

**ETORİKOKSİBİN SIÇANLARDA  
BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ**

**Bahadır SÜLEYMAN**

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK**

**Doktora Tezi – 2014**

**T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETORİKOKSİBİN SIÇANLARDA  
BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON  
HASARINA ETKİSİ**

**Bahadır SÜLEYMAN**

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK**

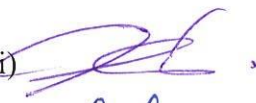
**ERZURUM  
2014**


T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

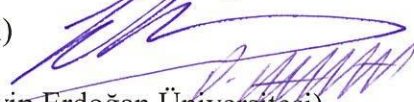
**ETORİKOKSİBİN SIÇANLARDA BÖBREK  
İSKEMİ-REPERFÜZYON  
HASARINA ETKİSİ**


**Bahadır SÜLEYMAN**


**Tez Savunma Tarihi:** 17.02.2014

**Tez Danışmanı** : Doç. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK (Atatürk Üniversitesi) 

**Jüri üyesi** : Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU (Atatürk Üniversitesi) 

**Jüri üyesi** : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi) 

**Jüri üyesi** : Yrd. Doç. Dr. Durdu ALTUNER (Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi) 

**Jüri üyesi** : Yrd. Doç. Dr. Erol AKPINAR (Atatürk Üniversitesi) 

**Onay**

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr.

**Yavuz Selim SAĞLAM**

Enstitü Müdürü 

**Doktora Tezi  
ERZURUM - 2014**

# İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>IV</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VII</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>IX</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>XI</b>
<b>TABLolar DİZİNİ.....</b>	<b>XII</b>
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	3
2.2. Siklooksijenaz.....	13
2.3. Böbrekte COX Enzimlerinin Fonksiyonu.....	14
2.4. COX-2 Selektif İnhibitörü Non-Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar.....	16
2.4.1. Antiinflamatuvar Etki Mekanizmaları.....	17
2.4.2. Kullanıldığı Yerler.....	17
2.4.3. Yan Tesirler.....	17
2.4.4. Rofekoksib ve Selekoksib.....	18
2.4.5. Etorikoksib, Valdekoksib, Parekoksib ve Lumirakoksib.....	18
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>21</b>
3.1. Deney Hayvanları.....	21
3.2. Genel Prosedür.....	21
3.3. Deneyin Yapılışı.....	21
3.3.1. Cerrahi ve Farmakolojik İşlemler.....	21
3.4. Kullanılan Alet ve Kimyasal Maddeler.....	22
3.5. Böbrek Dokusunun Biyokimyasal Analizi.....	25

3.5.1. Numunelerin Hazırlanması.....	25
3.6. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini.....	25
3.6.1. Malondialdehit (MDA) Tayin.....	25
3.6.2. Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini.....	25
3.6.3. Total Glutatyon (tGSH) Tayini.....	25
3.7. COX Aktivite Analizi.....	26
3.8. Reaktiflerin Hazırlanması.....	26
3.8.1. Analiz Tamponu.....	26
3.8.2. Hem Reaktifi.....	26
3.8.3. Araşidonik Asit Çözeltisi.....	26
3.9. Deneyin Yapılışı.....	26
3.10. İmmunohistokimyasal İşlemler.....	27
3.11. İstatistiksel Analizler.....	28
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>30</b>
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	30
4.1.1. MDA Analiz Sonuçları.....	30
4.1.2. MPO Analiz Sonuçları.....	32
4.1.3. tGSH Analiz sonuçları.....	33
4.1.4. COX-1 Analiz Sonuçları.....	34
4.1.5. COX-2 Analiz Sonuçları.....	36
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	37
4.2.1. RİR Sıçan Grubu Böbrek Hücreleri.....	37
4.2.2. ETO-50 Sıçan Grubu Böbrek Hücreleri.....	39
4.2.3. ETO-100 Sıçan Grubu Böbrek Hücreleri.....	41
4.2.4. SG Sıçan Grubu Böbrek Hücreleri .....	43

<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>52</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>53</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>71</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>71</b>
<b>EK-2. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ONAY FORMU.....</b>	<b>72</b>

## TEŞEKKÜR

Siz değerli hocalarıma sunmuş olduğum bu doktora tez çalışmamı, bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını eksik etmeyen tez danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK' a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarım, Sayın Prof. Dr. Fatma GÖÇER ve Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU' na, hem yüksek lisans hem de doktora eğitimim boyunca örnek aldığım, tezimi yazarken ve şekillendirirken yardımlarını eksik etmeyen babam Sayın Prof. Dr. Halis SÜLEYMAN ve Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Sayın, Prof. Dr. Zekai HALICI, Yrd. Doç. Dr. Erol AKPINAR, Yrd. Doç. Dr. Beyzagül POLAT, Farmakoloji akademisyeni ve personeline, bu yoğun çalışma dönemimde her konuda yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Durdu ALTUNER, Yrd. Doç. Dr. Nihal ÇETİN, Dr. Renad MAMMADOV'a, hayatımın her döneminde yanımda olan sevgili aileme, destek ve yardımlarıyla sevgili eşim Öğr. Gör. Zeynep SÜLEYMAN' a teşekkür ederim.

**Bahadır SÜLEYMAN**

## ÖZET

### Etorikoksibin Sıçanlarda Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarına Etkisi

**Amaç:** Çalışmamızın amacı, Etorikoksibin sıçan böbrek dokusunda iskemi-reperfüzyon (İ/R) ile oluşturulan oksidatif hasara etkisini biyokimyasal ve immunohistokimyasal olarak araştırmaktır.

**Materyal ve Metot:** Albino Wistar türü erkek sıçanlar, renal iskemi-reperfüzyon (RİR), 50 mg/kg etorikoksib+RİR (ETO-50), 100 mg/kg etorikoksib+RİR (ETO-100) ve şam operasyonu uygulanacak sağlıklı gruplara (SG) ayrıldı. Hayvanların ETO-50 grubuna 50 mg/kg etorikoksib, ETO-100 grubuna ise 100 mg/kg etorikoksib oral yoldan verildi. RİR ve SG sıçan gruplarına ise çözücü olarak distile su uygulandı. İlaçlar uygulandıktan bir saat sonra, 25 mg/kg tiyopental sodyum anestezisi altında tüm sıçanların (SG hariç) sol renal arter ve ven damarlarına klips konularak bir saat iskemi, üç saat reperfüzyon sağlandı. Bu süre sonunda çıkartılan böbrekler üzerinde biyokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı.

**Bulgular:** RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG sıçan gruplarının böbrek dokusunda Malondialdehit (MDA) miktarı sırası ile  $17.8 \pm 2.6$ ,  $8.3 \pm 0.5$ ,  $3.1 \pm 0.4$  ve  $1.4 \pm 0.3$   $\mu\text{mol/gr}$  protein olurken, Myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi  $28.5 \pm 2.2$ ,  $12.3 \pm 1.3$ ,  $5.5 \pm 0.7$  ve  $2.6 \pm 0.6$  u/mg protein, Total Glutasyon (tGSH) miktarı ise  $2.6 \pm 0.6$ ,  $6.3 \pm 0.7$ ,  $12.6 \pm 1.2$  ve  $14.1 \pm 1.1$  nmol/gr protein olmuştur. Ayrıca RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarının böbrek dokusunda Siklooksijenaz-1 (COX-1) aktivitesi sırası ile  $7.8 \pm 1.4$ ,  $7.0 \pm 0.8$ ,  $6.6 \pm 0.8$  ve  $8.8 \pm 1.4$  u/mg protein iken, Siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesi ise  $17.6 \pm 1.5$ ,  $4.5 \pm 0.7$ ,  $2.3 \pm 0.5$  ve  $0.7 \pm 0.1$  u/mg protein olarak ölçülmüştür. Ayrıca, MDA ve MPO düzeylerinin yüksek, tGSH miktarının ise düşük bulunduğu böbrek tübül ve glomerül hücrelerinde, Bcl-2'nin yaygınlık ve yoğunluk derecesi daha hafif olmuştur.



**Sonuç:** Etorikoksib doza bağımlı olarak İ/R hasarını anlamlı önlemiştir. Bu alışma sonuçları, etorikoksibin klinikte İ/R hasarının önlenmesinde kullanılabileceğini gösterir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, Bcl-2, iskemi, oksidan, reperfüzyon, sıan.

## ABSTRACT

### Effects of Etoricoxib on Rat Renal Ischemia-Reperfusion Injury

**Aim:** The aim of our study is to investigate the biochemical and immunohistochemical effects of etoricoxib on the oxidative damage created by IR on rat kidney tissue.

