSİGLİTAZONUN ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Gülçin GÖK**

EDİRNE-2009

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU

**DENEYSEL MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK  
YETMEZLİĞİNDE ROSİGLİTAZONUN ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Gülçin GÖK**

**Destekleyen Kurum: TÜBAP-919**

**Tez No:**

EDİRNE-2009

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimin sırasında, bilimsel katkıları ve yardımlarıyla beni daima destekleyen tez danışman hocam sayın Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU'ya, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kadir KAYMAK'a, bilimsel katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA ile Yrd. Doç. Dr. Necdet SÜT'e, manevi desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Hanifegül TAŐKIRAN'a, Deney Hayvanları Araştırma Birimi çalışanlarına, TÜBAP'a ve tüm hocalarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ.....	3
MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ.....	4
ROSİGLİTAZON .....	17
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	19
BULGULAR.....	30
TARTIŞMA.....	46
SONUÇLAR.....	52
ÖZET.....	53
SUMMARY.....	55
KAYNAKLAR.....	57
RESİMLEMELER LİSTESİ.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64
EKLER.....	65

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>Angiotensin II</b>	: Anjiotensin II
<b>AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ</b>	: Akut Böbrek Yetmezliği
<b>AKUT TÜBÜLER NEKROZ</b>	: Akut Tübüler Nekroz
<b>ADENOSİN TRİFOSFAT</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>TETRAHİDROBİOPTERİN</b>	: Tetrahidrobiopterin
<b>KATALAZ</b>	: Katalaz
<b>SİKLIK GUANOZİN MONOFOSFAT</b>	: Siklik Guanozin Monofosfat
<b>YAPISAL NOS</b>	: Yapısal NOS
<b>TROMBOKSAN A<sub>2</sub></b>	: Tromboksan A <sub>2</sub>
<b>ENDOTELİUM-DERIVED RELAXING FACTOR</b>	: <i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
<b>ETİLEN DİAMİN TETRAASETİK ASİT</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>ENDOTELİAL NİTRİK OKSİT SİNTAZ</b>	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
<b>ENDOTELİN-1</b>	: Endotelin-1
<b>FLAVİN ADENİN DİNÜKLEOTİD</b>	: Flavin Adenin Dinükleotid
<b>FLAVİN MONONÜKLEOTİD</b>	: Flavin Mononükleotid
<b>GLUTATYON PEROKSİDAZ</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>OKSİDE GLUTATYON</b>	: Okside Glutasyon
<b>REDÜKTE GLUTATYON</b>	: Redükte Glutasyon
<b>GLUTATYON S TRANSFERAZ</b>	: Glutasyon S Transferaz
<b>GLUTATYON REDUKTAZ</b>	: Glutasyon Reduktaz
<b>GUANOZİN TRİFOSFAT</b>	: Guanozin Trifosfat
<b>OKSİHEMOGLOBİN</b>	: Oksihemoglobi

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
<b>mABY</b>	: Miyoglobüinürik Akut Böbrek Yetmezliği
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>NADP</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Okside)
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Redükte)
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik Oksit Sentaz
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit Radikali
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet Oksijen
<b><sup>·</sup>OH</b>	: Hidroksil Radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit Anyonu
<b>PPAR</b>	: Peroksizom Proliferator Aktive Reseptör
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	: Peroksizom Proliferator Aktive Reseptör Gama
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>TZD</b>	: Tiyazolidindion

## GİRİŞ VE AMAÇ

Akut böbrek yetmezliği (ABY), renal fonksiyonlarda ani azalma ile karakterize, yaygın bir klinik sendromdur. ABY'nin başlıca göstergeleri glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma ve vücutta üretilen toksik metaboliklerin atılımında bozukluk oluşmasıdır (1).

Ezilme sendromu, travmanın yarattığı rabdomiyoliz (çizgili kasın erimesi) ve buna bağlı gelişen cerrahi/medikal belirti ve bulguları içeren komplike bir tablodur. Rabdomiyoliz, travmatik ve nontravmatik nedenlere bağlı olarak çizgili kas hücrelerinin hasara uğraması, ardından hücre içi elemanların dolaşıma geçerek klinik ve laboratuvar bulgularına yol açmasıdır. ABY, rabdomiyolizin neden olduğu önemli bir komplikasyondur (2). Miyoglobürik akut böbrek yetmezliği (mABY) ise travmatik ya da travma dışı nedenlerle iskelet kaslarının hasarı ve kas hücre içeriğinin dolaşıma geçmesi sonucu gelişen üremik bir sendromdur (3).

Deneysel mABY oluşturmak için yapılan çalışmalarda sıçanlara hipertonic gliserolün intramüsküler (im) olarak enjeksiyonunun miyoliz ve hemoliz oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir. Miyoliz ve hemoliz sonucu açığa çıkan demir içeren proteinler (miyoglobin ve hemoglobin) serbest radikal oluşumuna, nitrik oksit depolarının tükenmesi ve vazokonstriksiyon oluşumuna neden olmaktadır (4).

Peroxisom proliferator aktive reseptörler (PPAR), steroid, tiroid, retinoid hormon reseptörlerini içeren nükleer hormon reseptör üst familyasından olup  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  olmak üzere 3 izoformu vardır. PPAR $\gamma$  farklı birçok doku ile beraber böbrekte medullar toplayıcı kanallarda, glomerül ve böbrek pelvisi endotel hücrelerinde bulunmaktadır. PPAR $\gamma$  doğal ve

sentetik ligantlara sahiptir. Sentetik ligantları tiyazolidindionlardır (TZD) ve tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bu grubun üyeleri troglitazon, ciglitazon, pioglitazon ve rosiglitazon (5). Rosiglitazon bu gruptaki en güçlü ve seçici ajandır. Reseptörlere bağlanma konusunda diğerlerinden daha yüksek afiniteye sahiptir (6). PPAR $\gamma$  aktivasyonunun kan basıncında azalmaya, postglomerüler efferent arteriyolde vazodilatasyona ve nitrik oksit (NO) üretiminin artmasına neden olduğu belirtilmiştir (7).

Miyoglobinürik ABY'nin oluşum mekanizmasında serbest radikal oluşumunun ve NO düzeyindeki azalmanın önemli rol oynadığı görülmektedir. Çalışmamızda, rosiglitazonun NO düzeyleri, oksidatif stres üzerindeki etkileri, böbrek fonksiyonları ve böbrek dokusundaki histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.



## GENEL BİLGİLER

### AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Akut böbrek yetmezliği, renal fonksiyonların saatler ve birkaç gün içinde bozulması sonucu üre ve kreatinin gibi nitrojen atık ürünlerinin birikmesi olarak tanımlanır (8). Böbrekte oluşan fonksiyon bozuklukları, metabolik değişikliklere (metabolik asidoz ve hiperkalemi) neden olarak vücut sıvı dengesini ve farklı organ sistemlerini etkilemektedir (9). Akut böbrek yetmezliği, oluşum nedenlerine göre üç grupta incelenir:

1) Prerenal ABY: GFR'da azalmaya bağlı meydana gelir. Serum kreatinin, kan üre konsantrasyonu yeniden düzelebilecek şekilde artmakta ve renal perfüzyon azalmaktadır (9).

2) İntrinsik ABY: İskemik ve nefrotoksik yaranlamalar sonucunda böbrek zarar görür, histopatolojik ve patofizyolojik değişiklikler oluşur. Böbreğin glomerül, tübül, damar, interstisyum gibi bölümlerinin etkilemesiyle yapısal değişiklikler meydana gelir (9). Tedavi edilmeyen prerenal yetmezliği takiben tübüler hasar ve nekroz meydana gelir; bu da intrinsik ABY oluşumuna neden olur. (10,11) İntrinsik ABY'nin en büyük nedeninin akut tübüler nekroz (ATN) olmasından dolayı sıklıkla ATN ile aynı anlamda kullanılmaktadır (8,9).

3) Postrenal ABY: Üriner toplama sisteminde, tübül dışı ya da içi nedenlerle obstrüksiyon oluşumu sonucu meydana gelir (9).

## MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Miyoglobinürük akut böbrek yetmezliği, travmatik ya da travma dışı nedenlerle iskelet kaslarının hasarı ve kas hücre içeriğinin dolaşıma geçmesi sonucu gelişen üremik bir sendromdur (3).

Crush sendromu depremlerden sonra oluşan en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Crush kelimesinin Türkçe karşılığı ezilme ya da sıkışmadır. Bizim çalışmamızda Türkçe karşılığı olan ezilme sendromu terimi kullanılacaktır. Ezilme sendromu, travmanın yarattığı rabdomiyoliz (çizgili kasın erimesi) ve buna bağlı gelişen cerrahi/medikal belirti ve bulguları içeren komplike bir tablodur. Söz konusu bulguları ABY; kompartman sendromu; gergin, ödemli, ağrılı kaslar; hipovolemik şok; hiperpotasemi; asidoz; kalp yetersizliği; solunum yetmezliği ve enfeksiyondur (2, 12).

Rabdomiyoliz, iskelet kası yapısının bozulması sonucu içeriğinde bulunan miyoglobin, hücre içi protein ve elektrolitlerin dolaşıma katılması sonucu oluşan sendromdur. Bu sendrom hastalıklara, yaralanmalara, ilaç tedavisi ve toksinlere bağlı meydana gelir. Rabdomiyoliz oluşumu ABY, kompartman sendromu, elektrolit anormalisine bağlı kardiyak disritmi, intravasküler koagülopati gibi bir takım komplikasyonlara neden olmaktadır (13).

Rabdomiyoliz eski çağlardan beri bilinmektedir. İlk olarak İsraililerin Mısır'dan göçü sırasında, öldürücü bir hastalık olarak bahsedilmiştir. Göçün Akdeniz bölümünde bildircin tüketiminden sonra miyoliz olduğu ancak tüketilen hemlock şifalı bitkisinin intoksisiteyi sağladığı belirtilmiştir. Modern çağlarda ise ilk 1908 yılında Messina'da Sicilya Depreminde ve I. Dünya savaşı sırasında Alman askeri tıp literatüründe, ezilme sendromundan ve ABY'den söz edilmiştir. Savaş sırasında askerlerin siperlerde gömülmeleri sonucunda rabdomiyoliz vakaları olduğu tespit edilmiştir. Modern İngiliz tıp literatüründe ise Bywater ve Beall tarafından 1940 yılında, Londra'nın bombalanması sırasındaki yaralanan 4 kişide ezilme sendromuna bağlı ABY gelişmesinden bahsedilmiştir. Daha sonraları yapılan deneysel çalışmalarda miyoglobinin rolü ile ilgili detaylar bildirilmiştir. 1970 yılında ise nontravmatik rabdomiyolizin de potansiyel bir ABY nedeni olduğu belirtilmiştir (14).

Rabdomiyolizin ardından mutlaka ezilme sendromu ve ABY gelişmesi söz konusu değildir. Rabdomiyoliz ardından ABY gelişme riski %4-100 arasında olup, ortalama %30-50'dir (2).

Hipertonik gliserolün sıçanlara im enjeksiyonu ile deneysel model mABY oluşturulmaktadır (15). Gliserol enjeksiyonu miyoliz ve hemoliz oluşumuna; hipovolemiye

neden olmaktadır. Miyoliz ve hemoliz ardından hemoglobin ve miyoglobinin parçalanması ile açığa çıkan demir, serbest radikal oluşumuna, lipid peroksidasyonuna ve NO depolarında azalmaya sebep olur. Bu durum renal fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (4,16,17).

### **Miyoglobinürik Akut Böbrek Yetmezliği Oluşum Mekanizması**

Rabdomiyoliz sonrasında ABY gelişmesinde 3 temel mekanizma rol oynamaktadır:

- Tübüler obstriksiyon
- Tübüler nekroz ve oksidatif stres
- Böbrekte vazokonstriksiyon oluşumu

Tübüler obstriksiyon: Miyoglobin ve hemoglobin kısaca hem proteini olarak adlandırılırlar. Miyoglobin iskelet kasının kuru ağırlığının %1-3'ünü oluşturmaktadır ve 17.800 dalton (D) ağırlığındadır. Myoglobinin moleküler yapısında bulunan porforin halkanın merkezinde demir atomu bulunmaktadır. Bu demir-porforin birleşimi oksijenin bağlandığı, oksijenin taşınmasını ve depolanmasını sağlayan bölümdür. Normal serum miyoglobin düzeyi 0-0.003 mg/dl arasındadır. Miyoglobinin yaklaşık %50-85'i plazma globülinlerine (haptoglobin ve  $\alpha_2$ -globülin) bağlı taşınır ve çok az bir kısmı idrarla atılır. Ancak rabdomiyoliz gelişimi ardından aşırı miktarda miyoglobin dolaşıma katılır ve plazmadaki serbest miyoglobin düzeyi artar (2,18,19). Küçük bir molekül olan ve glomerülden serbestçe filtre edilebilen miyoglobinin idrara geçme miktarı artar ve miyoglobinüri oluşur. Miyoglobinüri meydana gelmesi için eşik değer 1.5 mg/dl'dir (2,19). Aşırı miktarda serbest miyoglobinin glomerülden filtre edilmesiyle miyoglobinin tübüler konsantrasyonu artmaktadır. Miktarı artmış olan miyoglobin, Tamm-Horsfall proteinleri ile birleşerek distal tübülde çöküntü oluşumunu meydana getirir. Asidik olan tübüler sıvı bu birleşmenin oluşumu için uygun ortamı sağlar. Oluşan çöküntü hareketsizdir, tübüler tıkanmaya ve tübül içi basıncın artmasına neden olur. Ayrıca nekrotik epitel hücreleri de tübül lümeni içine düşerek tıkanmaya katkıda bulunur (16,20-22).

Tübüler nekroz ve oksidatif stres: Miyoglobin tübülerden serbestçe filtre edildikten sonra proksimal tübülenden endositoz yoluyla reabsorbe edilir. Myoglobinin moleküler yapısında bulunan porforin halka hücre içinde metabolize edilir ve serbest demir açığa çıkar. Bu demir ferritin şeklinde depo edilir. Ancak rabdomiyoliz ardından yüksek miktarda demir açığa çıktığı için serbest demirin tamamı ferritine dönüştürülemez ve tübül hücrelerindeki serbest demir miktarı kritik düzeylere yükselir ve nefrotoksisiteye bağlı ATN oluşmasına

neden olur. Oluşan nefrotoksisite tüm böbreği özellikle de proksimal tübülü etkiler (21,23,24). Demir bir geçiş metali olmasından dolayı elektron vermeye ve kabul etmeye hazır durumdadır; katalitik reaksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenlerle demirin serbest radikal üretme kapasitesi yüksektir. Oksijen metabolitleri mABY'de kritik rol oynarlar. Yüksek düzeyde toksik olan süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) bu metabolitlerdendir. Bu metabolitler demir katalizörlüğünde reaksiyona girerler ve daha yüksek düzeyde toksik metabolit olan; lipid peroksidasyonunun oluşmasında anahtar rolü oynayan hidroksil radikalının ( $\cdot OH$ ) meydana gelmesine neden olurlar. Tübül endoteli içinde oluşan bu reaksiyon Haber Weiss Reaksiyonu olarak bilinmektedir. Miyohemoglobinüri ardından miktarı kritik düzelerle çıkan demir ile katalize edilen bu reaksiyon, böbrekte oksidatif yaralanmalara ve hücre ölümlerinin oluşmasına neden olur (20,21).

Renal vazokonstriksiyon: NO renal mikrosirkülasyonda vazodilatatör etki yaratır. Rabdomiyoliz sonucu açığa çıkan demir proteinleri güçlü NO çöpçüleridir. NO'in süperoksit ile reaksiyonu sonucu güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot-}$ ) oluşarak böbrekteki NO depolarını azaltmaktadır. Ayrıca hemoliz sırasında eritrositin zar bütünlüğü bozulması ve serbest hemoglobinlerin açığa çıkması sonucu NO'in hemoglobinle olan reaksiyonu da artar ve NO düzeyinin azalmasına neden olur. Bu durum NO depolarının tükenmesi ve vazokonstriksiyon ile sonuçlanır. Ancak rabdomiyolizin ardından oluşan hipovolemi böbrek perfüzyonunun daha belirgin şekilde bozulmasına neden olmaktadır (2,23,25,26). Rabdomiyoliz sırasında kompartman içine sıvı birikimi meydana gelir. Vücut sıvıları ekstraselüler kompartmandan hasar görmüş kasa doğru hareket ederek bu kaslarda aşırı miktarda sıvı birikmesine neden olur. Hatta biriken miktar hücre dışı sıvı miktarına eşit olabilir. Ayrıca enkaz altında uzun süre kalınması sonucu ciddi sıvı kayıpları ve oluşmuş yaralanmalara bağlı kanamalar meydana gelmektedir. Bu durum hipovolemiyi daha belirgin hale getirmektedir. ABY sürecinde oluşan hiperpotasemi ve hipokalsemi ise kardiyodepresif etki oluşturarak kalp atım hacminde azalma oluşmasına neden olarak hipoperfüzyone zemin hazırlar (2,21). Hipovolemi oluşumu sonucu sempatik sinir sistemi ve renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi aktive olarak vazokonstriksiyona neden olan anjiyotensin-II (AII), endotelin (ET-1), tromboksan  $A_2$  ( $TXA_2$ ) ve arjinin vazopressin hormonları uyarılmaktadır. Bu durum renal vazokonstriksiyona ve mezengiyal kontraksiyona yol açarak filtrasyonu bozmaktadır (2,27).

Böbrek perfüzyon bozukluğu erken dönemde düzeltilmezse iskemik ATN meydana gelir. Tübüler nekrozun ortaya çıkmasındaki ana olay renal adenosin trifosfat (ATP) azalımı

oluşmasıdır. ATP azalımı hasara uğramış kaslardan ATP preküsörlerinin sızmasına neden olur. ATP azalımı ise iyon pompalarının fonksiyonlarını bozar ve sitosolde kalsiyum miktarında artışa neden olur. Sitosolde artan kalsiyum ise mitokondriye penetre olarak mitokondride hasar oluşumuna ve fonksiyon bozukluklarına neden olur; böylece ATP üretimi engellenir. Bu durum tübüler nekroz oluşumuna katkıda bulunur (2,23).