**Material and Method:** Albino Wistar male rats were divided into: RIR, ETO-50, ETO-100 and SG groups. 100mg/kg etorikoksib was orally given to ETO-100 groups. Distilled water was given to RIR and SG groups. One hour ischemia and 3 hours reperfusion were provided with performing a surgical procedure to left renal artery and vein vessels on all rats (except for SG group) under the sodium thiopental anesthesia, after 1 hour from the administration of distilled water and etoricoxib. At the end of this procedure, biochemical and immunohistochemical evaluations were performed on kidney tissues.

**Results:** MDA values in kidney tissues of RIR, ETO-50, ETO-100 and SG groups were  $17.8\pm 2.6$ ,  $8.3\pm 0.5$ ,  $3.1\pm 0.4$  and  $1.4\pm 0.3\mu\text{mol/gr}$  protein, while MPO activities were  $28.5\pm 2.2$ ,  $12.3\pm 1.3$ ,  $5.5\pm 0.7$  and  $2.6\pm 0.6\text{u/mg}$  protein and tGSH values were  $2.6\pm 0.6$ ,  $6.3\pm 0.7$ ,  $12.6\pm 1.2$  and  $14.1\pm 1.1\text{ nmol/gr}$  protein respectively. Otherwise, COX-1 activities in the kidney tissues of RIR, ETO-50, ETO-100 and SG groups were  $7.8\pm 1.4$ ,  $7.0\pm 0.8$ ,  $6.6\pm 0.8$  and  $8.8\pm 1.4\text{u/mg}$  protein, while COX-2 activities were respectively determined as  $17.6\pm 1.5$ ,  $4.5\pm 0.7$ ,  $2.3\pm 0.5$  and  $0.7\pm 0.1\text{u/mg}$  protein. MDA and MPO levels were found higher, tGSH level lower in kidney tubules and glomeruli cells while the density and currency of Bcl-2 was lower.

**Conclusion:** Etoricoxib significantly prevented the I/R injury depends on the dose. The results of this study show that etoricoxib can be used in clinics to prevent I/R injury.

**Keywords:** Antioxidant, Bcl-2, ischemia, oxidant, reperfusion, rat.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>8-OHGua</b>	:	8-Hidroksiguaninin
<b>AMP</b>	:	Adenozin Monofosfat
<b>ATP</b>	:	Adenozin Trifosfat
<b>Bcl-2</b>	:	B Hücreli Lenfoma-2
<b>CAT</b>	:	Katalaz
<b>COX</b>	:	Siklooksijenaz
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik Asit
<b>ETO-50</b>	:	50 mg/kg Etorikoksib+Renal İskemi-Reperfüzyon
<b>ETO-100</b>	:	100 mg/kg Etorikoksib+Renal İskemi-Reperfüzyon
<b>GPx</b>	:	Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH-Rd</b>	:	Glutasyon Reduktaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:	Hidrojen Peroksit
<b>IgG</b>	:	İmmüoglobulin G
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	:	İnterlökin-1 $\beta$
<b>İR</b>	:	İskemi-Reperfüzyon
<b>KDH</b>	:	Ksantin Dehidrojenaz
<b>LPS</b>	:	Bakteriyel Endotoksin
<b>MDA</b>	:	Malondialdehid
<b>MPO</b>	:	Myeloperoksidaz
<b>NSAİİ</b>	:	Non-Steroidal Antiinflamatuvar İlaç
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	:	Süperoksit
<b>OH-</b>	:	Hidroksil
<b>PNL</b>	:	Polimorfonükleer Lökositler
<b>RİR</b>	:	Renal İskemi-Reperfüzyon

<b>SG</b>	:	Sağlıklı Grup
<b>SOD</b>	:	Süperoksit Dismutaz
<b>SOR</b>	:	Serbest Oksijen Radikalleri
<b>tGSH</b>	:	Total Glutasyon
<b>TxA2</b>	:	Tromboksan A <sub>2</sub>
<b>XO</b>	:	Ksantin Oksidaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
<b>Şekil 4.1.</b>	Sıçan Böbrek Dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG Gruplarında MDA Düzeyleri.....	31
<b>Şekil 4.2.</b>	Sıçan Böbrek Dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG Gruplarında MPO Aktiviteleri.....	32
<b>Şekil 4.3.</b>	Sıçan Böbrek Dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG Gruplarında tGSH Düzeyleri.....	33
<b>Şekil 4.4.</b>	Sıçan Böbrek Dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG Gruplarında COX-1 Aktiviteleri.....	35
<b>Şekil 4.5.</b>	Sıçan Böbrek Dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG Gruplarında COX-2 Aktiviteleri.....	36
<b>Şekil 4.6.</b>	RİR Sıçan Grubu Tübül Hücreleri.....	37
<b>Şekil 4.7.</b>	RİR Sıçan Grubu Glomerül Hücreleri.....	38
<b>Şekil 4.8.</b>	ETO-50 Sıçan Grubu Tübül Hücreleri.....	39
<b>Şekil 4.9.</b>	ETO-50 Sıçan Grubu Glomerül Hücreleri.....	40
<b>Şekil 4.10.</b>	ETO-100 Sıçan Grubu Tübül Hücreleri.....	41
<b>Şekil 4.11.</b>	ETO-100 Sıçan Grubu Glomerül Hücreleri.....	42
<b>Şekil 4.12.</b>	SG Sıçan Grubu Böbrek Tübül Hücreleri.....	43
<b>Şekil 4.13.</b>	SG Sıçan Grubu Böbrek Glomerül Hücreleri.....	44

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 4.1.</b> Sıçan Böbrek Dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG Gruplarında MDA Düzeyi, MPO Aktivitesi ve tGSH Düzeyleri.....	30
<b>Tablo 4.2.</b> Sıçan Böbrek Dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG Gruplarında COX-1 ve COX-2 Aktiviteleri.....	34

# 1.GİRİŞ

İskemi, her hangi bir canlı dokuya gelen kan akımının azalması veya tamamen kesilmesi durumudur.<sup>1</sup> Böbrek iskemisi; kısmi nefrektomi, organ transplantasyonu ve çeşitli ürolojik vasküler cerrahi girişimlerde görülmektedir.<sup>2, 3</sup> İskemili dokunun oksijenden yoksun kalması, hücrelerde enerji kaybının artmasına, toksik metabolitlerin birikmesine, hücre fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır.<sup>4, 5</sup> İskemi hasarının şiddeti, iskemi süresinin uzamasına paralel olarak artmaktadır.<sup>6</sup> Bu nedenle, cerrahi işlem süresinin kısa tutulması ve iskemili dokunun yeniden kanlanması (reperfüzyonunu) sağlamaya çalışılmaktadır. Ancak reperfüzyonda iskemili dokuya, arteriyel kanla bol miktarda sunulan moleküler oksijen (O<sub>2</sub>), aşırı serbest oksijen radikalinin oluşmasına ve antioksidan savunma mekanizmalarının azalmasına yol açmaktadır.<sup>7</sup> İskemili dokunun yeniden kanlanmasıyla artan böbrek hasarı, iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı olarak tanımlanmaktadır.<sup>8</sup> İ/R olayında artan serbest oksijen radikallerine en duyarlı yapıların membran lipidleri olduğu bilinmektedir. Membran lipidlerinin serbest radikallerle oksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) gibi daha toksik oksidan ürünler açığa çıkmaktadır. Bilindiği gibi, MDA ölçümü ile lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilmektedir.<sup>9</sup> Yine İ/R hasarının oluşmasında, devam etmesinde ve şiddetinin belirlenmesinde serbest oksijen radikallerinin yanı sıra inflamasyonun da önemi gösterilmektedir.<sup>10, 11</sup> İ/R hasarı ile gerçekleşen inflamasyon “aseptik inflamasyon” olarak kabul görmektedir.<sup>12</sup> Aseptik inflamasyon, septik inflamasyona benzer şekilde nötrofil ve makrofajların birikimi ve proinflamatuvar mediyatörlerin artmasıyla seyreder.<sup>13</sup> İ/R hasarındaki inflamasyon, iskemi döneminde sitozolik kalsiyum miktarının artmasıyla başlar. Yükselen kalsiyum, hücrelerde fosfolipaz A2 aktivitesini indükler ve fosfolipidlerden araşidonik asit sentezini artırır. Sitozolik kalsiyum ayrıca, siklooksijenaz (COX) aktivitesini de