### **Nitrik Oksit**

Nitrik oksit, endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak tanımlanmaktadır. Endotelial hücrelerde, periferik sinir sisteminde nonadrenerjik ve nonkolinerjik sinir uçlarında, iskelet kasında, adrenal kortekste, adrenal medullada ve diğer pek çok hücrede sentezlendiği bildirilmiştir. NO, difüzyon yoluyla hücre membranından kolayca geçebilen bir gaz molekülüdür. Tek nitrojen, tek oksijen ve ekstra bir elektrondan meydana gelmektedir. Bu nedenle kimyasal olarak yüksek derecede reaktiftir. Bu madde dokularda ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvılarda çabuk yıkılır ve yarılanma ömrü 3-50 sn arasındadır. Nörotransmitter, otokoid, hücre içi ulak, parakrin maddesi ya da hormon olarak fonksiyon görebilir. NO, renal hemodinamiği etkilemektedir. Renal kan akışında, vasküler tonusun ayarlanmasında, tübüler reabsorpsiyonda ve GFR'de önemli rol oynamaktadır. NO, renal mikrosirkülasyonda vazodilatatör etki yaratır ve öncelikli olarak afferent arteriyolde etkilidir (23,28).

NO, endotel hücrelerinde L-arginin amino asidinin terminal guandino atomunun enzimatik oksidasyonu ile sentezlenir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentezi katalize edilir. NOS bir flavoproteindir, nikotinamid adenin dinükleotid fosfata (NAPDH) ve oksijene bağımlı olarak oksidasyonu katalize eder. NOS kofaktör olarak NADPH'a, flavin adenin dinüklote (FAD) ve tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) gerek duyar (28,29). NOS'un 3 izoformu vardır:

1) NOS-1, Tip-1 NOS nöronal veya beyin NOS olarak bilinir. Nöronal ve epitel hücrelerde üretilir.

2) NOS-2, Tip-2 NOS, makrofaj NOS, indüklenmiş NOS (iNOS) olarak bilinir. Makrofajlarda ve düz kas hücrelerinde üretilir.

3) NOS-3, Tip-3 NOS, endotelial NOS olarak bilinir. Endotel hücrelerinde üretilir ve EDRF'yi üreten enzim olarak bilinir.

NOS-1 ve NOS-3 ikisi beraber cNOS (yapısal NOS) olarak bilinirler ve yapısal olarak üretilirler. cNOS kalsiyum ve kalmodiline bağımlı olarak fonksiyon görür. iNOS sentezi ise

sitokinler ve endotoksinler (interlökin-1,  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ) tarafından aktive edilir. iNOS enziminin kendisi sitotoksik ve toksik etki oluşturabilir. Fonksiyonu kalsiyum ve kalmodiline bağlı değildir. iNOS, diğer NOS tiplerine göre, daha fazla miktarda ve uzun süreli NO sentezlenmesine sebep olur ve NO'nun fizyolojik etkilerini şiddetlendirir (23,28-30).

NO metabolizması ise şöyledir: Yarılanma ömrü kısa ve kararsız bir molekül olan NO, endotelden salındıktan sonra (trombositte çözülmüş olan) guanilat siklazı aktive eder. Ardından bu enzimden ayrılan NO, nitrite ( $NO_2$ ) dönüşür, önce plazmaya ardından da eritrositlere geçer. Eritrositlerde hemoglobin ile reaksiyona giren nitrit, nitrate ( $NO_3$ ) indirgenir. Kan akımı içine difüze olan NO'nun bir kısmı direkt olarak eritrositler tarafından alınır veoksi-hemoglobinden ( $HbO_2$ ) gelen oksijenin ilavesi ile nitrate dönüşür. Oluşan nitrat plazmaya verilerek böbrekler yoluyla atılır. NO venöz kan içine salındığında non-oksijenize-hemoglobin ile nitrosohemoglobin oksijenle reaksiyona girer ve nitrat açığa çıkar (30).

NO'nun direkt etkileri ve indirekt etkileri vardır. Açığa çıkan biyolojik etkilerinin belirlenmesinde NO'nun kaynağı ve konsantrasyonu önemlidir. Düşük konsantrasyonlarda NO'nun direkt etkisi baskındır, cNOS az miktarda NO üretimine neden olmasından dolayı bu etkisinin açığa çıkmasına neden olur. NO üretildiği bölümden kolaylıkla difüze olabilir, uzaklaştıkça yarılanma ömrü artar ve konsantrasyonu azalır böylece direkt etki baskın hale gelir. Yüksek konsantrasyonlarda ise NO'nun indirekt etkisi baskındır. iNOS yüksek konsantrasyonda NO üretimine neden olarak indirekt etkinin açığa çıkmasına neden olur (29).

Direkt etki: NO'nun direkt etkisi kendi molekülü üzerinden meydana gelir. NO'nun metal komplekslerle birleşmesi sonucu bu etkisinin açığa çıktığı belirtilmektedir (28). NO endotelde üretildikten sonra damar düz kasına difüze olur ve buradaki çözülmüş guanilat siklazın demirine bağlanarak bu enzimi aktive eder (29). NO'nun guanilat siklazın demirine bağlanması, NO'nun demire olan afinitesini gösterir ve direkt etkilerinin oluşmasına neden olur. Bu enzimin aktivasyonu guanozin trifosfattan (GTP) ikinci ulak olan guanozin monofosfat (GMP) oluşmasını sağlar (30). Yüksek konsantrasyonda siklik GMP (cGMP) interselüler kalsiyum düzeyini azaltır ve düz kas hücrelerinde gevşemeyi sağlar (31).

İndirekt etki: iNOS katalizörlüğünde oluşan aşırı miktardaki NO'nun süperoksit ile reaksiyonu sonucu güçlü bir oksidan olan peroksinitrit oluşur, bu durum indirekt ve patolojik etkilerinin oluşmasına sebep olur. Peroksinitrit, toksik ve hipoksi-perfüzyonuna neden olduğu için yaralanmanın patofizyolojisine yer almaktadır. Ayrıca NO ve oksijen reaksiyonu sonucu  $N_2O_3$  üretilir. Bu oluşumun hidrolize olması ile nitrit formu meydana gelir (29,32).

## SERBEST RADİKALLER

Yapılarında bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom ya da moleküllerdir. Ortaklanmamış elektronlarından dolayı reaktif yapıdadırlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral; organik ya da inorganik yapıda olabilirler (32,33).

Bu birleşikler normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış etkenler nedeniyle de oluşabilmektedir. Çok kısa yaşam süreli ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle de çok aktif yapıdadırlar. Bundan dolayı tüm hücre birleşenleri ile etkileşebilmektedirler (32-36).

$Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Mo^{+5}$  gibi geçiş metalleri ise ortaklanmamış elektronları olmasına rağmen serbest radikal değildirler; ancak bu iyonlar kimyasal reaksiyonları sırasında katalizörlük görevi üstlenirler ve serbest radikal oluşumuna katkıda bulunurlar (33).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden (ROS) oluşan radikallerdir. ROS biyokimyasında rol oynayan anahtar maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları, hidroksil radikalidir (33,35).

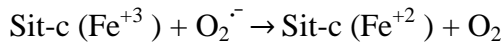
Oksijen aerobik metabolizması olan memelilerde, serbest radikallerin başlıca üretim kaynağıdır. İki tane eşlenmemiş elektrona sahip olmasından dolayı serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir. Oksijen hücre içinde oluşan bu reaksiyonların ardından suya dönüşür ve bu sırada hücre için gerekli olan enerji üretilir. Ancak bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşmez ve çok sayıda yüksek derecede reaktif ürün meydana gelebilir (32). Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, peroksinitrit, hidroksil radikali böbrekte üretilen başlıca oksijen radikalleridir (34).

### Süperoksit Radikali

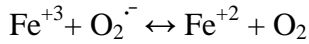
Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikal anyonu meydana gelir (33). Vazoregülasyon sağlanmasında önemli bir fizyolojik role sahiptir ve NO ile eşdeğerliktedir. Vasküler endotel az miktarda süperoksit radikali sentezleme yeteneğine sahiptir. NO, süperoksit çöpçüsüdür ve süperoksidin biyolojik etkilerini sınırlamaktadır. Bundan dolayı süperoksit ve NO, vasküler tonusun ve tübüler fonksiyonların düzenlenmesini ve normal böbrekte vasküler fonksiyonların devamlılığını sağlar (28,34,35). Süperoksit radikali bir serbest radikaldir ancak direkt zarar vermez. Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş

metal iyonlarının indirgeyicisi olmasından kaynaklanır. Ayrıca süperoksit fizyolojik bir serbest radikal olan NO ile birleşmesi sonucu reaktif oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Bu durum NO'nun normal etkisi inhibe edilmesine neden olur. Oluşan peroksinitritlerin protein, lipid, nükleik asitler üzerinde zararlı etkileri vardır. Ayrıca süperoksit, hidroksil radikali, nitronyum iyonu ve azot dioksit gibi farklı toksiklere dönüşebilir (33,35).

Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Süperoksit anyonu ferristokrom c'yi indirgemesi sırasında elektron kaybeder ve oksijene oksidize olur. Süperoksit anyonunun sitokrom c'yi indirgemesi SOD (süperoksit dismutaz) tarafından inhibe edilir. Bu yüzden SOD aktivitesi süperoksit miktarının belirlenmesinde kullanılır (33).



Oksidan görevine örnek verilecek olursa epinefrin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen peroksit meydana gelir. İndirgenmemiş metal iyonlarının otooksidasyonu sonucu da süperoksit radikali meydana gelir. Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü reaksiyonlardır (33).

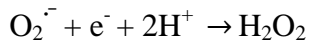


Süperoksit radikalının perhidroksil radikali ile reaksiyona girmesi durumunda hidrojen peroksit ve oksijen meydana gelir (33).

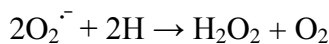


### **Hidrojen Peroksit**

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşir hidrojen peroksit meydana gelir. Hidrojen peroksit membrandan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (33,35).



Biyolojik sistemlerde ise genel olarak süperoksitin indirgenmesi sonucu oluşur. İki süperoksit molekülü 2 proton alır hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur. Bu reaksiyon SOD tarafından katalize edilir (37,38).



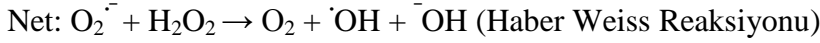
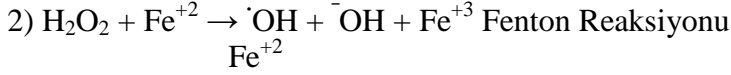
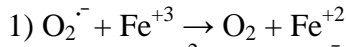
Hidrojen peroksit zararlı bir radikal olan hidroksilin oluşumundaki rolünden dolayı bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içine girer (33).



## Hidroksil Radikali

Hidrojen peroksidin Fenton Reaksiyonu ile geçiş metalleri varlığında indirgenmesi sonucu hidroksil radikali meydana gelir. Hidroksil, son derece reaktif ve zararlı oksijen radikali olup meydana geldiği yerlerde büyük hasarlara sebep olur. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden proton kopararak yeni radikaller oluşumuna neden olmaktadır (33,22).

En zararlı ve reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve süperoksitin demir katalizörlüğünde reaksiyona girmesiyle meydana gelen Haber Weiss reaksiyonu yoluyla oluşmaktadır (20,21):



Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) şelatçı bir ajandır ve Haber Weiss Reaksiyonu yoluyla oluşan hidroksil radikali oluşumunu stimüle eder. Demir iyonlarının lipid peroksitlerle reaksiyon hızını düşürür (33).

## Singlet Oksijen

$^1O_2$  ortaklanmamış elektronu olmadığından radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana gelir ve serbest radikal reaksiyonlarının oluşmasına neden olur (33).

## Geçiş Metalleri

Özellikle demir ve bakır fizyolojik şartlar altında çeşitli oksidasyon basamaklarında önemli rol oynar; oksidasyon sürecinde yükseltgenbilirler ve indirgenbilirler. Geçiş metalleri serbest radikal reaksiyonlarında katalizör vazifesi görür ve reaksiyonu hızlandırır. Demir, hidrojen peroksit ve süper oksitten hidroksil radikali sentezlenmesini sağlayan Haber-Weis ve Fenton reaksiyonlarını katalize etmektedir (20,22,33).

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi, lipid peroksidasyonu sırasında ortaya çıkmaktadır. Sentezlenmiş lipid peroksitlerini parçalarlar ve lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı serbest radikalleri daha zararlı hale getirirler (23,33).

## Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli birleşiklerine etki ederler. Serbest radikaller savunma mekanizmasının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır (32,33).

Membran lipidleri üzerine etkileri ve lipid peroksidasyonu: Tüm biyolojik moleküller serbest radikallerden etkilenirler. Ancak lipidler en hassas olanlarıdır. Membranda kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyon şeklinde devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Oksidatif hasarın derecesi membranın lipid protein oranına, fosfolipid miktarına, yağ asitlerinin birleşimine ve doymamışlık derecesine ve membran akışkanlığına bağlıdır (33,36).

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi ile membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliğini kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir birleşiktir ve değişikliklere uğrar. Molekül içi bağ yapısının değişmesi ve lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali oluşur. Lipid peroksil radikali membran yapısındaki doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikali oluşumuna yol açar, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece bu olay kendi kendini kataliz ederek devam eder (32,33).

Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar. Bu metaller, süperoksit ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalize eder (33,36).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksit yıkımı, geçiş metali iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında biyolojik olarak aktif olan aldehitleri oluştururlar. Bu birleşikler ise ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıç etki alanlarından diffüze olurlar ve hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen melondialdehit

(MDA) meydana gelir. MDA lipid peroksidasyonu derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir, lipid peroksidasyonunun ölçümünde kullanılmaktadır (33,35).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincirleme reaksiyondur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehit üreterek diğer hücre birleşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipidlerin çoğu hidrofobik yapıda olmasından dolayı reaksiyonların çoğu membran yapısına bağlı molekülerde meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bunun sonucunda deformasyon oluşur, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey birleşenlerini agregasyonu gibi intrinsik membran özellikleri değişir (33,35). Membran transport sistemi ve iyon dengelerinin bozulmasının ardından hücre içi kalsiyum artışı ve buna bağlı proteaz aktivasyonu oluşur. Lipid peroksidasyonuna bağlı hücre içi organellerde oluşan membran hasarını çeşitli litik enzimlerin salgılanması ve buna bağlı hasar artışları izler (36).

Proteinler üzerine etkileri: Serbest radikallerden doymamış yağ asitleri kadar etkilenmezler. Etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Proteinlerin belirli bölgelerinde serbest radikal hasarı yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki gösterir (33,36).

Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikal reaktivitesi yüksektir, bu yüzden triptofan, tirozin, fenilalenin, histinin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (33).

Sitoplazma ve membran proteinleri, ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlara maruz kaldıktan sonra çapraz bağlar dimerleşir ve daha büyük agregetlere dönüşürler. Prolin ve lizin, süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali oluşumuna neden olan reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hem proteinleri ise serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin, süperoksit ve hidrojen peroksit ile reaksiyonu sonucu methemoglobin oluşumuna sebep olur (32,33).

Nükleik asit ve DNA üzerine etkileri: İyonize edici radyasyonlarla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açar. Nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlı sitotoksosite gelişir. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Hidrojen peroksit membrandan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına ve hücre disfonksiyonlarına, hatta hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu yüzden DNA serbest radikaller için kolay zarar görebilir bir hedeftir (33,36).

Karbonhidratlar üzerine etkileri: Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler, okzoaldehitler meydana gelir. Karbonhidratların otooksidasyonu sonucu hücre bölünmesi inhibe edilmektedir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanma ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Doymamış yağ asitleri ve karbonhidratların oksidasyonunun bir ürünü olan glikokaliksin hücre bölünmesini inhibe ettiği belirtilmiştir (33,36).

## **ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ**

Reaktif oksijen türleri oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri ve kısaca antioksidanlar olarak bilinirler. Serbest radikallerin oluşma hızı ve etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece organizma serbest radikallerinden etkilenmemektedir. Ancak savunma azalır ya da bu zararlı birleşiklerin oluşma hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, bu denge bozulur ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler meydana gelir (32,33). Antioksidanların etki tipleri şöyledir:

- 1) Toplayıcı etki: Serbest radikalleri etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni moleküllere çevirme işlemidir.
- 2) Bastırıcı etki: Serbest radikallerle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif hale getiren etkidir.
- 3) Onarıcı etki: Hedef molekülün hasar sonrası tamir ve temizlenmesidir
- 4) Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp engelleyici etki oluşturmalarıdır (33).

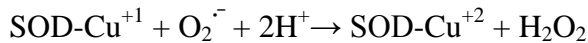
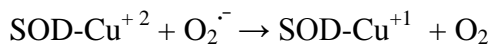
Antioksidanlar endojen kaynaklı ve ekzojen kaynaklı olarak başlıca 2 ana gruba ayrılmaktadır. Endojen kaynaklı antioksidanlar enzimsel olanlar ve enzimsel olmayanlar olarak 2'ye ayrılır. Enzimsel antioksidanlar SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz, hidroperoksidaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemidir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise lipid fazda ve sıvı fazda bulunanlar olmak üzere 2'ye ayrılır. Lipid fazda bulunanlara  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini) ve  $\beta$  karoten; sıvı fazda bulunanlara ise glutatyon, askorbik asit (C vitamini), melatonin, urat ve transferrin örnek verilebilir. Ekzojen antioksidanlar ise ksantin oksidaz inhibitörleri (ör: folik asit, oksipürinol), soya fasulyesi inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal enestezikler, kalsiyum

kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvarlar), rekombinant süperoksit dismutaz, trolox-C, endojen antioksidanların aktivitesini artırır (ebselen, asetilsistein) ve diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcılarıdır. Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılarına örnek olarak barbitüratlar, demir şelatörleri, sitokinler, TNF ve interlökin-1, nötrofil adezyon inhibitörleri, demir redox döngüsü inhibitörleri verilebilir (33).