indükleyerek araşidonik asitten prostaglandin üretimini hızlandırır. Fareler üzerinde yapılan deneysel çalışmalar, COX eksikliğinin nötrofil toplanmasını engellediğini ve İ/R hasarını anlamlı olarak azalttığını göstermiştir.<sup>14</sup> COX enziminin farklı izoformları bulunmaktadır. COX-1 ve COX-2 izoformları en fazla araştırılan ve fonksiyonları daha detaylı incelenmiş enzimlerdir. COX-1, dokularda sitoprotektif aktiviteden sorumlu yapısal bir enzimdir.<sup>15</sup> COX-2 ise hasarlı dokularda indüklenir ve araşidonik asitten proinflamatuvar prostaglandinlerin üretimini artırarak inflamasyona yol açar.<sup>16</sup> Literatürlerden edinilen bu bilgiler, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitenin, iskemik dokunun reperfüzyon öncesi ve reperfüzyon sonrası dönemlerde yararlı olabileceğini işaret etmektedir. Çalışmalar, COX-2 inhibitörlerinin dokuyu İR hasarından koruduğunu göstermiştir.<sup>17</sup> Ancak, COX-2'ye selektivite göstermeyen klasik non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların kullanımı, COX-1 inhibisyonuna bağlı ciddi yan etkilere neden olmaktadır.<sup>18</sup> Deneyde kullanacağımız etorikoksib antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkili COX-2 selektif inhibitörü bir ilaçtır.<sup>19, 20</sup> Etorikoksibin deneysel beyin iskemisine bağlı oksidatif stresi anlamlı önlediği bildirilmiştir.<sup>21</sup>

Çalışmamızda, böbrek glomerül ve tübül hücrelerindeki antiapoptotik faktörü belirlemek için Bcl-2 protein boyaması yapıldı. Bcl-2 onkoproteini, endotel hücrelerin apoptozise uğramasını önler ve hücre proliferasyonuna neden olmadan hücrenin canlılığını sağlayan apoptozu inhibe eder.<sup>22, 23</sup>

Literatür taramalarında etorikoksibin sıçanlarda İ/R ile indüklenen böbrek hasarında koruyucu etkisine ait her hangi bir bilgiye rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamızın amacı, etorikoksibin sıçan böbreklerinde İ/R ile oluşturulan hasara etkisini biyokimyasal ve immunohistokimyasal olarak araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi, dokuya gelen arteriyel ya da venöz kan akımının azalması veya tamamen kesilmesine bağlı dokunun oksijenden yoksun kalmasıdır. Reperfüzyon ise iskemili dokunun yeniden kanlanmasını sağlamaktır. Ancak, reperfüzyon işlemi iskemili dokularda daha şiddetli hasara yol açmaktadır. Son zamanlarda İ/R hasarı, dokunun oksijensiz kalması ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile devam eden ve inflamatuvar yanıtla genişleyen karmaşık patolojik bir süreç olarak tanımlanmıştır.<sup>24</sup> İskemili dokuda, hücresel fonksiyon bozukluğu ve hücre nekrozuna kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Sağlıklı hücre fonksiyonları aerobik metabolizma ile sürdürülürken, iskemili hücrelerde ise anaerobik metabolizma görülür. Aerobik dokularda üretilen adenozin trifosfat (ATP) adenozin monofosfat (AMP), adenozin, inozin ve hipoksantine parçalanır. Oluşan hipoksantin, ksantin dehidrojenaz (KDH) ile ksantin ve ürik asite metabolize edilir. Aerobik dokularda hipoksantin, KDH'la olan metabolizmasında nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) kullanıldığı için, toksik oksijen radikalleri oluşmaz. Hipoksantin, iskemili dokuda KDH ile değil, ksantin oksidaz (XO) ile metabolize edilir. Çünkü iskemi döneminde KDH, XO'ya dönüştürülür.<sup>24, 25</sup> Hipoksantin, XO ile olan metabolizmasında moleküler oksijen (O<sub>2</sub>) kullanıldığı için ara ürün olarak toksik oksijen radikalleri üretilir. Ancak, iskemili dokuda O<sub>2</sub>'nin yeterince bulunmaması nedeniyle, reperfüzyon olmadığı sürece biriken hipoksantin, ksantine dönüştürülemez ve ara ürün olarak toksik oksijen radikalleri üretilemez.<sup>24, 26</sup> Fakat uzun süre devam eden iskemide hücre enerji depoları boşalır. Hücre enerji depolarının boşalması, hücre membranında bulunan Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaz pompasının inhibisyonuna yol açar. ATPaz pompa inhibisyonu, hücre içinden Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> iyonlarının hücre dışına geçişini durdurur ve intrasellüler Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> iyon

konsantrasyonları artar. İntrasellüler  $\text{Na}^+$  artışı, suyun ( $\text{H}_2\text{O}$ ) da hücrelere geçişini pasif bir difüzyonla artırır ve hücrelerin şişmesine neden olur. Bu şişme, anerobik metabolizma ürünlerinin birikimi ile daha da artar. İntrasellüler  $\text{Ca}^{+2}$  iyon konsantrasyonunun artışı hücrelerde patolojik olayların başlatılmasına sebep olur. Bu nedenle iskemili dokuya ilk yapılacak müdahale, dokunun yeniden kanlanmasını (reperfüzyonunu) sağlamaktır.<sup>24</sup> Reperfüzyonda reoksijenizasyonun sağlanmasıyla iskemi sırasında oluşan XO,  $\text{O}_2$ 'yi kullanarak,<sup>7, 24</sup> biriken hipoksantini ksantine dönüştürürken, aşırı serbest oksijen radikalinin oluşmasına neden olur. Reperfüzyon mediatörleri olarak bilinen bu serbest oksijen radikalleri, hücre membran lipidlerini oksidasyona uğratarak, lipidlerden aldehid ve MDA gibi toksik ürünlerin meydana gelmesini sağlar. Ayrıca oksijen radikalleri DNA ile de tepkimeye girerek DNA'nın oksidatif hasarına yol açarlar. Serbest radikal reaksiyonları sonrasında, nükleik asitlerde baz değişimleri ve DNA'da zincir kırılmaları meydana gelir. Bu değişim onarılamazsa DNA mutasyona uğratılır. 8-hidroksiguanin'in (8-OHGua), DNA'nın mutajenik bir şekli olduğu kabul edilmiştir. Parks DA ve arkadaşları, reperfüzyon hasarının iskeminin tek başına oluşturduğu hasardan çok daha fazla hasar oluşturduğunu göstermişlerdir.<sup>24.</sup>

27

Polimorfonükleer lökositler (PNL) reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde önemli rol oynar; PNL'ler, azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve myeloperoksidaz enzimlerini içerirler. Aktive PNL' lerde ksantin oksidazın artması ile serbest oksijen radikal salınması solunum patlaması olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında myeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside

indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir. PNL'lerin aktivasyonu ile granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim, elastaz, kollajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır.<sup>24, 28, 29</sup>

İskemi-reperfüzyon hasarının bir başka mekanizması iskemi döneminde intrasellüler kalsiyum artmasıyla fosfolipaz A2'nin aktive olmasıdır. Fosfolipaz A2 membran fosfolipidlerinden araşidonik asit üretimini artırır. Doku İ/R'de siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimi aktifleşir ve araşidonik asitten proinflamatuvar prostaglandinler ve serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasını sağlar.<sup>24</sup> Yeni yapılan çalışmalarda COX-2 aktivitesinin yüksek bulunduğu İ/R oluşturulmuş over dokusunda histopatolojik olarak inflamasyon belirtilerine rastlandığı gösterilmiştir.<sup>30</sup> Reperfüzyon hasarı, iskeminin tek başına oluşturduğu hasardan daha şiddetli olduğu bilinmektedir. İ/R hasarı hemen hemen bütün organ ve dokularda görülebilmektedir. Literatür taramalarında; beyin, myokard, akciğer, böbrek, over ve mide dokularının İ/R hasarında oksidan parametrelerde yükselme, antioksidan parametrelerde ise azalma olduğu rapor edilmiştir.<sup>31</sup> Yukarıda belirtildiği gibi, reperfüzyonda reoksijenizasyonun sağlanmasıyla iskemi sırasında oluşan XO O<sub>2</sub>'yi kullanarak<sup>7, 24</sup> biriken hipoksantini, ksantine dönüştürürken, aşırı serbest oksijen radikalinin oluşmasına neden olur. İskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağı XO'dur. Bu enzim farklı dokularda KDH'in, XO'a dönüşme süresi farklılık gösterir. Çalışmalarda iskemi sırasında KDH 'in kalsiyum aracılı bir proteaz katalizörlüğünde ksantin oksidaza dönüşmesi, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürmektedir. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar.<sup>32-34</sup>

Serbest radikaller ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Moleküler oksijen, yüksek derecede serbest oksijen radikali (SOR) oluşturma eğilimindedir. SOR' lar normal şartlar altında da fizyolojik miktarlarda üretilmektedir. Oksijenin redüksiyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) oluşur. Oksijenden ayrıca enzimatik ve dismutasyonla hidrojen peroksit radikali ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^-$ ) oluşur. Organizmada bu serbest radikaller dışında, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. SOR'lardan en aktif olanı  $OH^-$  radikalidir.<sup>35</sup> Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi,  $O_2^-$  nin dismutasyonu ile olur. Dismutasyon reaksiyonu,  $H_2O_2$  bir serbest radikal olmadığı halde SOR'lar kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü  $Fe^{++}$  veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu,  $O_2^-$  radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan  $OH^-$  oluşturur. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler.<sup>36</sup>

Membran lipidleri, serbest radikallerin etkilerine karşı en duyarlı biyomoleküllerdir. Membranlar da lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar ve hücrelerde ciddi hasar oluşur. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır.<sup>37</sup> Serbest radikallerin hasar oluşturucu etkisine karşı duyarlı bir diğer yapılar proteinlerdir. Fakat proteinler, serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallere karşı daha duyarlıdırlar. SOR'lardan etkilenen proteinlerden sülfür

radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Serbest radikallerin etkisiyle, immunoglobulin G (IgG) ve albumin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin non-enzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $O_2^-$  veya  $H_2O_2$  ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur.<sup>38, 39</sup>

SOR'lar nükleer ve mitokondriyal DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmalarına neden olur.  $OH^-$  deoksiriboz ve bazlar ile reaksiyona girer kolaylıkla hasara yol açarlar.  $H_2O_2$  membranlardan serbest bir şekilde geçer ve hücre çekirdeğinde DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne neden olur.<sup>40, 41</sup> Canlı dokularda İ/R hasarına karşı SOR oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Antioksidan olarak da adlandırılan bu savunma mekanizmaları, serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması, SOR'ları bağlama ve zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engellemesi, SOR'larla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltması, inaktif şekile dönüştürmesi ve SOR'ları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirmesi gibi etkilere sahiptirler.<sup>42, 43</sup> İ/R hasarında SOR'un zararlı etkileri, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi tarafından engellenir. Enzimatik savunma yolağında en iyi bilinenler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx)'dir.<sup>44</sup> SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eden önemli bir enzimdir.<sup>45, 46</sup> Normal koşullarda hücrede oluşan  $H_2O_2$  radikaline karşı katalaz ve glutatyon peroksidaz etki gösterir.  $H_2O_2$ 'yi suya dönüştürerek detoksifiye ederler ve daha fazla toksik ürünlerin oluşumunu önlerler.<sup>47</sup> Antioksidan etkinliğin devam edebilmesi için okside glutatyonun (GSSG) tekrar redükte (GSH) glutatyon

dönüştürülmesi gereklidir. Bu işlem NADPH'a bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz (GSH-Rd) tarafından yerine getirilir.<sup>42</sup>

Redükte Glutatyon (GSH), glutamat glisin ve sisteinden oluşan tripeptid yapısında endojen antioksidan bir moleküldür. Oksidatif stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar. Sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, SOR'a karşı direkt olarak da savunma yapabilir.<sup>48</sup> Hücrede milimolar derişimde bulunan GSH, primer olarak redükte formda bulunur, ancak okside formda disülfid dimeri (GSSG) olarak da bulunabilir.<sup>49, 50</sup> GSH'nın hücresel seviyesi  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz, amino asit transporterları, glutatyon sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazı içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunur.<sup>51</sup>

Biyosentez, sitoplazmada yer alan glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin katalizi ile gerçekleşmektedir. Hücre içi yapılar ve diğer hücrelerin glutatyon ihtiyacı sentezlenen glutatyonun plazma ve interselüler membranlarda yer alan özgün taşıyıcı proteinlerle aktarılması ile karşılanmaktadır. Glutatyon hücre içi majör olmayan bir protein olan tiyoldür. Hücrede serbest ya da çeşitli moleküllere bağlı olarak bulunabilmektedir. Serbest glutatyon formu indirgenmiş (GSH) veya oksitlenmiş tiyol (GSSG) formlarında bulunur. GSH hücre içi antioksidan sisteminin bir üyesi olup, hücre redoks dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Peroksidleri, daha az zararlı olan yağ asitlerine, su ve GSH disülfidlerine dönüştürür. Antioksidan işlevinin yanı sıra sinyal iletilsinin modülasyonu, hücre proliferasyonu ve immün cevapta da işlevleri tanımlanmıştır.<sup>48, 49</sup> GSH bunların dışında; DNA'nın deoksiribonükleotid öncüllerinin sentezinde görev alır. Hücre içi GSH derişimi, GSH'nın hücrede kullanım sentez hızına bağlıdır. Özellikle savunma sisteminde GSH kullanımı, hücre GSH/GSSG oranının düşmesine sebep olmaktadır. Oksidatif stres hücrede GSSG ve protein-karışık disülfid derişimlerinin artmasına neden olmaktadır. GSH hücre içerisinde özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

detoksifikasyonu sırasında oksitlenmektedir. Oksidasyona uğrayan tiyollerin indirgenmesi ya da olası ise de novo biyosentez ile geri kazanımı NADPH bağımlı GSH-Rd, tiyol transferaz (TRX) ve glutaredoksin redüktaz (GRX) tarafından sağlanır. GSSG ve protein tiyolları ile karışık disülfidler bu enzim sistemleri tarafından GSH'a çevrilir.<sup>50, 51</sup> GSH'nın çeşitli moleküllerle konjugasyonu, hücre GSH derişiminin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. GSH'nın küçük moleküllerle oluşturduğu bu konjugatlar hücreden atılır. Konjugasyon veya atılım nedeni ile olan GSH miktarındaki azalma, hepatositlerde biyosentez ile ya da eksojen GSH alınımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır. Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir. Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondriyal hasarın belirteçlerinden olarak kabul edilir.<sup>52, 53</sup> Hücrenin apoptozisi başlatması ya da devam ettirmesinde, hücre içi GSH seviyesinin önemli olduğu görülmüştür. Hücre içi GSH seviyesi düşük olduğunda, hücre içi SOR artmakta ve apoptotik yolda rolü olan kaspaz aktivasyonu uyarılmaktadır.<sup>50</sup> Mitokondriyal ve sitoplazmik glutatyonun tüketilmesi, apoptotik hücre ölümünün erken sinyalinin oluşturur. GSH'daki azalma mitokondri transmembran potansiyelini değiştirmekte, bu da mitokondrinin hızlı bir şekilde fonksiyonunu kaybederek, sitokrom-c' nin sitoplazmaya salınımına sebep olmaktadır ve apoptozise giden yol tetiklenmektedir.<sup>51</sup>

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), organik hidroperoksitlerin (lipid hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) veya hidrojen peroksitin GSH tarafından indirgenmesi tepkimesini katalizler.<sup>54</sup> GSH-Px selenyum bağı ve selenyum bağı olmayan olarak gruplandırılır. Selenyum bağı grupta; hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitleri indirgeyen beş üye vardır. Selenyum bağımsız GSH-Px ise



hidrojenperoksit ile ihmal edilebilir bir aktifliğe sahip olup sadece organik hidroperoksitleri redükler.<sup>55</sup> Selenyum bağımlı üyelerden, GSH-Px1 bütün hücrelerde eksprese edilen, tetramerik yapıda, sitozolik bir enzimdir. Eritrosit, böbrek ve karaciğerde yüksek miktarda bulunur. GSH-Px2 veya gastrointestinal GSH-Px insanlarda karaciğer ve gastrointestinal kanalda eksprese edilir; böbrek, kalp, akciğer, plasenta ve uterusunda bulunmaz. GSH-Px3 veya plazma GSH-Px plazmanın lipid kısmından izole edilmiş bir glikoproteindir. Akciğer, plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunur. GSH-Px4 veya fosfolipid GSH-Px sitozolde, mitokondri ve hücre zarında bulunur. GSH-Px5 veya epididimal GSH-Px selenyum bağılı değildir ve yalnız epididimiste eksprese edilir. GSH-Px6 hücresel GSH-Px ile homoloji gösterir, burun epiteli ve embriyolarda eksprese edilir.<sup>56,57</sup>

Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd), GSSG'yi redükte formuna (GSH) indirir.<sup>58, 59</sup> Glutasyon redüktazın kalıtımı otozomal dominanttır, 8. kromozom üzerindedir. Glutasyon peroksidaz ile benzer doku dağılımı gösterir. Glutasyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfüd bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur.<sup>60</sup>

Glutasyon-S-Transferaz, memeli türlerinde elektrofilik bileşenlerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen izoenzimlerin oluşturduğu çoklu bir gen ailesinden oluşur; alfa, mu, teta, pi, zeta, sigma, kappa ve omega olarak gösterilen 8 esas gen sınıfı ile düzenlenmiştir. Alfa kromozom 6'da, mu kromozom 1'de, teta kromozom 22'de, pi kromozom 11'de, zeta kromozom 14'de, sigma kromozom 4'de, kappa ve omega kromozom 10'da kodlanır.<sup>61</sup> GST karsinojenleri, çevresel etmenleri, ilaç ve geniş spektrumlu xenobiotikleri metabolize eder. Mikrozomal GST belirlendiyse de GST aktivitesi esasen sitozoliktir.<sup>54</sup> GST iki subüniteden oluşmuş dimerik bir proteindir. Bu

subünitelerden her biri glutasyon bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve buna komşu elektrofilik substrata bağlanan nispeten hidrofobik olan bölge içerir. Bunun yanında çeşitli izoenzimlerde transport veya düzenleyici fonksiyonu olduğu düşünülen substrat bağlanmayan bölgede belirlenmiştir. GST, hidroksialkenler, lipid peroksidasyonu ürünlerinden propenaller ve DNA hidroperoksitleri gibi endojen zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlayabildiği için oksidatif strese karşı savunmaya katılır. GST enziminin teta ve alfa sınıfları selenyum bağlı olmayan glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler, GST pi formu lipid hidroperoksitler, hidroksialkenler, malondialdehitler ve propenalleri inaktive eder. GST pi ayrıca hassas SH- grubuyla SOR ile direkt reaksiyona girerek disülfüd yapımının inaktif olmasına neden olur.<sup>55, 62</sup>

Süperoksit Dismutaz, reaktif oksijen türlerine karşı primer antioksidan enzimdir. Formları arasında amino asit dizilimi, aktif metal bölgesi ve hücresel dağılım farkı vardır. Prokaryotlarda Fe ve Mn-SOD bulunurken, ökaryotlarda Mn, Cu, Zn ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) bulunur. Mn-SOD homotetramer yapıdadır, her subünitesinde bir Mn iyonu bulunur ve 88 kDa ağırlığındadır. Hücresel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer, böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır. CuZn-SOD 32 kDa ağırlığında olup memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. İki protein subünitesi içerir her subünitede Cu ve Zn atomları bulunur. EC-SOD ise en çok akciğer, uterus ve tiroid bezlerinde bulunur.<sup>60, 63</sup> SOD, süperoksit molekülünün hidrojen peroksite ve moleküler oksijene tepkimesini katalizler.<sup>59</sup> Tepkimede süperoksit anyonu  $\text{Cu}^{+2}$  ve bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu şekilde süperoksitten bir elektron  $\text{Cu}^{+2}$ 'a transfer olurken  $\text{Cu}^{+1}$  ve moleküler oksijen oluşur. İkinci süperoksit anyonu  $\text{Cu}^{+1}$ 'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki elektron alarak hidrojen peroksiti oluşturur.<sup>60</sup>

Katalaz (CAT), çoğu organizmada bulunan ve hem içeren homotetramerik bir enzimdir. Peroksizomlarda yüksek derişimlerde bulunur. CAT yapı ve işlevlerine göre bifonksiyoneldir. Tüm prokaryot ve ökaryotlarda bulunur. Her subünite bir hem grubu ve NADPH molekülü içerir. Birçok katalazda NADPH molekülü yüzeye yakın ve sıkıca bağlıdır. Bu kofaktör peroksitin oksijene dönüşümünde katalazın inaktivasyonunu koruduğu ve etkisini arttırdığı gözlenmiştir.<sup>64</sup> CAT hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler. CAT ayrıca fenol, alkol gibi farklı substratların, hidrojen peroksitin çift redüksiyonu ile detoksifikasyonunu sağlar. Glukoz-6-fosfat eksikliklerinde NADPH'ın olgun eritrositlerdeki düşüklüğünün katalazda inhibisyona neden olduğu ve hemolizin GSH-Rd/GSH-Px'den çok katalazdan kaynaklandığı düşünülmektedir.<sup>58</sup>

Bcl-2 ekspresyonu ilk kez B hücreli lenfomada gösterilmiştir. 18. kromozomda bulunan Bcl-2 geni, anti-apoptotik role sahip olan bir onkoproteindir.<sup>65</sup> Bcl-2 onkoproteininin endotelial hücrelerin apoptozise uğramasını önler. Bcl-2, hücre proliferasyonuna neden olmadan hücrenin canlılığını sağlayan apoptozu inhibe eder ve değişik stimuluslar tarafından başlatılan hücre ölümünü belirgin biçimde azaltır.<sup>22, 23</sup> Bcl-2, proapoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere ikiye ayrılır. Proapoptotik gruba Bax, Bak, Bok, Bik, Bad, Bid ve Bim dahildir. Antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri ise Bcl-2, Bcl-ks, Bcl-w ve Mcl-1'dir.<sup>66</sup> P53 tarafından başlatılan apoptozis, proapoptotik grup aracılığı ile gerçekleşir. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi proapoptotik aile bireylerini baskılayarak apoptozu bloke eder. Bcl-2, antiapoptotik ailesinin en iyi çalışılmış üyesidir. Bax'a bağlanarak ve Bax tarafından başlatılan geçirgenliği bloke ederek işlevini görür.<sup>67</sup> Bcl-2, tümör büyümesi, progresyonu ve metastazı için önemli olan angiogenezin gelişmesinde rol oynar.<sup>68</sup> Bcl-2 overekspresyonu, radyasyon, p53, kemoterapötik ilaçlar gibi değişik stimuluslar tarafından başlatılan hücre ölümünü

engeller ya da belirgin biçimde azaltır.<sup>69</sup> Bu etkiyi, genel apoptoz yolunu kapatarak oluşturduğu bildirilmiştir.<sup>22</sup> Bax protein (Bcl-2-associated x protein) ise Bcl-2 ile yüksek derecede yapısal olarak benzerlik göstermesine rağmen proapoptotik aktivite gösterir.<sup>69</sup> Bax overekspresyonu homodimerizasyon ile sonuçlanır ve Bcl-2 protein ile heterodimer formu oluşturarak onu inaktive eder. Böylece Bcl-2 fonksiyonu engellendiğinden apoptoz indüksiyonu başlar.<sup>22, 69</sup> Normal epidermiste Bcl-2 bazal hücre tabakasında ve matür kıl follikülünde eksprese edilirken, Bax protein çoğunlukla suprabazal hücrelerde eksprese edilmektedir.<sup>70</sup> Bcl-2 nin gliomlarda invazyon ve migrasyonu artırdığı görülmüştür. Bcl-2 yüksekliği düşük gradeli astrositomalarda da gösterilmiş, ancak sağkalım ile korelasyon bulunamamıştır.<sup>71</sup>

Bcl-2, hücrelerde, kaspazları farklı mekanizmalarla inhibe ederek apoptozu önlediği gösterilmiştir.<sup>72</sup> Ayrıca, Bcl-2'nin mitokondrilerden sitokrom-c ve apoptozu uyaran faktör (AIF) un sitoplazmaya salınımını önleyerek oluşturduğunu ortaya konulmuştur.<sup>73</sup> Sitokrom-c enziminin mitokondrilerden sitoplazmaya salınımını gerçekleştiren faktörlerden bazılarının caspase-3 ve caspase-8 olduğu bilinmektedir.<sup>74</sup>