Böbrekte üretilen radikaller enzimatik SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) antioksidanları ve nonenzimatik glutatyon (GSH), vitamin C ve E antioksidanları tarafından elimine edilmektedirler (28,34).

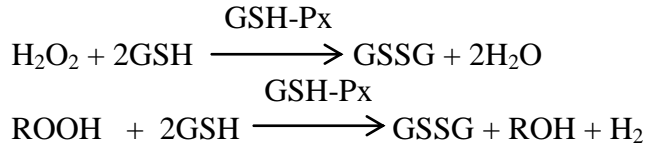
### **Süperoksit Dismutaz**

Bu enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri, süperoksit radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktır (37). Bu enzim süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize ederek hücrel süperoksit düzeyini kontrol etmede önemli bir rol üstlenir. Böylelikle lipid peroksidasyonu da inhibe edilmektedir. SOD kullanımı, yüksek oksijen tüketimi olan dokularda fazladır ve doku PO<sub>2</sub> artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde interselüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'un ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür. SOD reaksiyon hızını 4000 kat artırmaktadır. İnsanda Cu-Zn SOD ve Mn SOD olmak üzere iki tipi bulunur. Her ikisi de aynı reaksiyonu katalize ederler. SOD aktivitesi şöyledir (33):



### **Glutatyon Peroksidaz**

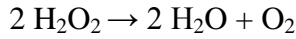
Molekül ağırlığı yaklaşık 85000 D olan sitozolde yerleşimli bir enzimdir. Tetramer yapısındadır ve 4 selenyum atomu içermektedir. Fosfolipid-hidroperoksit glutatyon peroksidaz enzimidir. Hidrojen peroksidin ve hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Zar yapısındaki fosfolipidleri alkole indirger ve özellikle E vitamini yetersizliklerinde peroksidasyona karşı koruyucudur. İki substratı vardır. Bunlardan biri peroksit olup alkole indirgenir, diğeri ise GSH'dır ve yükseltgenir. Aşağıdaki reaksiyonları katalize eder (33,38):



GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda solunum patlamasını takiben hidrojen peroksit salınımının arttığı gözlemlenmiştir. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan GSH-Px'dir, aktivitesinde azalma hidrojen peroksit artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olmaktadır (33,36).

### **Katalaz**

Hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu kataliz eder (33).



Enzim peroksizomlara yerleşmiştir ve yapısında 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir (37). Sahip olduğu peroksidadaz aktivitesine ek olarak bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici substrat olarak diğer bir hidrojen molekülünü de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit, metil, etil hidroperoksit gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlere ise etki etmez (33,37).

### **Glutasyon**

Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeyde sentezlenen bir tripeptittir. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden sentezlenmektedirler. Suda çözünebilen bir antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Glutasyonun pek çok metabolik görevi vardır. GSH transferaz ve redüktaz gibi enzimlerin substratı ve ko-substratıdır. Glutasyon serbest radikallerle ve peroksitlerle reaksiyona girer ve hücreleri oksidan hasara karşı korur (37). Hidrojen peroksiti, lipid peroksitleri, disülfüridler, askorbatı, serbest radikalleri indirgeyebilir. Serbest bir sülfhidril grubuna sahip olan indirgenmiş GSH hücre içi sülfidril tamponu olarak etkilidir, hücreleri oksidatif hasara ve toksik etkilere karşı korur. Eritrositlerde bulunan indirgenmiş GSH hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin tiyol

gruplarını indirgenmiş şekilde tutar. Böylece hemoglobini oksidasyona karşı korur ve hücre bütünlüğünü sağlar (33,36,37).

Nükleofilik yapıya sahip olan indirgenmiş glutatyon, elektrofilik karakterdeki karbon atomlarının ve Zn, Cu, Hg, Pb gibi kompleks oluşturan ağır metallerin vücuttan atılmasına yardımcı olur. GSH biyotransformasyon ile oluşan zehirli maddelerin detoksifikasyonunda rol oynar (33).

GSH'un peroksitlerle ve disülfidlerle reaksiyonu sonucu GSSG (glutathione disulfide = yükseltgenmiş glutatyon) oluşur. GSSG konsantrasyonundaki artış oksidatif stres artışının göstergesidir. Tiyol içeren proteinlerin konformasyon ve aktivitesi üzerine zararlı etkileri vardır (38). GSSG, NADPH'nin kullanıldığı bir reaksiyonla GSH'a yeniden indirgenebilir (37).

## ROSİGLİTAZON

Peroksizom proliferator aktive reseptörler (PPAR), steroid, tiroid, retinoid hormon reseptörlerini içeren nükleer hormon reseptör üst familyasındandır ve  $\alpha, \beta, \gamma$  olmak üzere 3 izoformu vardır.

PPAR $\gamma$  yağ doku, makrofaj, kolon, dalak, retina, hemopoetik hücrelerde, endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunur. Böbrekte ise medullar toplayıcı kanallarda, glomerül ve böbrek pelvisi endotel hücrelerinde bulunmaktadır (5,7,39). PPAR $\gamma$ 'nin doğal ligantları yağ asitleri (hidroxyoctadic asit (HODEs)), prostaglandinlerdir (15-deoksi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2); sentetik ligantları ise TZD'dır ve tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bu grubun üyeleri troglitazon, ciglitazon, pioglitazon ve rosiglitazondur (5). Rosiglitazon ise bu gruptaki en güçlü ve seçici ajandır. Reseptörlere bağlanma konusunda diğerlerinden daha yüksek afiniteye sahiptir (6).

PPAR $\gamma$  ligantlarının aktivasyonu transkriptör faktörlere bağlıdır; bu faktörler lipid ve glukoz metabolizması ile ilgili genler tarafından düzenlenmektedir (40). PPAR $\gamma$  glukoz homeostazisi, hücrel değişiklikler, lipid ve lipoprotein metabolizmasının ayarlanması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin yanısıra ateroskleroz, inflamasyon, kanser, infertilite, demiyalinizasyon gibi patolojik süreçlerde de yer almaktadır (6).

PPAR $\gamma$  agonistleri ve nükleer reseptörleri, retinoid X reseptör olarak bilinen diğer bir nükleer reseptörle kompleks oluşturabilirler (Retinoid X reseptör, kendi ligantıyla ya da retinoik asitle bağlanır.). Bu heterodimerik kompleks, bu reseptörlerde konformasyonel

değişikliklere neden olur. Bunun sonucunda da gen transkripsiyonunu düzenleyen hedef gende PPAR cevap elementi (PPARE) oluşur. PPARE, farklı metabolik olaylara sebep olan farklı genlerin transkripsiyonuna izin verir ya da engeller (7,40).

PPAR $\gamma$  reseptörleri karbonhidrat ve yağ metabolizmasında kritik bir role sahiptir, ancak yapılan çalışmalarda yağ ve karbonhidrat metabolizmasına bağlı olmadan, renal fonksiyonların düzenlenmesinde rol aldığı belirtilmiştir. PPAR $\gamma$  aktivasyonu kan basıncının düşürülmesini, postglomerüler efferent arteriyolde vazodilatasyon oluşumunu, NO üretiminin artmasını sağlamaktadır. PPAR $\gamma$ 'nin böbrek fonksiyonlarında ve böbrek hasarının patogeneğinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (7,40-42).

Farklı böbrek yetmezliği modellerinde PPAR $\gamma$ 'nin böbrek fonksiyonlarının ve böbrek kan akımının düzenlenmesinde, oksidatif stresin azaltılmasında ve tübüler fonksiyonların iyileştirilmesinde etkili olduğu rapor edilmiştir (41,42).

PPAR $\gamma$ 'nin metabolik etkilerine bağlı olmaksızın vasküler koruyucu etkisinin aşağıdaki mekanizma ile sağlandığı belirtilmiştir. PPAR $\gamma$  ligantlarının endotelial NO salınımını artırdığı belirtilmiştir:

1) PPAR $\gamma$  aktivasyonu, eNOS'un aktivasyonunu sağlayan proteinlerle eNOS'un etkileşmesini sağlar. Böylece eNOS'un direkt fosforilasyonuna neden olur ve endotelial NO salınımını artırır.

2) Aynı zamanda PPARE, Cu/Zn-SOD aktivitesini artırır ve NADPH oksidaz aktivitesini baskılar, bu da endotelial süperoksidi azaltmaktadır (40).

PPAR $\gamma$  aktivasyonu TXA<sub>2</sub>, AII reseptörlerinin gen aktivitesinin baskılanmasına neden olmaktadır. Bunlar vazokonstriksiyon mediyatörleridir ve aşırı miktarda üretimleri renal fonksiyonlarda azalmaya neden olmaktadır. Gliserolle oluşturulan ABY modellerinde aşırı miktarda oluşan serbest radikaller nedeniyle PPAR $\gamma$  reseptör aktivitesinde azalma meydana gelir. Bu da AII, TxA<sub>2</sub> artışına sebep olur (41-43). Ayrıca PPAR $\gamma$  aktivatörleri, ABY sürecinde miktarının arttığı bilinen ve önemli bir vazokonstriktör olan ET-1 üretimini de inhibe etmektedir (23,42).



## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda; Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilen ve standart laboratuvar koşullarında ( $22 \pm 1$  °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan, 250-300 g ağırlığında Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışma için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan (Ek-1) onay alındı. Sıçanlar deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, standart sıçan yemi ve musluk suyu verilerek beslendi.

Çalışmamızda 4 grupta 10'ar adet olmak üzere 40 adet sıçan kullanıldı. 1. ve 2. grup sıçanlar fizyolojik serum (FS), diğer gruplar im gliserol enjeksiyonundan 24 saat önce susuz bırakıldı. İlk enjeksiyondan sonra serbest diyet ve su alımı sağlandı. 1. ve 2. grup sıçanlara FS, 3. ve 4. gruplardaki sıçanlara %50'lik gliserol solüsyonundan 10 ml/kg'a göre bulunan toplam hacim eşit miktarlarda her iki arka bacak kaslarına enjekte edildi. 2.ve 4. gruba 4 mg/kg dozunda rosiglitazon; 1. ve 3. gruba ise 2.ve 4. grup ile eşdeğer hacimde FS oral yolla verilmiştir.

1. grup (kontrol) sıçanlara FS'nin im enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra oral yolla FS verildi.

2. grup (kontrol+rosiglitazon) sıçanlara FS'in im enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra oral yolla 4 mg/kg dozunda rosiglitazon verildi.

3. grup (ABY) sıçanlara gliserol enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra oral yolla FS verildi.

4. grup (ABY+rosiglitazon) sıçanlara gliserol enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra oral yolla 4 mg/kg dozunda rosiglitazon verildi.

Gliserol enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanlar 10 mg/kg rompun ve 50 mg/kg ketamin anestezisi altında kanları ve her iki böbreği alınarak, sakrifiye edildi. Böbrekler uzunlamasına ikiye bölünerek sağ böbreğin bir yarısı patolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonuna konularak ve diğer parçalar soğuk FS içine konulup daha sonra kurutma kağıdı ile kurutulup alimiyum folyalara sarılarak analizler yapılncaya kadar -80 °C'de saklandı. Kanlar tüplere alınarak santrifüj edildikten sonra serumları laboratuvar çalışmaları yapılncaya kadar -80 °C'de saklandı.

### **Kullanılan Cihazlar**

Spektrofotometre	: Spectronic Unicam Helios $\alpha$ , İngiltere
Hassas terazi	: Mettler Toledo, AB204-S, İsviçre
Soğutmalı santrifüj	: MPW 350R, Polonya
Su banyosu	: Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere
Otomatik pipetler	: Biohit Proline, Finlandiya, Mettler Toledo, İsviçre
Vorteks	: Heidolp, Almanya
Derin dondurucu	: Thermo Elektron Corporation, USA
pH metre	: InoLab, Level 1, Almanya
Manyetik karıştırıcı	: Remi equipments, Hindistan
Homojenizatör	: Polytron Kinematica AG, İsviçre
Otoanalizör	: Kanelab Prime 60i, Finlandiya

### **Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Rosvel	: Sanovel, Türkiye
Gliserol	: Merck, Almanya
NaOH	: Merck, Almanya
Na-K tartarat	: Merck, Almanya
Folin fenol reaktifi	: Merck, Almanya
$KH_2PO_4$	: Merck, Almanya
$Na_2HPO_4$	: Merck, Almanya
EDTA	: Merck, Almanya
$H_2O_2$	: Merck, Almanya

NaN <sub>3</sub>	: Merck, Almanya
Tiyobarbitürük asit	: Merck, Almanya
Piridin	: Merck, Almanya
Sodyum dodesil sülfat	: Merck, Almanya
Ksantin	: Sigma, Almanya
Ksantin oksidaz	: Sigma, Almanya
Glutasyon	: Sigma, Almanya
Glutasyon redüktaz	: Sigma, Almanya
NADPH	: Sigma, Almanya
Bovin serum albumin	: Sigma, Almanya
CuSO <sub>4</sub>	: Panreac, İspanya
Butanol	: Riedel de Haen, Almanya
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Riedel de Haen, Almanya
Etanol	: Riedel de Haen, Almanya
Asetik asit	: Riedel de Haen, Almanya

### **Biyokimyasal Çalışmalar**

Serum örneklerinde üre, kreatinin ölçümleri Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Laboratuvarı'nda bulunan otoanalizörde (Kanelab Prime 60i, Thermo Scientific, Finlandiya) yapıldı.

### **Histolojik Çalışmalar**

Sagittal olarak ikiye bölünen böbrek dokularının birer yarısı tamponlu %10'luk nötral formaldehit içinde 24 saat boyunca tespit edilmiştir. Vakum uygulaması eşliğinde sırasıyla artan derişimlerde alkol, ksilen ve erimiş parafin basamaklarını içeren takibe tabi tutulan dokuların parafine gömülmelerinin ardından 5 mikron kalınlığında kesitler alınmış ve tüm kesitler rutin hematoksilen-eozin boyaları ile boyanarak aynı patolog tarafından kör bakışla ikişer defa ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Değerlendirmede 10 büyük büyütme alanında proksimal tübül epitelindeki nekroz belirlenmiş ve tüm proksimal tübüllere olan oranı toplam değer in yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Aynı şekilde distal tübüller içindeki

proteinöz kastlar değerlendirilmiş ve kast içeren tübül lümenleri kast içermeyenlere oranlanarak toplam değer in yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

### **Böbrek Dokusu Homojenizasyonu**

Böbrek dokusu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarıldıktan sonra buzu çözülmeden kesilerek tartıldı. GSH ve MDA için 0.15 M KCl solüsyonu; SOD, CAT, GPx ve NO enzim aktiviteleri için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile %10'luk (w:v) olacak şekilde hazırlandı. Bistüri ile kesilen ve küçük parçalara ayrılan dokular tüplere konuldu. Tüpler buz üzerinde tutularak homojenizatör ile homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlar  $1500\times g$ 'de 10 dk  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Ayrılan süpernatantlar spektrofotometrik MDA, GSH, NO düzeyleri ve SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri ile protein ölçümlerinde kullanıldı.

### **Protein Miktar Tayini**

Protein miktar tayini Lowry metoduna göre yapıldı. Bu metod, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin fosfotungstat kompleksini molibden mavisine indirgemesi prensibine dayanır. Reaksiyon bakır ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ile belirginleştirilir (44).

Çözeltiler:

A Çözeltisi: %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 'ın 0.1 N NaOH'teki çözeltisi

B Çözeltisi: %1'lik  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi

C Çözeltisi: %2'lik Sodyum Potasyum tartarat çözeltis

D Çözeltisi: 98 hacim A çözeltisi + 1 hacim B çözeltisi + 1 hacim C çözeltisi karışımı

E Çözeltisi: 1 hacim Folin Fenol belirteci + 1 hacim distile su karışımı

Bovın Serum Albumin (BSA) Çözeltisi: Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA 10 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltilerden 1, 2, 3, 5, 7.5, 10 mg/ml'lik çözeltileri hazırlandı.

Deneyin yapılışı: Test ve standart tüplerine 490  $\mu\text{l}$ , kör tüpüne 500  $\mu\text{l}$  distile su kondu. Tüm tüplere 2.5 ml D çözeltisi ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 kat dilüe edilmiş numuneden 10  $\mu\text{l}$ ; standart tüplerine de 10  $\mu\text{l}$  her bir standarttan ilave edildi ve tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı. Oda ısısında karanlıkta 10 dk bekletildikten sonra, tüm tüplere 250  $\mu\text{l}$  E çözeltisi eklendi.  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk bekletildikten sonra, spektrofotometrede 650 nm'de köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı.

## Malondialdehit Miktar Tayini

Lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür (45).

### Çözeltiler

1. %8.1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. %20'lik Asetik asit (NaOH ile pH 3.5'e ayarlandı)
3. %0.8'lik tiyobarbitürik asit (TBA)
4. n-Butanol/Piridin (15:1)

Deneyin yapılışı: 0.2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı; 0.2 ml %8.1'lik SDS, 1.5 ml %20'lik asetik asit, 1.5 ml %0.8'lik TBA ve 0.6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 95 °C'deki sıcak su banyosunda 1 saat tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) eklenerek vorteksle 1 dakika karıştırıldı. Organik faz 4000xg'de 10 dk santrifüj edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Sonuçların hesaplanması:

$$C \text{ (nmol/ml)} = \frac{A \times V_t \times 10^9}{E \times V_s \times L \times 10^3}$$

- A : Absorbans  
E : Tüketim katsayısı ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )  
V<sub>t</sub> : Total reaksiyon hacmi  
V<sub>s</sub> : Total reaksiyon içindeki numune hacmi  
L : Küvet çapı  
10<sup>9</sup> : Molün nanomole çevrilmesi  
10<sup>3</sup> : Litrenin mililitreye çevrilmesi

Sonuçlar MDA nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

## Glutatyon Düzeyinin Ölçümü

Doku homojenatlarındaki serbest sülfidril gruplarının Ellman ayırıcı ile oluşturduğu rengin spektrofotometrik olarak saptanması, glutatyon içeriğinin belirtilmesi için kullanıldı (46).