## **2.2. Siklooksijenaz**

Siklooksijenaz (COX) enzimleri hücrelerde araşidonik asitten eikozanoidlerin oluşumuna iştirak ederler. COX un iyi bilinen iki tip izoformu vardır. Bunlar, COX-1 ve COX-2'dir. Ancak daha sonra COX-3 izoformu bulunmuştur. Fakat COX-3 izoformunun fonksiyonu üzerinde çalışmalar devam etmektedir. COX-1 ve COX-2 enzimleri prostoglandinlerin üretimini sağlarlar. COX-1 enzimi yapısaldır ve tromboksan A2 sentezini sağlar. Çoğu organ ve dokularda (mide, böbrek, beyin vs) bulunur ve önemli sitoprotektif rolü vardır. COX-2 ise her dokuda bulunmaz, ancak pro-inflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar, tümör promotörleri, peroksizomal proliferatörler, hipoksi, iyonize radyasyon ve bazı karsinojenler COX-2

sentezini indüklerler.<sup>75, 76</sup> COX-1 ile COX-2 arasındaki en önemli fark COX-1'in yapısal olması ve üretildiği hücrelerde sürekli sentezlenmesi nedeniyle daima var olmasıdır. Her iki enzimin de büyük oranda yapısal benzerliği vardır. Vücutta baskın olan form COX-1'dir. COX-1 fizyolojik uyarılarla aktive olur. COX-2 uyarımı transkripsiyon artışı ve COX-2 mRNA'nın stabilizasyonuna yol açar. COX-1 ve COX-2 enzimleri her ikisi de endoplazmik retikulumda bulunur. Ağırlıkları 72 ve 74 kDa dir. COX-1 enziminin inhibisyonu doku hasarına yol açarken, COX-2 enzim inhibisyonu ise antiinflamatuvar aktiviteye yol açar. Epidemiyolojik çalışmalar, birçok hastalık patogenezinde COX sisteminin rolünün olduğunu göstermiştir.<sup>77, 78</sup> Siklooksijenaz yolunda PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> ve TxA<sub>2</sub> bulunur. Bunların her biri spesifik bir enzim etkisi ile meydana gelir. Selektif olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) hem COX-1 ve hem de COX-2 enzimini eşit inhibe ederler. NSAİİ'lerin antiinflamatuvar aktivitesi COX-2 enzim inhibisyonuna, GIS ve diğer organlar üzerindeki yan etkileri ise COX-1 enzim inhibisyonuna bağlıdır. Bu nedenle, NSAİİ'lerin bu yan etkilerini azaltmak için COX-2 selektif inhibitörleri geliştirilmiştir. NSAİİ'lerin COX-2'ye kıyasla COX-1'e olan aktivite oranları, antiinflamatuvar dozlarda gösterdikleri yan etkilerde gözlenen farklılıkları açıklamaktadır. COX-2'ye en yüksek selektivite gösteren ilaçlar, mide ve böbrekte daha az yan etki göstererek antiinflamatuvar etki sağlamaktadırlar.<sup>15</sup>

### **2.3. Böbrekte COX Enzimlerinin Fonksiyonu**

COX-1 enziminin böbrek dokusundaki fonksiyonu bilinmesine karşın, COX-2 ile ilgili bilgiler henüz toplanmaktadır. 1993'te COX-2 mRNA sının böbrek dokusunda düşük düzeyde varlığı gösterilmiştir.<sup>79</sup> İmmünohistokimyasal yöntemler ile hayvanlarda yapılan çalışmalarında, distal tübüldeki makula densa, medüller interstisyel hücreler ve Henle kıvrımının çıkan kalın kolu düzeyindeki epitel hücrelerinde COX-2 varlığı

belirlenmiştir.<sup>80</sup> İnsanlarda arter, ven, endotel düz kas hücreleri ve glomerüllerde COX-2 proteini gösterilebilmiştir.<sup>81</sup> Ayrıca böbrek mezengeal hücrelerinde ve fibroblastlarda COX-2 varlığı belirlenmiştir. Bu yapısal enzimin serotonin, tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), interlökin-1<sub>β</sub> (IL-1<sub>β</sub>), bakteriyel endotoksin (LPS), endotelin-1 tarafından uyarılabildiği gösterilmiştir.<sup>82-85</sup> Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda Anti-Glomerüler Bazal Membran (Anti-GBM) glomerülo nefritinde protein kinaz inhibitörü kullanımı ile transkripsiyon ve sonrası aşamalarda COX-2 ekspresyonunda artış gözlenmiştir.<sup>86</sup> Üreter obstrüksiyonu ve lipopolisakkarid verilmesiyle gelişen renal inflamasyon modellerinde COX-2 oluşumu artmıştır.<sup>87, 88</sup> Renal fonksiyonun devam etmesi, prostaglandin bağımlıdır. COX-2 ve ürünleri, böbrek matürasyonu ve hücrel farklılaşmada önemli rollere sahiptir. Deneysel olarak, COX-2 enzimi ortadan kaldırılan farelerde böbrek gelişiminin önemli derecede aksadığı belirlenmiştir.<sup>89</sup> Bu etkinin yaşamın ilk günlerinde olmaması, yaşlanmayla birlikte ortaya çıkması, COX-2'nin böbrek doku matürasyonundaki önemini yansıtmaktadır.

Böbrekteki prostaglandin reseptör haritalama çalışmalarında farklı prostaglandinler için farklı reseptörlerin varlığının saptanması bu 2 enzimin farklı etkinlik gösterdiklerinin önemli bir kanıtı olarak kabul edilmektedir.<sup>90</sup> Hayvan modellerinde böbrekteki COX-2 enziminin de uyarılabilir nitelikte olduğu bulunmuştur.

Glomerülo nefritlerde renal COX-2 ekspresyon kinetiği araştırılmaktadır. Aktif lupus nefritinde glomerüllerdeki COX-2 ekspresyonunun özellikle inflamasyon sahasında hastalık aktivitesi ile doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiştir.<sup>91</sup> Farelerde yapılan bir çalışmada, mezengioproliferatif glomerülo nefritlerde selektif COX-2 inhibisyonunun inflamasyon hücre göçünü değiştirmediği, COX-1 ve COX-2 birlikte bloke edildiklerinde ise mononükleer fagositer sistem hücrelerinin glomerüllere yığılımının arttığı gösterilmiştir.<sup>92</sup> Yine deneysel hayvan modelinde, subtotal

nefrektomi sonrası COX-2 inhibitörü kullanımının proteinüriyi azalttığı ve glomerüloskleroz gelişim hızını yavaşlattığı gösterilmiştir.<sup>86</sup> İn vitro çalışmada ise COX-2 enzim inhibisyonunun, böbrek medüller interstisyel hücrelerinin yaşam süresini kısalttığı belirlenmiştir. Böylece COX-2 inhibitörlerinin analjezik amaçlı kronik kullanımının renal medüller hasar ile sonlanabileceği olasılığı ileri sürülmüştür.<sup>88</sup> COX-2 selektif inhibisyonu ile özellikle gastrointestinal sistem yan etkileri olmak üzere birçok yan etkiden korunulduğu bilinmektedir. COX-2'nin temel etkinliğinin Na<sup>+</sup> reabsorpsiyonu üzerine olduğu renal fonksiyonların devamında COX-1'in daha önemli olduğu savunulmaktadır. COX-2'nin üriner sistemde böbrek dışı dokularda da etkin bir rolü bulunduğuna dair bulgular elde edilmiştir. Akut renal kolikte selektif COX-2 inhibitörleri, üreteral spazmın çözülmesinde, indometasin gibi selektif olmayan COX inhibitörleri kadar etkin bulunmuştur.<sup>93</sup>

#### **2.4. COX-2 Selektif İnhibitörü Non-Steroidale Antiinflatuar İlaçlar**

Non-steroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ), COX-2 selektif inhibitörleri ve non-selektif inhibitörleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar. NSAİİ'ler inflamasyon, ağrı ve ateşle seyreden hastalıkların tedavisinde en fazla tercih edilen ilaçlardır. NSAİİ'lerin tedavi edici etkilerinden COX-2 enzim inhibisyonunun, gastrointestinal ve diğer yan etkilerinden ise COX-1 enzim inhibisyonunun sorumlu olduğu savunulmaktadır.<sup>15</sup> NSAİİ'lerin COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe etme potansiyellerinin farklı olduğu rapor edilmiştir.<sup>18</sup> COX-2'ye selektivite göstermeyen klasik NSAİİ alan hastaların %25-50'sinde dispepsi, %15-30'unda ülser,<sup>94, 95</sup> %1'inde GİS kanaması ve perforasyon gibi ciddi komplikasyonların oluştuğu gösterilmiştir.<sup>96, 97</sup> Klasik NSAİİ lerin bu yan etkilerini azaltmak amacıyla yapılan çalışmalar sonucu COX-2 selektif inhibitörleri olan selekoksib, rofekoksib, etorikoksib, lumirakoksib, parekoksib ve nimesulid gibi midede daha az hasar oluşturan koksib grubu ilaçlar geliştirilmiştir.<sup>98, 99</sup> Koksibler, klinikte

kullanıldıkları yüksek dozlarda bile COX-1'i inhibe etmedikleri için, GİS yan tesirleri oluşturmaksızın selektif olmayan klasik NSAİİ'lerle karşılaştırılabilir terapötik yararlar gösterebilecekleri düşünülmektedir.<sup>100, 101</sup>

#### **2.4.1. Antiinflamatuvar Etki Mekanizmaları**

Selektif ve non selektif COX-2 inhibitörlerinin antiinflamatuvar etki mekanizmaları COX ve lipoksijenaz (LO) ürünlerinin sentezinin inhibisyonu, toksik oksijen radikallerinin ve lizozomal enzim salınımının engellenmesi nötrofil agregasyon, adezyon ve kemotoksisinin önlenmesi, oksidatif fosforilasyonunun uncouplingi şeklinde özetlenebilir.<sup>15</sup>

#### **2.4.2. Kullanıldığı Yerler**

Selektif ve selektif olmayan klasik NSAİİ'lerin kullanıldığı yerler romatoid artrit, juvenil artrit, ankilozan spondilit, psoriatik artrit, sistemik lupus eritematozis, kristal artritleri, posttravmatik ağrılar, baş ağrısı, diş ağrısı, erken dönem kanser ağrısı, olarak sıralanabilir.<sup>18</sup>

#### **2.4.3. Yan Tesirleri**

Klasik NSAİİ lerin kullanımı sırasında en sık görülen yan etkileri COX-1 inhibisyonuna bağlı yan etkilerdir. GİS yan tesirleri gizli kan kayıplarından ülser perforasyonuna kadar değişebilir. Ayrıca NSAİİ'ler serum kreatin seviyesini yükseltirler, su retansiyonu, hiperkalemi, nefrit, proteinüri ve akut böbrek yetmezliğine neden olabilirler. Karaciğer enzimlerinde yükselme, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, agranülositoz, aplastik anemi, toksik epidermal nekroz, kıkırdak metabolizma bozukluğu, Reye sendromu, baş dönmesi ve kulak çınlaması gibi istenmeyen etkilere yol açabilirler.<sup>15</sup> Bu nedenle klasik NSAİİ'lere göre selektif COX-2 inhibisyonu yapan ilaçların GİS ve diğer yan tesir riski daha düşük, terapötik etki güçleri eşit olduğu öne sürülmüştür.<sup>102</sup>



#### **2.4.4. Rofekoksib ve Selekoksib**

İlk sentezlenen COX-2 inhibitörü koksibler rofekoksib ve selekoksibdir. Daha sonra etorikoksib, lumirakoksib, parekoksib ve valdekoksib geliştirilmiştir.<sup>102</sup> Rofekoksib, ilaç olarak 1999 yılında onaylanmıştır. Aynı yılda selekoksib Amerika'da piyasaya sürülmüştür. Çok kısa bir sürede GİS yan tesirlerinin az olması nedeniyle kullanımları yaygın bir ilaç haline gelmiştir. Ancak 2002 yılından rofekoksibin myokard infarktüs riskini artırması nedeniyle, üretici firma ilacın piyasadan geri çekilmesi gerektiğini açıklamıştır. Ülkemizde selekoksib etken maddesi içeren preparatlara 2. sınıf geri çekilme uygulanmıştır.

#### **2.4.5. Etorikoksib, Valdekoksib, Parekoksib ve Lumirakoksib**

Etorikoksib, valdekoksib, parekoksib ve lumirakoksib biyokimyasal olarak COX-2 seçiciliği daha fazla olan ilaçlardır. Etorikoksib, valdekoksib ve parekoksib bir 4- metilsülfonil veya sülfonamid süstitüentine sahip cis-stilben yapısı taşımaktadır.<sup>103-</sup><sup>105</sup> Lumirakoksib ise bir fenilasetik asit türevidir ve asidik özellik taşımaktadır.<sup>106</sup> Etorikoksib, COX-2 üzerinde rofekoksibe göre daha seçici bir özelliğe sahiptir.<sup>105</sup> Lumirakoksib ise in vitro ortamda en yüksek COX-2 seçiciliği gösteren ilaçtır.<sup>99</sup> Valdekoksibin selekoksibe göre in vitro ortamda daha yüksek bir terapötik etkinliğe ve GİS açısından daha yüksek güvenilirliğe sahip olduğu görülmüştür.<sup>103</sup> Parekoksib bir ön ilaçtır ve vücutta valdekoksibe metabolize edilir. Önemli bir özelliği enjeksiyonluk tek koksib olmasıdır.<sup>104</sup> Bu ilaçlar zayıf COX-1 aktiviteleri nedeniyle çok yüksek dozlarda bile GİS hasarına yol açmadıkları ve iyi tolere edilebilirlikleri için terapötik açıdan avantajları vardır. Rofekoksib ve selekoksibe göre daha fazla biyokimyasal seçiciliğe sahip COX-2 inhibitörlerinin geliştirilmesindeki diğer bir avantaj da bu tür bileşiklerin daha geniş bir terapötik etkinlik için daha yüksek dozlarda kullanıma imkan sağlaması

olmuştur. Çalışmalar, koksiblerin osteoartrit, romatoid artrit ve akut ağrı tedavisinde selektif olmayan NSAİİ'ler kadar etkin olduğunu göstermiştir.<sup>107, 108</sup> Patrignani ve arkadaşları da etorikoksibin RA tedavisinde, naproksenden daha güçlü olduğunu ortaya koymuştur.<sup>109</sup>

Koksiblerin farmakokinetik özellikleri de birbirlerinden farklıdır. Etorikoksib, valdekoksib, parekoksib ve lumirakoksibin plazma yarılanma ömürleri sırası ile 22, 8-11, 0,87 ve 3-6 saat olarak bulunmuştur. Etorikoksib, yarılanma süresinin uzun olması nedeniyle günde bir kez uygulanmaktadır. Lumirakoksibin yarılanma ömrünün kısa olmasına rağmen, klinik etkinliği günde bir kez dozlama imkanı vermektedir.<sup>106</sup>

Klinik çalışmalar etorikoksib, valdekoksib, parekoksib ve lumirakoksib'in osteoartrit romatoid artrit ve akut ağrı tedavisinde selektif olmayan NSAİİ'lerle karşılaştırıldıklarında benzer klinik etkinlik gösterdiklerini ortaya koymuştur.<sup>110</sup> Diğer koksiblerden farklı olarak, etorikoksib ayrıca alt sırt ağrısı ve akut gut artrit tedavisi için onaylanmıştır.<sup>111</sup> Etorikoksibin osteoartrit, romatoid artrit ve akut diş ağrısı çeken ve kronik alt sırt ağrısı olan hastalarda genel olarak iyi tolere edildiği bulunmuştur.<sup>112</sup> Etorikoksibin selektif olmayan NSAİİ'lerle karşılaştırıldığında perforasyon, ülser ve kanama insidansını yarıya indirildiği gösterilmiştir.<sup>107, 109</sup> Valdekoksibin uzun dönemli uygulanmasının, kronik tedavide güvenilir olduğu doğrulanmıştır. En sık gözlenen yan etkiler, sadece %5'lik bir insidansa sahip olan mide ağrısı, diyare, dismenore, dispepsi ve bulantıdır.<sup>113</sup> Gastroduodenal ülser insidansı plasebo alan hastalarda benzer düzeyde gözlenmiştir.<sup>114</sup> Parekoksibin GİS güvenilirliği, genellikle operasyon öncesi bir analjezik olarak kullanılan ketorolakla karşılaştırılmıştır. GİS, ülser ve erezyon insidansı parekoksib sodyum ve plasebo gruplarına göre, ketorolak alan grupta belirgin derecede artmıştır.<sup>115</sup> Lumirakoksibin GİS yan etkilerinin ibuprofene göre daha düşük olduğu bulunmuştur.<sup>106</sup> Çalışmalarda COX-2 inhibitörlerinin, klasik NSAİİ'lere üstünlüğü çok

belirgin olarak ortaya çıkmıştır.<sup>114</sup> Klasik NSAİİ'ler platelet agregasyonunu inhibe etmelerine karşın, koksibler böyle bir etki göstermezler. Bu nedenle, kardiyovasküler sistem üzerinde  $TxA_2$ 'nin etkinliğinin artması beklenebilir. Bu olay, koksiblerin etki mekanizmasının  $PGI_2$  ve  $TxA_2$  arasındaki dengenin bozulmasıyla ilişkili olduğunu gösterir.<sup>109</sup> Tromboz üzerinde varsayılan etkilerinin yanı sıra, kan basıncını artırmada, COX-2 selektif inhibitörlerinin potansiyeli günümüzde bilinmektedir. COX-2 enziminin inflamasyon sırasında indüklendiğinin anlaşılmasına bağlı olarak, NSAİİ'lerin antiinflamatuvar etkilerinin COX-2 inhibisyonuna, mide kanalındaki irritasyon ve böbrek üzerindeki zararlı etkilerinin ise COX-1'in inhibisyonuna bağlı olduğu ve bu nedenle COX-2'yi selektif olarak inhibe eden bir ilacın selektif olmayan NSAİİ'lerden daha güvenli olacağı düşünülmektedir.<sup>15</sup>