Çözeltiler:

1. Proteinsizleştirme çözeltisi: 120 g NaCl, 6.68 g metafosforik asit ve 0.8 g sodyum-EDTA tartıldı ve 400 ml distile suda çözüldü.

2. 0.3 M Disodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

3. 1 mM Elman ayıracı: 4 mg 5.5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DNTB), 10 ml %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.

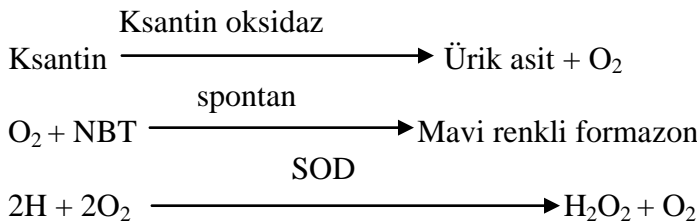
4. Glutatyon standardı: 10 mg/dl GSH

Deneyin yapılışı: 0.5 ml doku homojenatı üzerine 1.5 ml 0.15 M KCl ve 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi. Bu karışım 3000xg'de 20 dk santrifüj edildikten sonra 0.5 ml süpernatant alınarak üzerine 0.3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 0.5 ml Ellman ayıracı eklendi. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 412 nm'de okundu. GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı ( $\Sigma=1.36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar  $\mu\text{mol GSH/g}$  doku olarak ifade edildi.

### Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Bu araştırmada SOD enzim aktivitesinin tayini, ksantin  $\rightarrow$  ksantin oksidaz sistemiyle üretilen süperoksit radikallerinin, SOD tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülmesi ya da NBT (nitroblue tetrazolium)'yi indirgemesi esasına dayanır. İndirgenen NBT 560 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazona dönüşür. SOD ise, süperoksidin hidrojen peroksit'e dönüşümünü sağlar. Öyleyse, belli bir miktar NBT'yi içeren deney ortamında, oluşan süperoksidin miktarı standardize edildiği takdirde; bu ortamda bulunan SOD enziminin aktivitesiyle ters orantılı olarak mavi renkli formazon oluşacaktır (47).

Olayı şu şekilde formüle edebiliriz:



Kullanılan reaktifler:

1- Assay reaktifi:

a- 0.3 mmol/l ksantin: 9.13 mg alınıp son hacim 200 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü. Ksantin zor çözüldüğünde bu işlem ısıtılarak ya da ortama 1 M NaOH çözeltisinden 1-2-damla eklenerek yapılabilir.

b- 0.6 mmol/l Na<sub>2</sub>EDTA: 23 mg alınıp son hacim 100 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

c- 150 µmol/l NBT: 12.3 mg alınıp son hacim 100 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

d- 400 mmol/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 2.54 g alınıp son hacim 60 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

e- 1 g/l bovine serum albumin (BSA): 30 mg alınıp son hacim 30 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.

Hazırlanan tüm çözeltiler karıştırılarak (toplam hacim 490 ml olacak) koyu renkli bir şişede 4 °C'de muhafaza edildi.

2- Ksantin Oksidaz: ksantin oksidaz stok çözeltisi 4 °C'de soğutulmuş 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ile 167 Ü/l olacak şekilde hazırlandı.

3- CuCl<sub>2</sub> (0.8 mmol/l): 13.6 mg CuCl<sub>2</sub> alınıp bir miktar bidistile suda çözülerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

4- 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.64 g amonyum sülfat tartıldı bir miktar distile suda çözülerek toplam hacim 10 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti ksantin oksidazın dilüsyonunda kullanıldı.

Deneyin yapılışı: Deneye başlarken, 4 °C'de koruduğumuz hemolizat, fosfat tamponu ile 50 kez dilüe edildi. Ardından karışım iyice vortekslenildi ve 4 °C, 1000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Böylece numunelerimiz analize hazır hale geldi. Numuneler, spektrofotometrede 560 nm'de assay reaktifi ile sıfıra ayarlanarak, kör ve tüm numune tüplerinin absorbansları kaydedildi.

**Tablo 1. SOD tayin yöntemi**

	Kör tüpü	Test küveti
Assay reaktifi	2.850	2.850
Numune (hemolizat)		0.100
Bidistile su	0.100	
Ksantin oksidaz	0.050	0.050
25 °C'de 20 dk inkübasyon		yapıldı
CuCl <sub>2</sub> (ml)	1.00	1.00

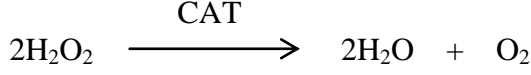
SOD aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Kör'ün absorbans}(A_k) - \text{Numunenin absorbansı} (A_n)}{\text{Kör'ün absorbansı}} \times 100$$

1 ünite SOD= NBT redüksiyonunu % 50 inhibe eden enzim aktivitesidir.

## CAT Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

CAT katalitik aktivitesiyle hidrojen peroksiti dekompoze ederek su ve oksijene dönüştürmektedir.



Hidrojen peroksit ultraviyole spektrumunda absorpsiyon veren bir maddedir. Maksimal absorban 240 nm’de meydana gelmektedir. Deney ortamına ilave edilen hidrojen peroksitin CAT tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm’de absorbanın azalması ile kendini gösterir. Absorbansın azalması ortamındaki CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılı bir eğilim göstermektedir (48).

Çözeltiler:

1. 50 mM pH 7.0 olan fosfat tamponu hazırlanır.
2. Hidrojen peroksitli ve absorbanı 0.500 olan fosfat tamponu: Spektrofotometre 240 nm’ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile aletin sıfır absorban okuması sağlandı. Hidrojen peroksitli fosfat tamponu, absorban 0.500 oluncaya kadar damla damla hidrojen peroksit eklenerek ayarlandı.

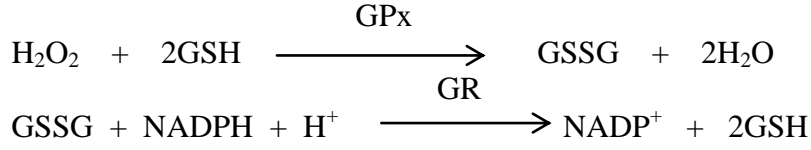
Deneyin yapılışı: Spektrofotometre 240 nm’ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile sıfır absorban ayarlandı. 3 ml’lik küvete 2.99 ml hidrojen peroksitli fosfat tamponu ve 50 kat dilüe edilmiş numuneden 0.01 ml ilave edilerek hızla karıştırıp absorbanı okundu, bu başlangıç absorbanıdır. Daha sonra 60 saniye süreyle absorbanın azalması takip edildi. Sürenin sonunda okunan absorban değeri kaydedildi. Sonuçlar  $\kappa$ /mg protein şeklinde ifade edildi.

$$\kappa = \frac{2.3 \times \log \frac{\text{İlk absorban}}{\text{Son absorban}}}{\Delta t \text{ (ölçüm süresi, sn)}} \times \text{Sulandırma katsayısı}$$

## Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

GPx, GSH’ı kullanarak hidrojen peroksitin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonunda GSH okside forma dönüşürken, hidrojen peroksit ise suya katalizlenir. Oluşan GSSG’un tekrar kullanılabilmesi için GSSG’nin GSH’a dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm, ortamda redükte NADP (NADPH) ve GR enzimi varlığında gerçekleşir. Bu durumda redükte NADP okside NADP’ye çevrilirken GSSG redükte forma dönüşür (49).





Redükte NADP 340 nm’de maksimal absorbans gösteren bir maddedir. GR katalizi devam ettikçe, ortamdaki NADPH miktarı giderek azalacak ve buna paralel olarak 340 nm’de absorbans azalması meydana gelecektir. Absorbanstaki bu azalma hızı ortamdaki GPx aktivitesi ile doğru orantılı olacaktır.

Çözeltiler:

1. 5 mM EDTA içeren 50 mM pH 7’lik fosfat tamponu.
2. 150 mM GSH EDTA’lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
3. 1 M NaN<sub>3</sub> EDTA’lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
4. 3 mM NADPH EDTA’lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
5. 50 mM hidrojen peroksit EDTA’lı fosfat tamponunda çözüldü (kullanımdan hemen önce hazırlandı).
6. 1 Ü/10 µl GR olacak şekilde fosfat tamponunda dilüe edildi.

Deneyin yapılışı: Kör tüpüne 2.680 ml ve test tüplerine 2.670 ml EDTA’lı fosfat tamponu, 0.1 ml GSH, 0.1 ml NADPH, 0.01 ml GR, 0.01 ml NaN<sub>3</sub>, ayrıca test tüplerine 0.01 ml 10 kat dilüe edilmiş numune ilave edildikten sonra 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometre 340 nm’de fosfat tamponu ile sıfırlandı. Sürenin sonunda her tübe 100 µl hidrojen peroksit ilave edilip reaksiyon başlatıldı ve hemen küvetler spektrofotometreye konarak 3 dk süreyle absorbans azalması takip edildi. Absorbans azalmasının bu süre içerisinde tam olarak lineer olduğu görüldü.

Sonuçların hesaplanması:

1 Ünite GPx: 1 dakikada okside olan NADPH’ın µmol cinsinden miktarıdır.

$$\dot{U}/L (\mu\text{mol}/\text{dk}/L) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times L}$$

E : NADPH’in tüketim katsayısı (6.22 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

V<sub>t</sub> : Total reaksiyon hacmi

V<sub>s</sub> : Total reaksiyon içindeki numune hacmi

L : Küvet çapı

ΔA/t : Dakikadaki absorbans değişimi

10<sup>6</sup> : Molün mikromole çevrilmesi

Spesifik aktivite için bulunan sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

## Nitrat ve Nitrit Tayini

Nitrat ve Nitrit Tayini Cortes ve Wakid'in tasfir ettiği yönteme göre yapıldı (50).

Kullanılan reaktifler:

1. Kadmiyum granülleri: 0.1 mol/l  $H_2SO_4$  içinde saklandığı sürece 9 ay stabildir.
2. Glisin-NaOH buffer: 7.5 g glisin bir miktar distile suda üzüldü. 2 mol/l NaOH  zeltisi ile pH'sı 9.7'ye ayarlandı. Bu  zelti 1 ay 0-8  C'de stabildir.
3. Sülfanilamid: 2.5 g sülfanilamid 250 ml sıcak 3 mol/l HCl içinde üzüldü ve daha sonra soğumaya bırakıldı. 1 yıl oda sıcaklığında stabil kalabilir.
4. N-Naphthiletlen diamin (NNDA): 50 mg NNDA 250 ml distile su içinde üzüldü. 2 ay 0-8  C de stabildir.
5. Çinko Sülfat ( $ZnSO_4$ ): 75 mmol/l; 10.8 mg alınıp 500 ml'ye tamamlandı.
6. Bakır Sülfat ( $CuSO_4$ ): 5 mmol/l; 250 mg alınıp 200 ml'ye tamamlandı.
7. Sodyum Hidroksit (NaOH): 55 mmol/l; 1.1 g alınıp 500 ml'ye tamamlandı.
8. Standartlar:  $NaNO_2$  standardı 10 mmol/l'lik sodyum tetra borat  zeltisi içinde hazırlanır. (69 mg  $NaNO_2$ , 380 mg borat ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ ) 100 ml içinde üzülür.)  
 $KNO_3$  standardı; 102 mg potasyum nitrat alınıp 10 mmol'lik 100 ml sodyum tetra borat içinde üzülür.

Deneyin yapılışı:

Deproteinizasyon: Test tüpüne 0.5 ml numune, 0.5 ml distile su, 2 ml  $ZnSO_4$ , 2.5 ml NaOH ilave edilip vorteksle karıştırılır. 10 dk oda ısısında beklettikten sonra 4000xg'de 10 dk santrifüj edildi.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Granüller 3 defa distile su ile yıkanır. 1-2 dk içinde  $CuSO_4$ 'de çalkalanarak bekletilip, 3 defa da glisin-NaOH ile yıkanıp 10 dk içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutulur.

Sonucun hesaplanması:  $KNO_3$  standardından 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlanır ve numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulanır. 1ml glisin-NaOH buffer tüm tüplere konulur. 1'er ml deproteinize numunelerden ve standartlardan alınır. 2.5 g tartılan ve aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan tüm tüplerin üzerine konulur. 90 dk oda ısısında karıştırarak beklenir. Süre sonunda Nitrit  l m  için bu tüplerden 2'şer ml alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA ilave edilir; karıştırılır ve 45 dk beklendikten sonra 545 nm'de okuma yapılır.

Direkt nitrit ölçümü:  $\text{NaNO}_2$  standartlarından 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlanır ve deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2'şer ml alınarak ayrı tüplere konulur. Üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA eklenir. 45 dk sonra 545 nm'de okuma yapılır .

### **Nitrat Ölçümü**

Bulunan nitrat değerlerinden nitrit değerleri çıkarıldıktan sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpılıp yine nitrat standardından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç milimol/litre olarak hesaplanmış olur.

### **İstatistik**

Sonuçlar sayı (yüzde) ya da ortalama  $\pm$  std.sapma olarak ifade edildiler. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Tek örneklem Kolmogorov-Smirnov Test ile incelendi. Değerlerin gruplar arasında farklı olup olmadıkları Kruskal Wallis test ile incelendi. Gruplar arası fark bulunduğunda farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemede Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi (düzeltme sonrası anlamlılık sınır değeri  $p < 0.0125$  olarak saptandı) kullanıldı. İstatistiksel analizlerde Statistica 7.0 (Lisans kodu:31N6YUCV38) paket programı kullanıldı.

## BULGULAR

Sıçanlarda hipertonic gliserolün im uygulanmasıyla oluşturulan deneysel miyoglobinürik ABY modeli, 4 grupta 40 sıçan üzerinde çalışıldı. Gliserol enjeksiyonunun 48. saatinde anestezi altında sıçanların kan ve doku örnekleri alındı. Ancak 3. grupta 2 sıçan 48 saat dolmadan gelişen komplikasyonlar sonucu öldü. 4. Grupta ise rosiglitazonun ilk dozunun verilmesinin ardından 24 saat içinde 7 sıçan öldü.

Tüm gruplardaki sıçanlara ait doku MDA düzeyi nmol/g doku, GSH düzeyleri  $\mu\text{mol/g}$  doku, NO düzeyi  $\mu\text{mol/mg}$  protein, SOD aktivitesi U/mg protein, CAT aktivitesi  $\kappa/\text{mg}$  protein ve GPx aktivitesi U/mg protein, plazma üre ( $P_{\text{üre}}$ ) düzeyi mg/dl, kreatinin ( $P_{\text{krea}}$ ) düzeyi mg/dl olarak hesaplandı. Gruplara ait veriler tablolarda gösterilmiştir (Tablo 2-5).

Çalışma gruplarının değişkenlere ait istatistik verileri Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 2. 1. grubun biyokimyasal verileri**

SN	MDA	GSH	SOD	GPx	CAT	NO	P <sub>üre</sub>	P <sub>krea</sub>
1	0.500	3.700	20.813	4.145	1.547	11.187	46	0.5
2	0.373	3.044	19.572	4.455	1.734	6.140	38	0.5
3	0.258	3.144	21.790	2.653	1.656	22.239	37	0.3
4	0.387	4.349	21.119	4.331	1.372	27.570	49	0.5
5	0.418	5.337	20.779	3.167	1.600	10.264	47	0.4
6	0.364	4.074	19.764	4.781	1.610	19.070	41	0.5
7	0.413	4.415	19.523	3.182	1.518	19.592	55	0.4
8	0.341	4.626	20.102	4.484	0.000	21.277	39	0.5
9	0.376	3.352	20.006	2.385	1.781	15.363	44	0.4
10	0.439	3.380	19.170	4.824	2.185	19.651	30	0.4

SN: Sayfa numarası; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutatyon; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutatyon peroksidaz; CAT: Katalaz; NO: Nitrik oksit, P<sub>üre</sub>: Plazma üre; P<sub>krea</sub>: Plazma kreatinin

**Tablo 3. 2. grubun biyokimyasal verileri**

SN	MDA	GSH	SOD	GPx	CAT	NO	P <sub>üre</sub>	P <sub>krea</sub>
1	0.608	5.124	23.066	3.622	2.422	34.721	43	0.4
2	0.581	3.255	36.591	5.363	2.688	29.349	40	0.5
3	0.574	4.272	25.891	4.043	2.673	32.634	50	0.4
4	0.392	2.862	21.453	3.177	1.825	16.474	46	0.4
5	0.450	3.383	32.615	4.688	3.776	28.912	48	0.4
6	0.421	3.587	18.739	2.929	2.029	35.440	46	0.5
7	0.387	3.263	18.948	2.606	2.843	30.372	50	0.5
8	0.429	3.026	18.380	2.813	1.800	21.477	43	0.4
9	0.462	4.031	20.746	2.919	2.180	22.072	41	0.5
10	0.485	4.434	19.008	3.057	1.416	7.965	47	0.5

SN: Sayfa numarası; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutatyon; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutatyon peroksidaz; CAT: Katalaz; NO: Nitrik oksit, P<sub>üre</sub>: Plazma üre; P<sub>krea</sub>: Plazma kreatinin

**Tablo 4. 3. grubun biyokimyasal verileri**

SN	MDA	GSH	SOD	GPx	CAT	NO	P <sub>üre</sub>	P <sub>krea</sub>
1								
2	2.701	2.308	32.479	2.284	1.743	11.843	614	6.1
3	0.900	2.208	18.574	3.420	0.458	7.484	654	5.7
4	1.031	2.686	17.352	1.946	0.645	11.294	580	4.4
5	0.849	2.526	18.780	2.754	0.734	1.450	634	5.1
6	0.805	2.961	17.568	2.371	0.509	3.681	608	4.9
7	0.865	2.662	18.507	3.532	0.849	9.486	609	4.9
8	0.854	2.713	17.090	2.659	0.546	7.833	620	5.4
9	0.805	3.186	20.176	2.136	0.523	3.382	624	5.6
10								

SN: Sayfa numarası; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutatyon; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutatyon peroksidaz; CAT: Katalaz; NO: Nitrik oksit, P<sub>üre</sub>: Plazma üre; P<sub>krea</sub>: Plazma kreatinin

**Tablo 5. 4. grubun biyokimyasal verileri**

SN	MDA	GSH	SOD	GPx	CAT	NO	P <sub>üre</sub>	P <sub>krea</sub>
1	1.144	3.341	17.163	3.299	1.317	11.126	508	4
2								
3								
4								
5								
6	0.937	2.464	17.491	3.067	1.093	18.002	496	4.3
7								
8	1.064	2.976	16.069	3.599	0.334	17.203	497	4.8
9								
10								

SN: Sayfa numarası; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutatyon; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutatyon peroksidaz; CAT: Katalaz; NO: Nitrik oksit, P<sub>üre</sub>: Plazma üre; P<sub>krea</sub>: Plazma kreatinin

**Tablo 6. Çalışma gruplarının değişkenlere ait istatistik verileri**

	<b>1. GRUP (n= 10)</b>	<b>2. GRUP (n= 10)</b>	<b>3. GRUP (n= 8)</b>	<b>4. GRUP (n= 3)</b>	<b>p*</b>
Parametreler	<b>Ort. ± SD</b>	<b>Ort. ± SD</b>	<b>Ort. ± SD</b>	<b>Ort. ± SD</b>	
MDA nmol/g doku	0.39±0.06	0.48±0.08	1.10±0.65	1.05±0.10	<0.001
GSH µmol/g doku	3.94±0.74	3.72±0.72	2.66±0.32	2.93±0.44	0.001
SOD U/mg protein	20.26±0.83	23.54± 6.34	20.07±5.11	16.90±0.74	0.007
GPx U/mg protein	3.84±0.91	3.52±0.91	2.64±0.58	3.32±0.27	0.036
CAT κ/mg protein	1.50±0.57	2.37±0.67	0.75±0.42	0.91±0.52	<0.001
NO doku µmol/mg protein	17.24±6.45	25.94±8.82	7.06±3.85	15.44±3.76	0.001
P <sub>üre</sub> mg/dl	42.60±7.10	45.4±3.53	617.88±21.49	500.33±6.66	<0.001
P <sub>krea</sub> mg/dl	0.44±0.07	0.45±0.05	5.26±0.54	4.37±0.40	<0.001

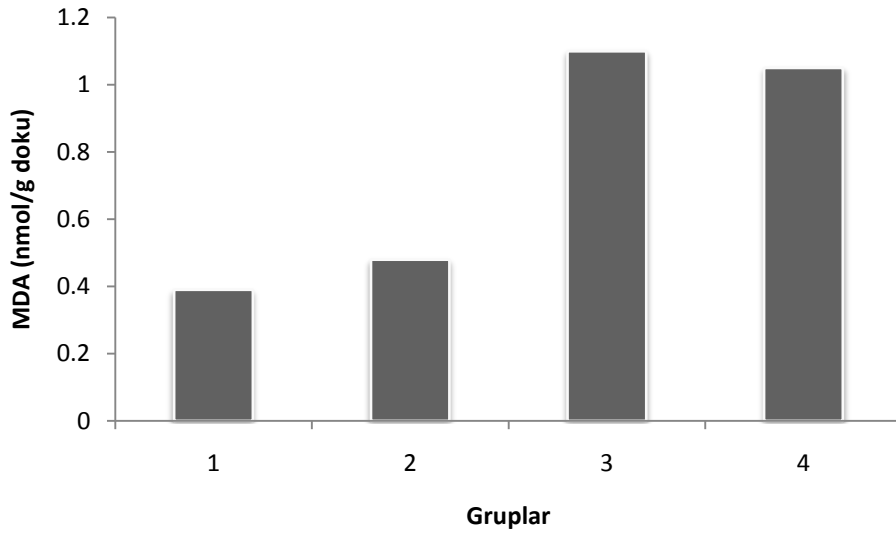
\*Kruskal-Wallis Test

MDA: Malondialdehit; GSH: Glutasyon; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; CAT: Katalaz;  
NO: Nitrik oksit, P<sub>üre</sub>: Plazma üre; P<sub>krea</sub>: Plazma kreatinin

Gruplar arası MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p<0.001$ ). Gruplar arası MDA düzeyinde 1. grup ile 2. grup arasında  $p=0.007$ ; 1. grup ile 3. grup arasında  $p<0.001$  düzeyinde anlamlı artma gözlemlendi. 3. grup ile 4. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. MDA düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları Tablo 7’de, gruplara göre dağılım Şekil 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 7. MDA düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları**

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p=0.007$		
3. grup	$p<0.001$	$p<0.001$	
4. grup	$p=0.007$	$p=0.007$	$p>0.102$



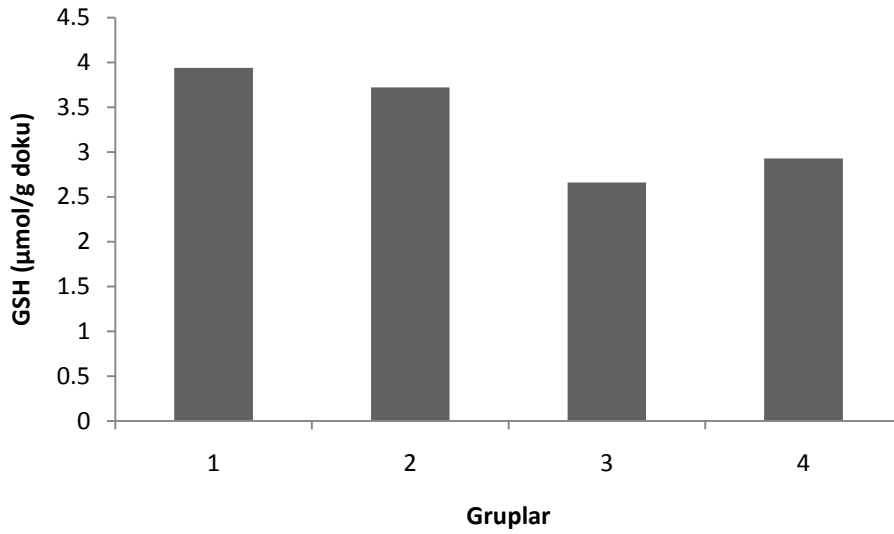
**Şekil 1. Gruplara göre MDA düzeylerinin dağılımı**



Gruplar arası GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p=0.001$ ). Gruplar arası GSH düzeyinde, 1. grup ile 3. grup arasında  $p<0.001$  düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. 1. grup ile 2. grup arasında ve 3.ve 4. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi. GSH düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları Tablo 8’de, gruplara göre dağılım Şekil 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 8. GSH düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları**

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0.450$		
3. grup	$p<0.001$	$p<0.001$	
4. grup	$p>0.028$	$p>0.091$	$p>0.307$

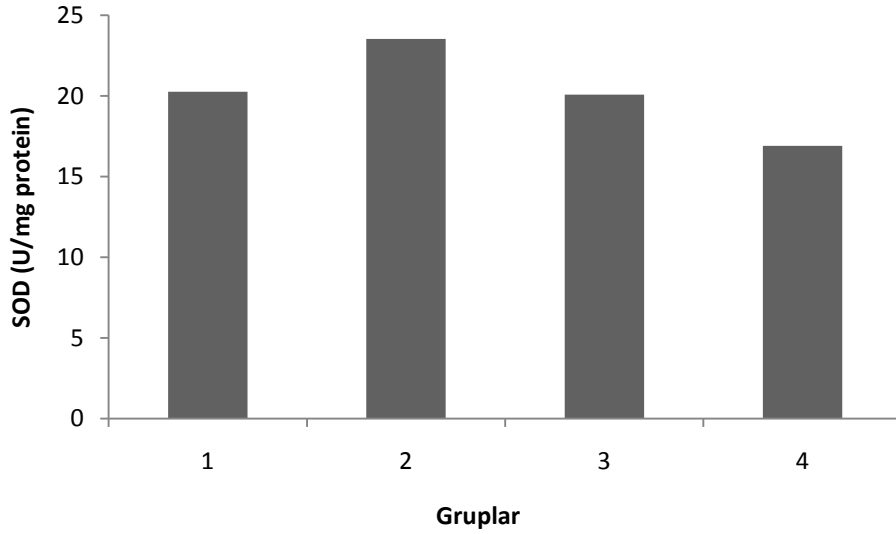


**Şekil 2. Gruplara göre GSH düzeylerinin dağılımı**

Gruplar arası SOD enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p=0.007$ ). Gruplar arası SOD enzim aktivitesinde 1. grup ile 2. grup arasında; 1. grup ile 3. grup arasında ve 3. grup ile 4. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Mann-Whitney U testi sonuçları Tablo 9’da, gruplara göre dağılım Şekil 3’te gösterilmiştir.

**Tablo 9. SOD aktivitesinin Mann-Whitney U testi sonuçları**

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0.705$		
3. grup	$p>0.033$	$p>0.033$	
4. grup	$p=0.007$	$p=0.007$	$p>0.066$

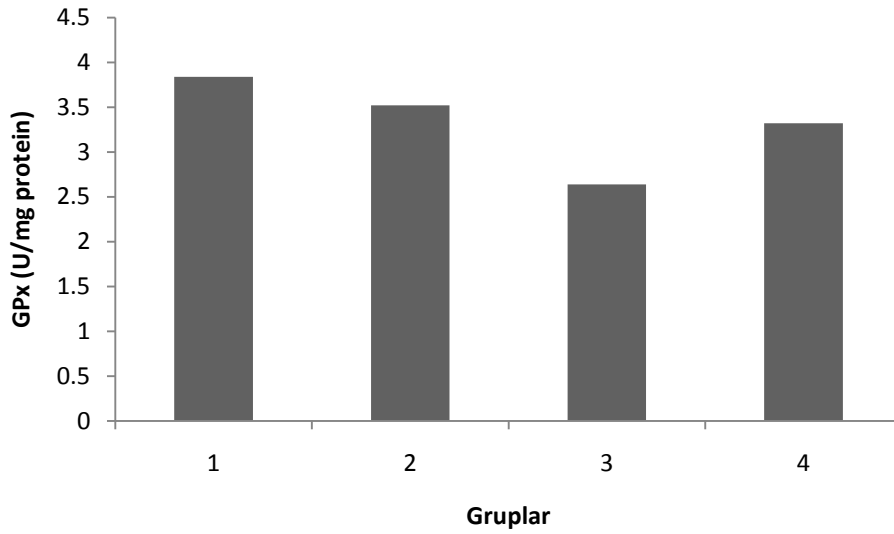


**Şekil 3. Gruplara göre SOD aktivitesinin dağılımı**

Gruplar arası GPx enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p=0.036$ ). Gruplar arası GPx enzim aktivitesinde 1. grup ile 3. grup arasında  $p=0.012$  düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. 1. grup ile 2. grup arasında ve 3. grup ile 4. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi. Mann-Whitney U testi sonuçları Tablo 10’da, gruplara göre dağılım Şekil 4’te gösterilmiştir.

**Tablo 10. GPx aktivitelerinin Mann-Whitney U testi sonuçları**

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0.364$		
3. grup	$p=0.012$	$p>0.021$	
4. grup	$p>0.398$	$p>0.735$	$p>0.102$

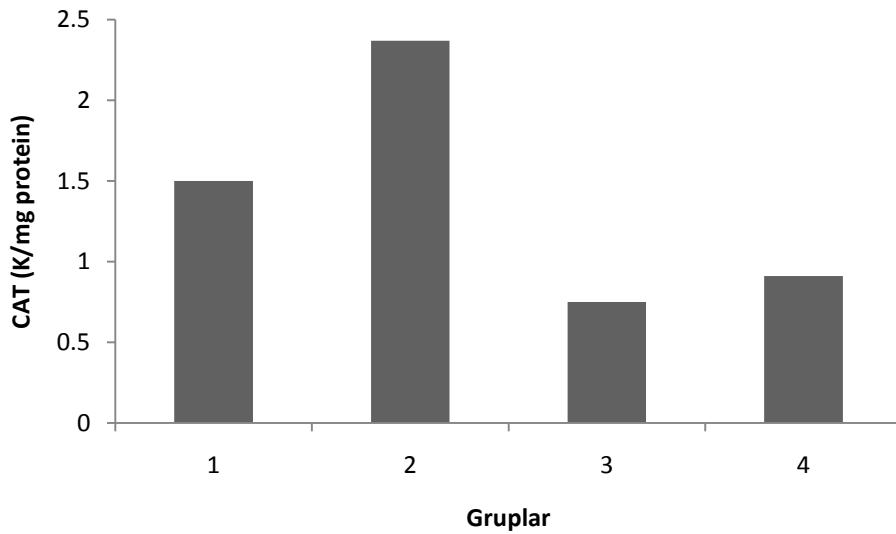


**Şekil 4. Gruplara göre GPx aktivitelerinin dağılımı**

Gruplar arası CAT enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.001$ ). Gruplar arası CAT enzim aktivitesinde 1. grup ile 2. grup arasında  $p = 0.003$  düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. 1. grup ile 3. grup arasında ve 3. grup ile 4. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi. Mann-Whitney U testi sonuçları Tablo 11’de, gruplara göre dağılım Şekil 5’te gösterilmiştir.

**Tablo 11. CAT aktivitelerinin Mann-Whitney U testi sonuçları**

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p = 0.003$		
3. grup	$p > 0.026$	$p < 0.001$	
4. grup	$p > 0.043$	$p = 0.007$	$p > 0.683$

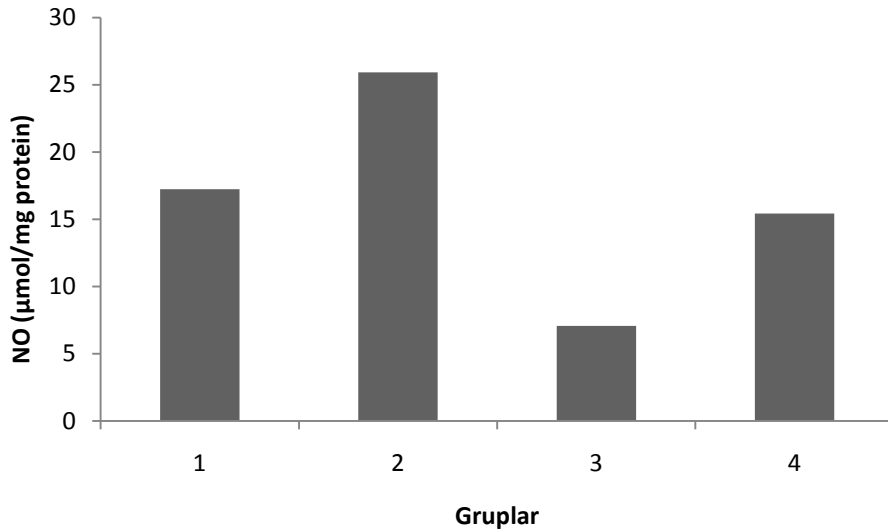


**Şekil 5. Gruplara göre CAT aktivitelerinin dağılımı**

Gruplar arası doku NO düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p=0.001$ ). Gruplar arası doku NO düzeylerinde 1. grup ile 3. grup arasında  $p=0.004$  düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. 1. grup ile 2. grup arasında ve 3. grup ile 4. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi. Mann-Whitney U testi sonuçları Tablo 12’de, gruplara göre dağılım Şekil 6’da gösterilmiştir.

**Tablo 12. Doku NO düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları**

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0.019$		
3. grup	$p=0.004$	$p<0.001$	
4. grup	$p>0.398$	$p>0.091$	$p>0.041$

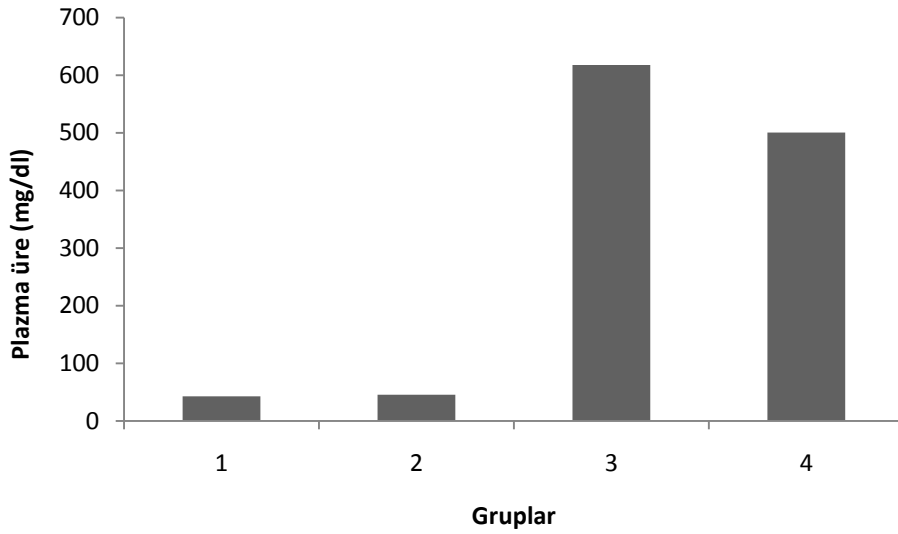


**Şekil 6. Gruplara göre doku NO düzeylerinin dağılımı**

Gruplar arası  $P_{\text{üre}}$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.001$ ). Gruplar arası  $P_{\text{üre}}$  düzeylerinde 1. grup ile 3. grup arasında  $p < 0.001$  düzeyinde anlamlı artma, 3. grup ile 4. grup arasında  $p = 0.012$  düzeyinde anlamlı azalma gözlenmiştir. 1. grup ile 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Mann-Whitney U testi sonuçları Tablo 13'te, gruplara göre dağılım Şekil 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 13. Plazma üre düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları**

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p > 0.255$		
3. grup	$p < 0.001$	$p < 0.001$	
4. grup	$p = 0.007$	$p = 0.007$	$p = 0.012$

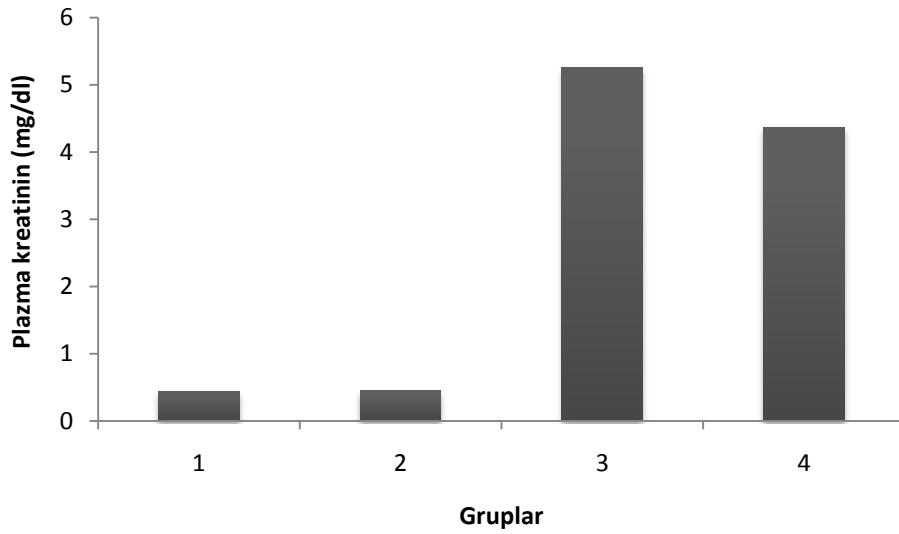


**Şekil 7. Gruplara göre plazma üre düzeylerinin dağılımı**

Gruplar arası  $P_{krea}$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p<0.001$ ). Gruplar arası  $P_{krea}$  düzeylerinde 1. grup ile 3. grup arasında  $p<0.001$  düzeyinde anlamlı artma gözlemlendi. 1. grup ile 2. grup arasında ve 3. grup ile 4. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Mann-Whitney U testi sonuçları Tablo 14’te, gruplara göre dağılım Şekil 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 14. Plazma kreatinin düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları**

	1. grup	2. grup	3. grup
2. grup	$p>0.831$		
3. grup	$p<0.001$	$p<0.001$	
4. grup	$p =0.007$	$p =0.007$	$p>0.024$



**Şekil 8. Gruplara göre plazma kreatinin düzeylerinin dağılımı**

## Histopatolojik Sonuçlar

Çalışmamızda böbrek dokularının histopatolojik incelenmesinde; 100 alanda nekroz ve kast miktarı her bir sıçan için hesaplandı ve % nekroz ve % kast değerleri için her bir grubun ortalamaları hesaplanarak Tablo 15'te verildi.

1. gruptaki sıçanların hematoksilen-eosin (HE) boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; tübül içerinde hücre kastları (debris)  $1.90 \pm 3.28$  oranında görüldü. Tübüllerde nekroz yoktu. Glomerüllerde bir değişiklik göze çarpmadı (şekil 9).

2. gruptaki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; tübül içi hücre kast birikimi  $4.70 \pm 4.19$  oranında rastlandı. Tübüllerde nekroz görülmedi. Glomerüllerde bir değişiklik göze çarpmadı (şekil 10).

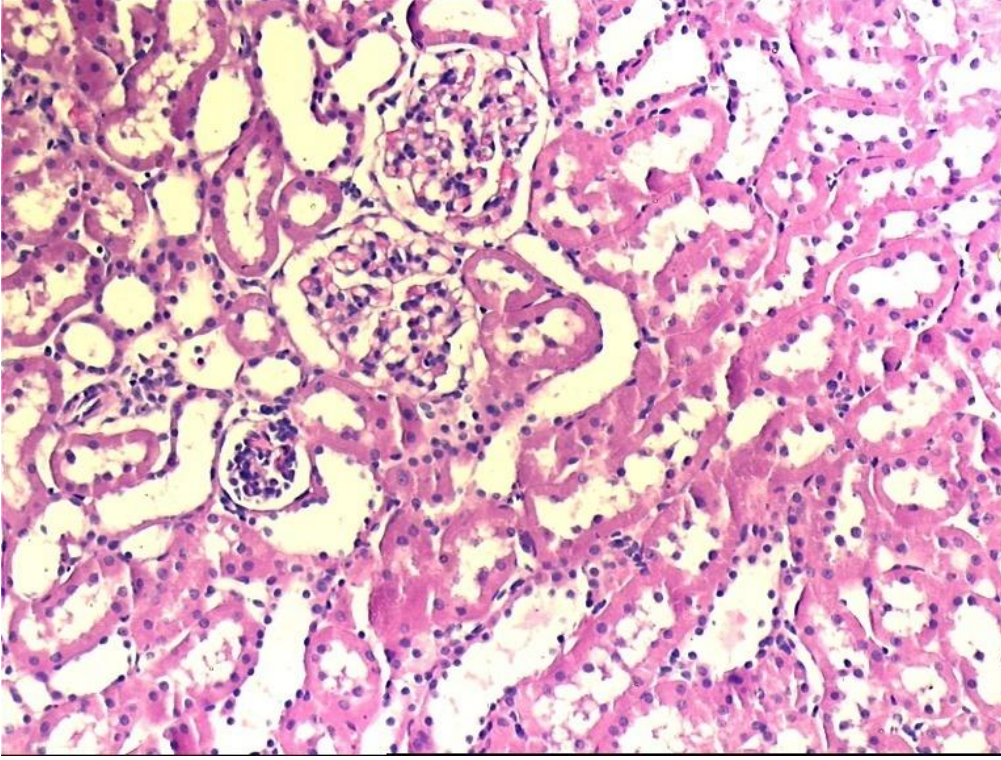
3. gruptaki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; korteksteki proksimal tübül epitelinde %100'e varan oranlarda nekroza rastlandı (tübüler nekroz ortalama  $80.00 \pm 11.95$ ). Distal tübülde kast şeklinde dens proteinöz madde birikimi (tübüler kast ortalama  $66.25 \pm 15.06$ ) izlendi. Tübüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Distal tübül hücrelerinde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon dikkati çekti. Glomerüllerde belirgin bir konjesyon dışında bir değişiklik görülmedi. Peritübüler stromada dem ve vasküler yapılar da konjesyon mevcuttu. Tübüler hücrelerde rejenerasyon izlenmekteydi (şekil 11).

4. gruptaki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; 3. gruba oranla proksimal tübül epitelinde nekroz ve distal tübülde proteinöz birikimlerde azalma görüldü. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (tübüler nekroz ortalama  $46.67 \pm 23.09$ , distal tübül proteinöz birikimleri ortalama  $40.00 \pm 10.00$ ). Tübüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Tübüler hücrelerde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon görüldü. Glomerüllerde bir değişiklik görülmedi. Peritübüler stromada dem ve vasküler yapılar da konjesyon mevcuttu. Tübüler hücrelerde rejenerasyon izlenmekteydi (şekil 12).

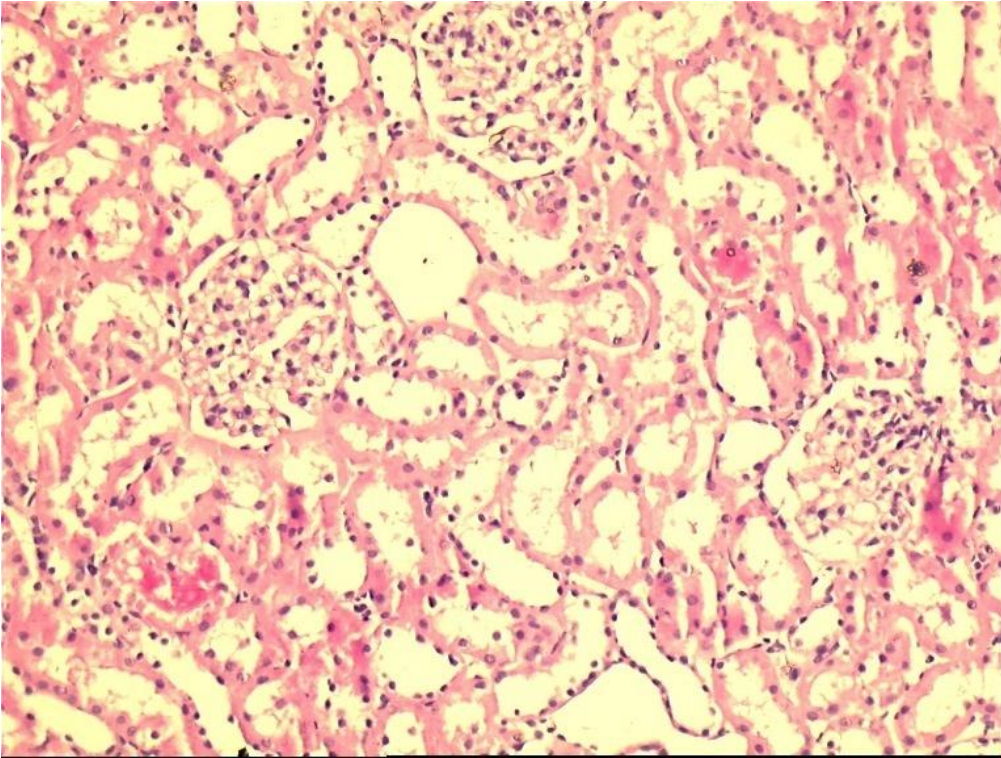


**Tablo 15. Grupların histopatolojik nekroz ve kast miktarlarının % olarak değerleri**

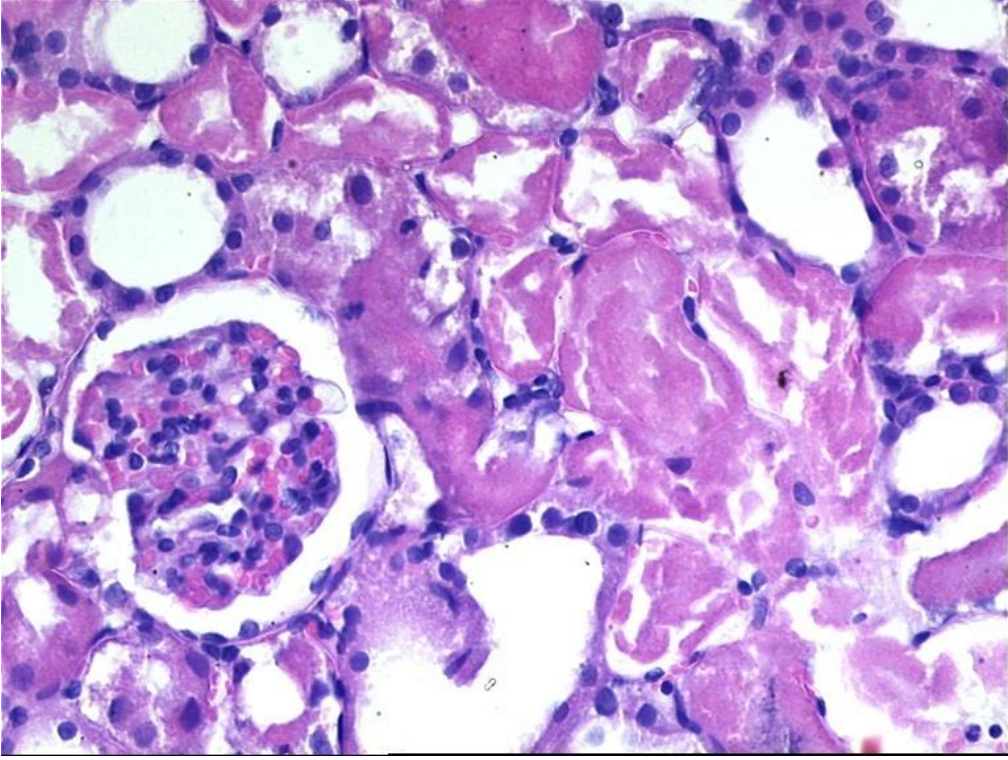
SN	1. grup		2. grup		3. grup		4. grup	
	Nekroz %	Kast %	Nekroz %	Kast %	Nekroz %	Kast %	Nekroz %	Kast %
1	0	2	0	5			20	30
2	0	0	0	2	60	60		
3	0	0	0	0	90	80		
4	0	0	0	10	80	80		
5	0	2	0	10	80	80		
6	0	0	0	0	80	50	60	50
7	0	5	0	10	70	40		
8	0	10	0	5	80	70	60	40
9	0	0	0	5	100	70		
10	0	0	0	0				
Ort. $\pm$ SD	00.00 $\pm$ 00.00	1.90 $\pm$ 3.28	00.00 $\pm$ 00.00	4.70 $\pm$ 4.19	80.00 $\pm$ 11.95	66.25 $\pm$ 15.06	46.67 $\pm$ 23.09	40.00 $\pm$ 10.00



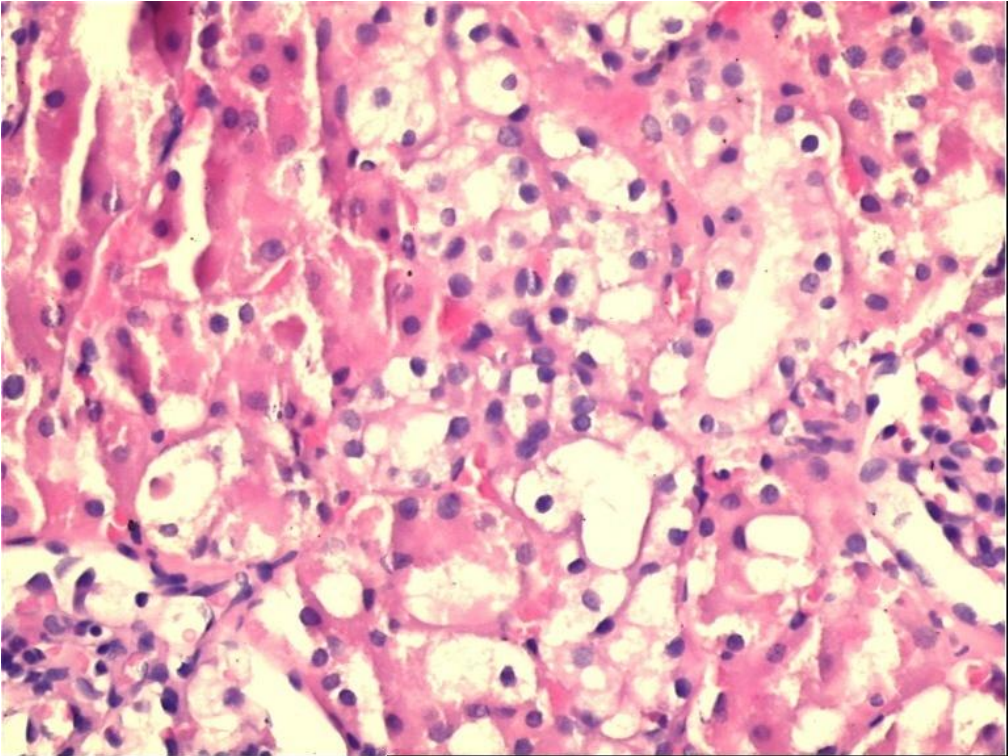
**Şekil 9. 1. gruba ait sıçan böbreğinin normal histolojik görünümü (HEEx100)**



**Şekil 10. 2. gruba ait sıçan böbreğinin histolojik görünümü (HEEx100)**



**Şekil 11. 3. gruba ait sıçan böbreğinin histolojik görünümü (HEx200)**



**Şekil 12. 4. gruba ait sıçan böbreğinin histolojik görünümü (HEx200)**

## TARTIŞMA

Rabdomiyoliz terimi çizgili kasların travmatik veya nontravmatik sebeplere bağı olarak hasara uğraması ve içeriğinin kan dolaşımına katılmasını ifade eder. Rabdomiyoliz sonrası dolaşıma salınan ürünler ezilme sendromuna ve tablonun en önemli komplikasyonlarında biri olan ABY yol açar. Rabdomiyoliz seyri sırasında kompartman sendromu, buna sekonder olarak hipovolemi oluşur ve böbrek kanlanmasını bozar. Hipovolemi, vazokonstriktör hormonlar ve sitokinleri uyararak perfüzyon bozukluğunu artırır. Bunun yanında kaslardan açığa çıkan miyogloblin hem doğrudan toksik etki ile hem de tübüler tıkaç oluşumuna sebep olarak ABY patogeneziine katkıda bulunur (2).

Miyogloblinürik ABY'i oluşturmak amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda, hipertonic gliserol sıçanların arka bacaklarına im olarak enjekte edilmektedir. Gliserol enjeksiyonu ile rabdomiyoliz meydana getirilir, ardından da ABY modeli oluşur (3,4,16,41,43). Gliserol enjeksiyonundan 24 saat önce hayvanları susuz bırakılarak oluşturulan ABY modelinde meydana gelen ilk değişiklikler renal kan akımında ve glomerüler fonksiyonlarda azalma olduğu bildirilmiştir. Enjeksiyondan 6 saat içinde volüm yüklemesi yapılması durumunda oluşan bu değişiklikler iyileştirilebilir ancak 18-20 saat sonra volüm yüklemesi yapılması sonucu renal kan akımı düzelse bile glomerüler filtrasyonda oluşan azalmanın düzelmediği rapor edilmiştir (4,15). Kaslara gliserol enjeksiyonu miyoliz ve hemoliz oluşumuna neden olur. Açığa çıkan miyogloblin ve hemogloblinin parçalanması sonucu ortaya çıkan demir iyonu Haber Weiss ve Fenton reaksiyonlarını katalize ederek serbest radikal oluşumuna, lipid peroksidasyonuna ve böbrek fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (4,21,23). Bu reaksiyon yüksek düzeyde toksik olan süperoksit ve hidrojen peroksidin, bir geçiş elementi olan demir

katalizörlüğünde daha yüksek düzeyde toksik metabolit olan; lipid peroksidasyona neden olan hidroksil radikaline dönüşmesine neden olur (20,21).

Yapılan araştırmalarda ABY patogenezinde oksidatif stresin ve serbest oksijen radikallerinin önemli bir role sahip olduğu bildirilmektedir (51-54). Son yıllarda araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalarda serbest radikaller iskemik ve toksik nedenlerle dolaylı oluşan böbrek hasarının patogenezinde de önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (53,54). Birçok deneysel ve klinik çalışmada çeşitli antioksidan ajanların hem profilaktik hem de tedavi edici etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (15,17,41,51,55). Antioksidan tedavilerin böbrek hasarına karşı klasik ABY tedavilerinin yanında verilebileceğini belirtilmektedir (55).

Gliserol enjeksiyonu ile birlikte görülen miyoliz ve hemoliz sonucu açığa çıkan miyogloblin ve hemogloblin güçlü NO çöpcüleridir. Böylece miyogloblin ve hemogloblinin vazodilatör etkili NO'ü tüketmeleri sonucu renal vazokonstriksiyon oluşur. Ayrıca bu etki hipovolemi ve hipotansiyon durumunda daha belirgin bir hal alır. Ek olarak miyogloblinin salınmasına öncülük ettiği endotoksin ve sitokinlerde renal vazokonstriksiyona katkıda bulunabilir (2,4,55).

PPAR $\gamma$  ligantlarının aktivasyonu lipid ve glukoz metabolizması ile ilgili genler tarafından düzenlenen transkriptör faktörlere bağlıdır (40). PPAR $\gamma$  glukoz homeostazisi, hücrel değişiklikler, lipid ve lipoprotein metabolizmasının ayarlanması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin yanısıra ateroskleroz, inflamasyon, kanser, infertilite, demiyelizasyon gibi patolojik süreçlerde de yer almaktadır. PPAR $\gamma$ , retinoid X reseptörleri ile bağlanarak heterodimer oluştururlar ve ilgili hedef gende PPARE'ni oluştururlar. TZD'lar ise Tip 2 diyabet tedavinde kullanılan sentetik PPAR $\gamma$  ligantlarıdır. Bu gruptaki en güçlü ve seçici ajan rosiglitazondur. Diğer grup üyelerine göre reseptörlere bağlanma afinitesi daha yüksektir (56).

PPAR $\gamma$  aktivasyonu böbrekte nefropatinin önlenmesinde, proteinürinin düşürülmesinde, makrovasküler ve mikrovasküler defektlerin iyileşmesinde, renal oksidatif stresin azaltılmasında, tübül fonksiyonlarının iyileşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (57). PPAR $\gamma$  gen indüksiyonu yoluyla ABY patogenezinde etkiyerek böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği için gliserolle oluşturulan mABY modelinde koruyucu rol üstlenebileceği belirtilmiştir (42,43). Yousefipour ve ark. (41), gliserol ile oluşturulan mABY'de PPAR $\gamma$  aktivatörü ve TZD'lardan biri olan ciglitazonun artan AII ve TXA $_2$  düzeylerini azaltarak ve NO düzeylerini artırarak oksidatif hasarı azalttığı ve böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği rapor edilmiştir.

TZD’lardan biri olan rosiglitazonun deneysel birçok çalışmada antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir (57-62). Ancak daha önce rosiglitazonun deneysel mABY’deki etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda miyoglobürik ABY deneysel modeli kullanılarak rosiglitazonun miyoglobürik ABY üzerine etkileri araştırıldı. Kas içi ve oral olarak FS uygulanan ve sağlıklı kontrol grubu olarak kabul edilen 1. grubun tüm parametreleri bazal olarak alındı. Bu gruptaki deneklerin HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; glomerüllerde, tübülüslerde ve interstisyel alanda belirgin bir patolojik bulguya rastlanmadı.

Rosiglitazonun sağlıklı hayvanlarda etkisinin incelendiği; kas içi FS ve oral olarak rosiglitazon verilen 2. grup ile 1. grup parametreleri karşılaştırıldığında rosiglitazon verilen 2. grup sıçanlarda CAT enzim aktivitesinde artış gözlemlendi. Ancak bu grupta lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeyinde de bir artış görüldü. Serum üre, kreatinin, GSH, NO düzeyinde; SOD, GPx enzim aktivitelerinde ve histopatolojik bulgular arasında anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Jo ve ark. (63), hücre kültüründe PPAR $\gamma$  aktivasyonunun CAT enzim aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir. Bu bulgu çalışmamızın bu grubunda CAT enzim aktivitesinde görülen artış ile uyumluluk göstermektedir. Şener ve ark. (62), sıçanların sırt bölgesinde oluşturulmuş yanık modelinde kontrol grubuna 4 mg/kg dozunda intraperitoneal rosiglitazon verilen sıçanların böbrek karaciğer ve akciğer doku MDA, GSH, üre kreatinin düzeylerinde anlamlı bir farklılık olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda MDA düzeyinde artış görülmesinin sebebi rosiglitazonun verilme yolu veya zamanına bağlı olabilir.

Kas içi gliserol uygulanarak miyoglobürik ABY geliştirilen ve oral FS verilen 3. grup sıçanlarda, 1. grup ile karşılaştırıldığında MDA, P<sub>üre</sub>, P<sub>krea</sub> düzeylerinde artma; GPx enzim aktivitesinde, NO ve GSH düzeylerinde istatistiksel olarak azalma gözlemlendi. CAT ve SOD enzim aktivitesindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. 3. gruptaki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; korteksteki proksimal tübül epitelinde %100’e varan oranlarda nekroza rastlandı (tübül nekroz ortalama  $80.00 \pm 11.95$ ). Distal tübülde kast şeklinde dens proteinöz madde birikimi (tübül nekroz ortalama  $66.25 \pm 15.06$ ) yoğun bir şekilde izlendi. Tübüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Distal tübül hücrelerinde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon dikkati çekti (Şekil 11). Daha önce laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarda üre ve kreatinin düzeylerinin arttığı; CAT, SOD, GPx enzim aktivitelerinin azaldığı; MDA düzeyinin arttığı görüldü. Ayrıca böbrek kesitlerinin ışık mikroskopundaki görüntülerinde yoğun şekilde tübül nekroz ve kast görüldü. Bu gruptaki bulgularımız daha önce laboratuvarımızda yapmış olduğumuz

çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu grupta 2 sıçanın ölmesi de daha önceki çalışmalarımızda gliserol enjeksiyonundan sonra görülen ölümler ile benzerlik göstermektedir (64,65-67). Chander ve ark. (20), gliserol enjeksiyonundan sonra böbrek glomerüler fonksiyonlarının bir göstergesi olan üre ve kreatinin düzeylerinin arttığı; CAT, SOD, GR enzim aktivitelerinin ve glutatyon düzeylerinde azalma olduğu, MDA düzeyinde anlamlı artma olduğu bildirilmiştir. Histolojik kesitlerde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise tübüler nekroz, hemorajik kast, hiyalin kast oluşumları olduğu gösterilmiştir. Singh ve ark. (26), birçok çalışmada gliserol enjeksiyonu ile oluşturulan ABY modelinde böbrek fonksiyonlarının bozulduğunu lipid peroksidasyonun arttığını ve antioksidan kapasitenin azaldığını rapor etmiştir.

Çalışmamızda kas içi gliserol uygulanarak miyoglobürik ABY geliştirilen ve gliserol enjeksiyonundan 1 ve 24 saat sonra rosiglitazon verilen 4. grupta 24 saat dolmadan 7 sıçan gelişen komplikasyonlarla öldü. Bu grupta kalan 3 denekten elde edilen bulgularımız gruplar arasında istatistiksel olarak farklılığın olup olmadığını tespit etmek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Düzeltme sonrası anlamlılık sınır değeri  $p < 0.0125$  olarak saptandı. Bu grupta antioksidan enzimlerin aktivitelerinde; MDA, NO, GSH,  $P_{krea}$  düzeylerinde; nekroz ve kast miktarını 3. grup ile karşılaştırdığımızda anlamlı düzeyde fark olmadığı görüldü. Sadece  $P_{üre}$  düzeyinde anlamlı azalma gözlemlendi. 4. gruptaki sıçanların HE boyalı böbrek kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; 3. gruba oranla proksimal tübül epitelinde nekroz ve distal tübülde proteinöz birikimlerde azalma görüldü. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (tübüler nekroz ortalama  $\%46.67 \pm 23.09$ , distal tübül proteinöz birikimleri ortalama  $\%40.00 \pm 10.00$ ). Tübüllerde belirgin bir dilatasyon vardı. Tübüler hücrelerde hidropik sitoplazmik şişme ve vakuolizasyon görüldü. Glomerüllerde bir değişiklik görülmedi. Peritübüler stromada ödem ve vasküler yapılarda konjesyon mevcuttu. Şener ve ark. (62), sıçanların sırt bölgesinde yanık oluşturdukları deneysel modelde rosiglitazon tedavisinin böbrek, karaciğer, akciğerde artan MDA düzeyini azalttığını; azalmış GSH düzeyini de artırarak antioksidan etki gösterdiğini rapor etmiştir. Villages ve ark. (56), mide iskemik-reperfüzyon hasarında rosiglitazon tedavisinin GPx aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığını ancak SOD enzim aktivitesini artırdığını rapor etmiştir. Sommer ve Wolf'un in vitro çalışmalarında sığır böbrek tübül epitel hücrelerinde hidrojen peroksidin oluşturmuş olduğu oksidatif hasar üzerinde kısa süreli rosiglitazon tedavisinin etkili olmadığı ancak rosiglitazonun uzun süreli tedavisinin koruyucu olduğu rapor edilmiştir (61). Yi ve ark. (59), rosiglitazonun farelerde travmatik beyin hasarına karşı koruyucu rol oynadığını SOD ve CAT

enzim aktivitesini artırdığını bildirilmiştir. Efrati ve ark. (60), sol nefrektomi sonrası 2 hafta süreyle 5 mg/kg dozunda içme suyuna konularak rosiglitazon tedavisi uygulanması sonucu sağ böbrek korteksinde NO düzeyinde değişiklik olmadığını buna karşın rosiglitazon tedavisinin böbrek medulla NO düzeyini artırdığını rapor etmişlerdir. Chaudhry ve ark. (69), alloksan ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda 30 mg/kg dozunda, 30 gün boyunca uygulanan rosiglitazon tedavisinin böbreklerde GSH düzeyini, SOD, CAT, GPx aktivitesini artırdığını; lipid peroksidasyon düzeyini ise azalttığını rapor etmişlerdir. Bao ve ark. (58), sıçanlarda streptozotosin ile oluşturulan diyabetik nefropatide 5 ve 20 mg/kg dozunda, 4 hafta süreyle, günlük olarak uygulanan rosiglitazon tedavisinin glomerülda serbest radikaller tarafından oluşturulan hasarı engellediğini; düşük dozda rosiglitazonun MDA düzeyi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan, yüksek düzeyde rosiglitazonun ise anlamlı düzeyde azalttığını rapor etmiştir. Düşük dozda rosiglitazon tedavisiyle SOD ve GPx enzim aktivitelerinin de anlamlı düzeyde artmadığı; yüksek dozda rosiglitazon tedavisi ile anlamlı düzeyde arttığı rapor edilmiştir.

Yukarıda özetlenen daha önce yapılmış çalışmalarda rosiglitazonun birçok deneysel modelde koruyucu rol oynadığı bildirilmektedir. Ancak çalışmamızda elde edilen biyokimyasal ve histolojik bulgular ile rosiglitazon tedavisi verilen ABY grubu sıçanlarda yüksek oranda ölüm görülmesi rosiglitazonun miyoglobinürik ABY’inde iyileşme sağlamadığını ve hatta patogenezi daha da kötüleştirdiğini düşündürmektedir.

Hipertonik gliserolün im verilmesiyle oluşturulan miyoglobinürik ABY modelinde rosiglitazonun etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışma sonuçlarımızın daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olmaması; rosiglitazonun dozu, verilme yolu, verilme zamanı, verilme sürelerindeki farklılıklar ve deneysel miyoglobinürik ABY oluşum mekanizmasında etkili faktörlerin diğer deneysel modellerden farklı olmasına bağlı olabilir.

Hipertonik gliserolün im verilmesi ile oluşturulan miyoglobinürik ABY’nin oluşumunda önemli olan faktör renal hipoperfüzyonun nedeni olarak hipovolemi yanında başka etkenlerin de rol oynamasıdır. Miyoliz sonucu kaslardan salınan vazokonstriktör sitokinlerle, miyoliz ve hemoliz sonucu dolaşıma salınan hem proteinlerinin böbrek kanlanmasında önemli rolü olan renal NO’i tüketmesi en önemli etkenlerdir. TZD’ların birçok çalışmada böbreklerin su ve Na atılımını azaltarak periferik ödem oluşturdukları bildirilmiştir (70). Üç gün süreyle sıçanlara rosiglitazon verildikten sonra idrar atılımının %22 oranda, idrar Na atılımının %44 oranında azaldığı rapor edilmiştir (71). Yang ve ark. (72), rosiglitazonun



GFR'nın bir göstergesi olan kreatinin klirensini de %35 oranında azalttığını bildirmişlerdir. Guan ve ark. (73), farelerde rosiglitazon tedavisinin plazma volümünü %32,2 oranında artırdığını bildirmişlerdir.

Rosiglitazonun farklı deneysel ABY modellerinde koruyucu rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise rosiglitazonun deneysel miyoglobinürik ABY'nde iyileştirici etkisinin olmadığı ve hatta patogenezi daha da ağırlaştırdığı gözlenmiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz bulguları literatür bilgileri ile birlikte değerlendirdiğimizde; rosiglitazonun bu modeldeki olumsuz etkilerinin görülmesinde bazı faktörler rol oynayabilir. Rosiglitazonun periferik ödeme sebep olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (70-73). Rosiglitazonun bu etkisinin kaslarda oluşan ödem daha da artırarak, hipovolemiyi şiddetlendirebilir. Şiddetli hipovoleminin de renal vazokonstriksiyonu artırarak mABY patogenezi daha da ağırlaştırdığını ve buna bağlı olarak rosiglitazonun yararlı etkilerinin görülmediği öne sürülebilir.

Bütün bu bulgular ve gözlemler, deneysel mABY modelinde rosiglitazon tedavisi uygulanması sonucu iyileşme görülmediğini hatta patogenezinin daha da kötüleştiğini göstermektedir ancak çalışmamız oluşan olumsuz etkinin mekanizmasını kesin olarak göstermede yetersiz kalmaktadır. Bu konuda rosiglitazonun dozu, veriliş yolu, verilme zamanı ve verilme sürelerinde yapılacak düzenlemeler ile renal kan akımı ile böbrek su ve sodyum tutulumunun periferik ödem oluşumunda etkisini araştıran daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

## SONUÇ

Çalışmamızda hipertonic gliserolün im verilmesiyle oluşturduğumuz miyoglobinürik ABY'de rosiglitazonun antioksidan enzimlere; MDA, NO, GSH, P<sub>üre</sub>, P<sub>krea</sub> düzeylerine etkilerini inceledik. Sonuçlar incelendiğinde;

1. ve 2. grup arasında MDA düzeyinde, CAT enzim aktivitesinde artma gözlemlendi.

1. ve 3. grup arasında MDA, P<sub>üre</sub>, P<sub>krea</sub> düzeylerinde artma; GPx enzim aktivitesinde, NO ve GSH düzeyinde arasında azalma gözlemlendi.

3. ve 4. grup arasında, P<sub>üre</sub> düzeylerinde azalma gözlemlendi. Böbrek kesitleri ışık mikroskopisinde incelendiğinde; nekroz ve kast miktarında anlamlı fark olmadığı görüldü. Çalışma sürecimizde 3. grupta 2 sıçan 48 saat dolmadan gelişen komplikasyonlar sonucu öldü. 4. grupta ise rosiglitazonun verilmesinin ardından 24 saat içinde 7 sıçan öldü.

Bu sonuçlar ışığında, rosiglitazonun hipertonic gliserolün im verilmesiyle oluşturulan miyoglobinürik ABY üzerindeki etkilerinin olumsuz olduğu görülmüştür. Rosiglitazonun bu modelde oluşturduğu etki mekanizmasının açığa çıkarılması amacıyla daha kapsamlı ve ayrıntılı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

## ÖZET

### DENEYSEL MİYOGLOBİNÜRİK AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİNDE ROSİGLİTAZONUN ETKİLERİ

**Gülçin GÖK**

Miyoglobinürük akut böbrek yetmezliği, travmaya bağlı ya da travma dışı nedenlerle iskelet kaslarının hasara uğraması sonucu meydana gelen üremik bir sendromdur. Serbest radikallerin ve nitrik oksidin miyoglobinürük akut böbrek yetmezliği patogeneğinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Rosiglitazonun antioksidan etkiye sahip olduğu ve nitrik oksit düzeyini arttırdığı rapor edilmektedir. Çalışmamızda rosiglitazonun deneysel miyoglobinürük akut böbrek yetmezliğinde etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda; 250-300 g ağırlığında, 4 grupta 10'ar adet olmak üzere 40 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanıldı. 1. ve 2. grup sıçanlara fizyolojik serum (FS) enjeksiyonu, diğer gruplara im gliserol enjeksiyonu yapılmadan 24 saat önce susuz bırakıldı. İlk enjeksiyondan sonra serbest diyet ve su alımı sağlandı. 1. ve 2. grup sıçanlara FS; 3. ve 4. gruplardaki sıçanlara %50'lik gliserol solüsyonundan 10 ml/kg'a göre bulunan toplam hacim eşit miktarlarda her iki arka bacak kaslarına enjekte edildi. 2.ve 4. gruba ise 4 mg/kg dozunda rosiglitazon; 1. ve 3. gruba ise 4 mg/kg dozunda rosiglitazona göre bulunan hacim oral yolla verilmiştir. Gliserol enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların rompun-ketamin anestezisi

altında kan ve böbrekleri alındı. Böbrek dokusunda süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri, glutatyon, nitrik oksit, malondialdehit, plazmada üre, kreatinin düzeyleri ile böbrekte histopatolojik değişiklikler incelendi.

Çalışmamızın bulguları sonucunda 3. ve 4. grup arasında plazma üre düzeyinde azalma sağlanmış ancak süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerinde; glutatyon, nitrik oksit, malondialdehit, plazmada kreatinin düzeylerinde; nekroz ve kast oranlarında fark görülmemiştir. 4. grupta görülen ölüm sayısı 3. gruba göre daha yüksekti. Bu sonuçlar göz önüne alındığında rosiglitazonun mABY patogenezi üzerinde olumsuz etkileri olduğu görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Rosiglitazon, Miyoglobininürik Akut Böbrek Yetmezliği, Serbest Radikaller, Nitrik Oksit, Antioksidan Enzimler.

## **SUMMARY**

### **THE EFFECTS OF ROSIGLITAZONE AT EXPERIMENTAL MYOGLOBINURIC ACUTE RENAL FAILURE**

**Gülçin GÖK**

Myoglobinuric acute renal failure is a uremic syndrome which occurs when muscle skeleton is damaged due to traumatic or nontraumatic reasons. It is demonstrated that free radicals and nitric oxide play an important role in pathogenesis of myoglobinuric acute renal failure. It is reported that rosiglitazone has antioxidant effects and increases the level of nitric oxide. We aimed to study the effects of rosiglitazone in experimental myoglobinuric acute renal failure.

In our study, 4 groups of Wistar Albion male rats (n=10), 250-300 g, were used. 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups were kept waterless for 24 hours before the injection of saline as well as glycerol injected groups. After the first injection, free diet and drinking water were provided. 10 ml/kg (50%) glycerol solution were injected to both back legs muscles in equal quantity for 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups. Rosiglitazone was given to 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> groups in 4 mg/kg doses. After 48 hours later from the injection of glycerol, blood samples and kidney tissues of rats were taken under the anesthesia with rompun/ketamine. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase enzyme activities; nitric oxide, glutathione, malondialdehyde levels at kidney tissue and plasma urea, creatinine levels and the renal histopathological changes are examined.

As a result, there was a decrease in the plasma urea levels between 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups. However, we could not find any significant difference in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase enzyme activities; nitric oxide, glutathione and malondialdehyd, plasma urea and creatinine levels; renal tissue necrosis and cast percentage. In 4<sup>th</sup> group, observed death number was more than 3<sup>rd</sup> group. In the light of these findings, we can conclude that rosiglitazone may have some negative effects on myoglobinuric acute renal failure.

**Key words:** Rosiglitazone, Myoglobinuric Acute renal failure, Free radicals, Nitric oxide, Antioxidant enzyme

## KAYNAKLAR

1. Glassok RJ, Massry SG, Humes HD. Diagnosis, Clinical presentation, and management. Massry SG, Glassok RJ (Eds). Massry And Glassok's The Textbook of Nephrology. 4<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Caurier Wesford; 2001; 48(2) 968-77
2. Sever MŞ. Crush (ezilme) sendromu ve Marmara depreminden çıkarılan dersler. İstanbul: Türk Nefroloji Derneği Yayınları, 2002; 13-74.
3. Aydogdu N. Sıçanlarda deneysel miyoglobinürik akut böbrek yetmezliğinde melatoninin etkileri. Edirne. Trakya Üniversitesi; 2003.
4. Singh D, Chander V, Chopra K. Catechin. A natural antioxidant protects against rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure. Pharmacol Res 2003; 48:503-9.
5. Touyz RM, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implication. Vascul Pharmacol 2006; 45:19-28.
6. İnan M, Basaran Ü, Dökmeci D, Kanter M, Yalçın M, Aydoğdu N, Turan N. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, prevents contralateral testicular ischaemia-reperfusion injury in prepubertal rat. Cli Exp Pharmacol Physiol 2007; 34:457-61.
7. Iglesias P, Diez JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist in renal disease. Eur J Endocrinol 2006; 154:613-21.
8. Akpolat T, Ulaş C, Süleymanlar G. Nefroloji el kitabı. Nobel tıp kitabevleri 2000:249-67.
9. Lameire N. The pathophysiology of acute renal failure. Crit Care Clin 2005; 21: 197-210.
10. Thathanı R, Pascual M, Bonventre J V, PH.D. Acute renal failure. N Engl J Med 1996; 1448-60.

11. Bonventre JV, Shah SV, Walker PD, Humphreus MH. Acute renal failure: Ischemic, toxic, other. In: Jacobson HR, Striker GE, Klahr S (Eds.). The principles and practice of nephrology. 2<sup>nd</sup> ed. St Louis: Mosby-Year Book Inc., 1995: ch. 86, 564-76.
12. Sever MŞ. Doğal Afetler Sonrasında Oluşan Crush (Ezilme) Yaralanmaları: Marmara Depremi Deneyimi. *Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar* 2007; 55:29-42.
13. Bagley WH, Yang H, Shah KH. Rhabdomyolysis. *Intern Emrgy Med* 2007; 2:210-8.
14. Vanholder R, Sever MŞ, Erek E, Lameire N. Rhabdomyolysis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1553-61.
15. Singh D, Chander V, Chobra K. Carvedilol, an Antihypertensive Drug with Antioxidant Properties, Protects against Gliserol-Induced Acute Renal Failure. *Am J Nephrol* 2003; 23:415-21.
16. Ishizuka S, Nagashima Y, Numata M, Yano T, Hagiwara K, Ozasa H, et al. Regulation and immunohistochemical analysis of stress protein heme oxygenase-1 in rat kidney with myoglobinuric acute renal failure. *Bioc Biop Res Com* 1997; 240:93-8.
17. Chander V, Chopra K. Molsidomine, a nitric oxide donor and L-arginine protects against rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure. *Biochim Biophys Acta* 2005; 25:1723(1-3):208-14.
18. David W, PhD. Myoglobinuria. *Neurol Clin* 2000; 1(18):215-233.
19. Malinoski DJ, Sltter MS, Mullins RJ. Crush Injury and Rhabdomyolysis. *Crit Care Clin* 2002; 20(1):171-92.
20. Visweswaran P, Guntupalli J. Rhabdomyolysis. *Crit Care Clin* 1999; 15(2):415-28.
21. Hold SG, Moore KP. Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. *Intensive Care Med* 2001; 27:803-11.
22. Mayeux PR, Ueda N, Shah SV. Role of toxic oxygen radikal in glomerular injury. In: Massry SG, Glassok RJ (Eds.). *Massry And Glassok's The Textbook of Nephrology*. 4<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Caurier Wesford; 2001; 37(7) 634-8.
23. Abassi ZA, Hoffman A, Better OS. Acute renal failure complicating muscle crush injury. *Semin Nephrol* 1998; 5(18):558-65.
24. Nath KA. Pathogenesis. In: Massry SG, Glassok RJ (Eds.). *Massry And Glassok's The Textbook of Nephrology*. 4<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Caurier Wesford; 2001; 48(1) 956-68.
25. Schechter AN, Gladwin MT. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *The N Engl J Med* 2003; 348:1483-6.
26. Özkan M, Yükseköğlü M. Nitrik oksit ve akciğer. *Toraks Dergisi* 2003; 4(1):88-94.



27. Chatzizisis YS, Misirli G, Hatzitolios AI, Ginnoglou GD. The syndrome of rhabdomyolysis: complications and treatment. *Eur J Int Med* 2008; 19:568-74.
28. Karataş Y. Endotel ve nitrik oksid (NO). Şan M (Editör). Yaşamın gizli gücü endotel ve sistemlerimiz. İstanbul: Printaş Basım AŞ; 2005: 2:33-41.
29. Davis KL, Martin E, Turko IV, Muard F. Novel effect of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:203-36.
30. Önder R, Barutçu B. Endotel. 2.baskı. İstanbul: Levent Ofset Basım AŞ; 2007:1-20.
31. Valdivielso JM, Lopez-Novoa JM, Eleno N, Barriocanal FP. Role of glomerular nitric oxide in glycerol-induced acute renal failure. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78:476-82.
32. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11:336-41.
33. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza yayınları, 1995: 1-73.
34. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin In Nephrol Hypertens* 2006; 15:72-7.
35. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4:92-3.
36. Konukoğlu D. Serbest radikaller ve önemleri. *Aile Hek Derg* 1997; 1(4):197-200.
37. AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 342-6.
38. Seven A, Candan G. Radikal ve lipid peroksid düzeyini arttıran etkenler. *Biyokimya Der* 1995; 20(4):43-56.
39. Sarıfakıoğlu E, Erdal E. Dermatolojide güncel bir konu: Perokzizom proliferatör-aktive reseptörleri. *Dermatose* 2005; 4(3):122-6.
40. Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassegue B, Griendling K K, Dikalov S, Hart C M. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:899-905.
41. Yousefipour Z, Hercule H, Truong L, Oyekan A, Newaz M. Ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma inducer, ameliorates renal preglomerular production and activity of renal angiotensin II and thromboxane A<sub>2</sub> in glycerol-induced acute renal failure. *JPET* 2007; 322:461-8.
42. Newaz M, Yousefipour Z, Oyekan A. Role of PPAR- $\gamma$  on pathogenesis and vascular changes in glycerol-induced acute renal failure. *Pharmacol Res* 2006; 54(3):234-40.
43. Yousefipour Z, Hercule H, Oyekan AO, Newaz MA. Antioxidant U74389G improves glycerol-induced acute renal failure without affecting PPAR $\gamma$  gene. *Ren Fail* 2007; 29:903-10.

44. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
45. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-8.
46. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82:70–7.
47. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34:497–550.
48. Aebi H. Catalase invitro assay methods. *Methods in Enzymology* 1984; 105:121-6.
49. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70:158-69.
50. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36:1440-3.
51. Korner JL, Ali RS, Murray PT. Antioxidants. *Nephron Exp Nephrol* 2008; 109:109-17.
52. Guidet B, Shah SV. Enhanced in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by rat kidney in glycerol-induced renal failure. *Am J Physiol* 1989; 257:440-5.
53. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kid Dis.* 1997; 29(3):465-77.
54. Zager RA. Pathogenetic mechanisms in nephrotoxic acute renal failure. *Semin Nephrol* 1997; 17(1):3-14.
55. Polo-Romeo FJ, Fernandez-Funez A, Viana LB, Atienza MP, Gascon FS. Effect of N-acetylcysteine on antioxidant status in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail* 2004; 26(6):613-8.
56. Villegas I, Martin AR, Toma W, Lastra CA. Rosiglitazon, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rat: rol of oxygen free radikals generation. *Eur J Pharmacol* 2004; 505:195-203.
57. Dobrian AD. The complex role of PPAR $\gamma$  in renal dysfunction in obesity: managing a Janus-faced receptor. *Vascul Pharmacol* 2006; 45:36–45.
58. Bao Y, Jia R, Yuan J, Li J. Rosiglitazon ameliorates Diabetic Nephropathy by inhibiting reactive oxygen species and its downstream-signaling pathway. *Pharmacology* 2007; 80:57,64.
59. Yi JH, Park SW, Brooks N, Lang BT, Vemuganti R. PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazon is neuroprotective after traumatic brain injury via anti inflammatory and anti-oxidative mechanism. *Brain Res* 2008; 1244: 164-72.

60. Efrati S, Berman S, Chachashvili A, Cohen N, Averbukh Z, Weissgarten J. Rosiglitazon treatment attenuates expression of inflammatory hallmarks in remaining kidney following contralateral nephrectomy. *Am J Nephrol* 2008; 28:238-45.
61. Sommer M, Wolf G. Rosiglitazon Increases PPAR $\gamma$  in renal tubular epithelial cell and protects against damage by hydrogen peroxide. *Am J Nephrol* 2007; 27:425-34.
62. Şener G, Şehirli AÖ, Gedik N, Dülger GA. Rosiglitazon, A PPAR- $\gamma$  ligand, protects against burn-induced oxidative injury of remote organs. *Burns* 2007; 33:587-93.
63. Jo SH, Yang C, Miao Q, Marzec M, Wasik MA, Lu P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  promotes lymphocyte survival through its action on cellular metabolic activities. *J Immunol* 2006; 177:3737-45.
64. Gürel EE. Sıçanlarda deneysel miyoglobinürik akut böbrek yetmezliğinde sarımsağın etkileri. Edirne: Trakya Üniversitesi; 2008.
65. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, Taskiran R, Tastekin E, Kaymak K. Protective effects of L-Carnitine on myoglobinuric acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol* 2006; 33:119-24.
66. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, Batçioğlu K, Kaymak K. Effects of caffeic acid phenethyl ester on glycerol-induced acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31(9):575-9.
67. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, Batçioğlu K, Kaymak K. Effects of exogenous melatonin on myoglobinuric acute renal failure in the rats. *Ren Fail* 2004; 26(5):479-86.
68. Singh D, Chander V, Chopra K. Protective effect of naringin, a bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. *Toxicology* 2004; 201:143-51.
69. Chaudhry J, Ghosh NN, Roy K, Chandra R. Antihyperglycemic effect of a new thiazolidinedione analogue and its role in ameliorating oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Life Sciences* 2007; 80:1135-42.
70. Yang T, Soodvilai S. Renal and vascular mechanisms of thiazolidinedione-induced fluid retention. *PPAR Res*; 2008; 2008.
71. Song J, Knepper MA, Hu Xingun, Verbalis JG, Ecelbarger CA. Rosiglitazone activates renal sodium- and water-reabsorptive pathways and lowers blood pressure in normal rats. *The J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308:426-33.
72. Yang B, Clifton LG, McNulty JA, Chen L, Brown KK, Bear PG. Effect of PPAR  $\gamma$  agonist G1262570, on renal filtration fraction and nitric oxide level in conscious rats. *J Cardiovasc pharmacol* 2003; 40(3):436-41.

73. Guan Y, Hua C, Cha DR. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR  $\gamma$  stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med* 2005; 11(8):861-6.

## RESİMLEMELER LİSTESİ

### ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Gruplara göre MDA düzeyleri dağılımı	34
Şekil 2: Gruplara göre GSH düzeyleri dağılımı	35
Şekil 3: Gruplara göre SOD enzim aktivitelerinin dağılımı	36
Şekil 4: Gruplara göre GPx enzim aktivitelerinin dağılımı	37
Şekil 5: Gruplara göre CAT enzim aktivitelerinin dağılımı	38
Şekil 6: Gruplara göre doku NO düzeyleri dağılımı	39
Şekil 7: Gruplara göre P <sub>üre</sub> düzeyleri dağılımı	40
Şekil 8: Gruplara göre P <sub>kreatin</sub> düzeyleri dağılımı	41
Şekil 9: 1. grubun böbrek kesiti (HEx100)	44
Şekil 10: 2. grubun böbrek kesiti (HEx100)	44
Şekil 11: 3. grubun böbrek kesiti (HEx200)	45
Şekil 12: 4. grubun böbrek kesiti (HEx200)	45

### TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: SOD tayin yöntemi	25
Tablo 2: 1. grubun biyokimyasal verileri	31
Tablo 3: 2. grubun biyokimyasal verileri	31
Tablo 4: 3. grubun biyokimyasal verileri	32
Tablo 5: 4. grubun biyokimyasal verileri	32
Tablo 6: Çalışma gruplarının değişkenlerine ait istatistik verileri	33
Tablo 7: MDA düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları	34
Tablo 8: GSH düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları	35
Tablo 9: SOD aktivitelerinin Mann-Whitney U testi sonuçları	36
Tablo 10: GPx aktivitelerinin Mann-Whitney U testi sonuçları	37
Tablo 11: CAT aktivitelerinin Mann-Whitney U testi sonuçları	38
Tablo 12: Doku NO düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları	39
Tablo 13: Plazma üre düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları	40
Tablo 14: Plazma kreatinin düzeylerinin Mann-Whitney U testi sonuçları	41
Tablo 15: Grupların histopatolojik nekroz ve kast miktarlarının % olarak değerleri	43

## ÖZGEÇMİŞ

Denizli’de 1980 yılında doğdum. İlk öğrenimimi 1992 yılında Denizli Dumlupınar Paşa İlkokulu’nda, orta öğrenimimi 1995 yılında Çivril Lisesi orta bölümünde, lise öğrenimimi 1998 yılında Denizli Anafartalar Süper Lisesi’nde, yüksek öğrenimimi 2003 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu’nda tamamladım.

2006 Güz yarısında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım.

## **EKLER**

# EK-1

T.C.

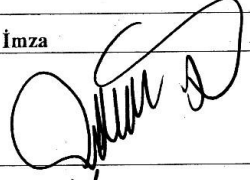
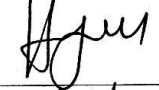
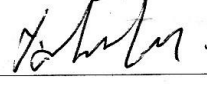
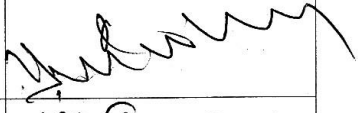

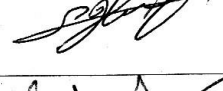
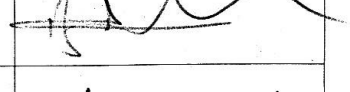
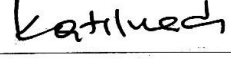
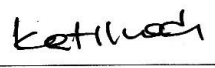
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 06

Karar Tarihi: 12.11.2007

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Nurettin AYDOĞDU'nun yaptığı ve yüksek lisans öğrencisi Gülçin GÖK'ün tez çalışması olarak planlanan TÜHDYEK-2007/013 protokol nolu "Deneysel miyoglobunirik akut böbrek yetmezliğinde rosiglitazonun etkileri" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü, araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Gülay DURMUŞ-ALTUN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Başkan	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Dilek MEMİŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	