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Deney Hayvanları**

Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen ve ağırlıkları 230-240 gram arasında değişen toplam 24 adet Albino Wistar türü erkek sıçanlar bu çalışma için kullanıldı. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde normal oda sıcaklığında (22°C)'de barındırıldı ve beslendi. Çalışmamızın bütün aşamalarının etik kurula uygun olduğu, ‘‘Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (AÜHADYEK)’’ tarafından verilen 22 Mayıs 2013 tarihli ve 42190979-01-02/2237 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

#### **3.2. Genel Prosedür**

Bu çalışmada deney hayvanları renal iskemi-reperfüzyon kontrol (RİR), 50 mg/kg etorikoksib+renal iskemi-reperfüzyon (ETO-50), 100 mg/kg etorikoksib+renal iskemi-reperfüzyon (ETO-100), şam operasyonu uygulanacak sağlıklı grubu (SG) olmak üzere dört gruba ayrıldı.

#### **3.3. Deneyin Yapılışı**

##### **3.3.1. Cerrahi ve Farmakolojik İşlemler**

Sıçanlar üzerindeki iskemi ve iskemi sonrası reperfüzyon işlemleri steril şartlar altında, 25 mg/kg intraperitoneal (i.p.) tiopental sodyum anestezisi uygulanarak yapıldı. Tiopental sodyum anestezisinden bir saat önce hayvanların ETO-50 grubuna 50 mg/kg, ETO-100 grubuna ise 100 mg/kg dozlarda etorikoksib oral yoldan sonda ile verildi. RİR ve SG sıçan gruplarına ise çözücü olarak distile su aynı yöntemle uygulandı. Anestezi döneminde tüm sıçanların sol böbreklerine tek taraflı dorsal kısımdan açılarak ulaşıldı. Daha sonra (SG grubu hariç) böbreğe gelen renal arter ve vene klips konularak bir saat boyunca iskemi oluşturuldu. Bu süre sonunda RİR, ETO-50 ve ETO-100 sıçan

gruplarına (damar klipsi çıkartılarak) üç saat süreyle reperfüzyon sağlandı. Bu süre sonunda RİR, ETO-50 ve ETO-100 grupları yüksek doz anesteziyle öldürülerek İ/R işlemi uygulanan böbrekleri çıkartıldı. Çıkartılan böbrekler üzerinde biyokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. ETO-50 ve ETO-100 gruplarından elde edilen biyokimyasal ve immunohistokimyasal sonuçlar RİR ve SG gruplardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

### 3.4. Kullanılan Alet ve Kimyasal Maddeler

<b>Cihazlar</b>	<b>Modeli ve Firması</b>
Santrifüj (Soğutmalı)	Heraeus 4600, Germany
Mikro Santrifüj	MSE, Micro Centaur, Sanyo, UK
Homojenizatör	OMNI International
Hassas Terazi	SartoriusnAG Gottingen Tip No: BA 3105, Germany
Distile Su Cihazı	Easypure RF Compact Ultrapure Water Sysytem, USA
Karıştırıcı	Vortex- Geine, Model K 550-EG Massachusetts, USA
Magnetik Karıştırıcı	Labincol 32, Netherlands
Plate Çalkalayıcı	IRMA Shaker Labsan, USA
Su Banyosu	Nüve BM 101, Nüve malz. San. Lim. ve Tic. A.Ş. Ankara
pH Metre	Jenway 3010 pH Meter, UK
Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Otomatik Pipet	Finpipette Lasysystems, Finland
Spektrofotometre	Beckman DU 500, USA

HPLC	Egelant 1100
Leica Bond-Max	LEICA BIOSYSTEMS
Olympus BX 51	OLYMPUS, Japan

Deneyler esnasında kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup aşağıda gösterilmiştir

<b>Kimyasal Maddeler</b>	<b>Firma</b>
Etorikoksib	Merck Sharp & Dohme, England
Tiyopental Na	İE ULAGAY
Potasyum klorür (KCl)	MERCK
Hidroklorik asit (HCl)	MERCK
Sodyum hidroksit (NaOH)	MERCK
5,5'-Ditiyobis (2-Nitrobenzoik asit)	SIGMA
1,1,3,3 Tetraethoxypropane	SIGMA
Hekzadesil trimetil amonyum bromür (HDTMAB)	SIGMA
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	SIGMA
Asetik asit (CH <sub>3</sub> COOH)	RIEDEL-DE-HAEN
Tiyobarbitürik asit (TBA, C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> S)	MERCK
Hidrojen peroksit (%30, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	MERCK
Piridin	SIGMA
Glutasyon redükte form (GSH, C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub> S <sub>32</sub> )	SIGMA
Glutasyon redüktaz (GR, EC 1,6,4,2)	SIGMA
NADPH, Tetrasodyum salt, Redükte form	SIGMA
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	MERCK
Bovine serum albümin	SIGMA
Amonyum sülfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	SIGMA

Flavin adenin dinükleotid (FAD)	SIGMA
DTNB (5-5' Dithio 2 Nitrobenzoik Asit)	SIGMA
Fenol	SIGMA
2-merkapttoetanol	SIGMA
Etanol	SIGMA
Tris	SIGMA
Sodyum klorür (NaCl)	SIGMA
Kloroform- İsoopropanol	SIGMA
Sodyum Asetat	SIGMA
Formik asit (HCOOH)	SIGMA
Heme	SIGMA
Araşidonik Asit	SIGMA
Potasyum Hidroksit	SIGMA
DuP-697	SIGMA
SC-560	SIGMA
Disodyum Fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	SIGMA
Monosodyum Fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	SIGMA
Metafosforik Asit	SIGMA
Asetonitril	SIGMA
o- Dianisidin Dihidroklorid	SIGMA
Fosfat Tamponu	MERCK
Hexadecyltrimethylammonium Bro	SIGMA
Nova Castra	Bcl-2/100/D5, Nova Castra, U.K
N,N,N,N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD)	SIGMA
Wash Buffer	LEICA BIOSYSTEMS

Epitop	LEICA BIOSYSTEMS
DAP+Choromogen	MERCK MILLIPORE
Hematoksilen	MERCK MILLIPORE

### **3.5. Böbrek Dokusunun Biyokimyasal Analizi**

Çalışma için alınan böbrek dokularından homojenatlar hazırlandı. Daha sonra bu homojenatlardan süpernatantlar elde edildi. Elde edilen süpernatantlarda MDA, tGSH miktarları ve MPO enzim aktivitesi uygun metotlar kullanılmak suretiyle saptandı.

#### **3.5.1. Numunelerin Hazırlanması**

Çalışma için her böbrekten 0.2 g doku tartıldı. Dokularda MPO tayini için % 0,5'lik HDTMAB (% 0.5 hegzadesiltrimetil amonyum bromid) içeren pH=6 olan potasyum fosfat tamponu, MDA için % 1.15'lik potasyum klorür çözeltisi, tGSH için pH=7.5 olan fosfat tamponu içinde 2 mL' ye tamamlanarak buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra +4 °C'de 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant kısmı analiz numunesi olarak kullanıldı.

### **3.6. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini**

#### **3.6.1. Malondialdehit (MDA) Tayini**

95°C'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin absorbansının 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.<sup>116</sup>

#### **3.6.2. Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini**

MPO aktivitesi tayini için, substrat olarak 4-amino antipirin/fenol solüsyonunun yer aldığı MPO aracılı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile yapılan oksidasyon reaksiyonu kullanılmıştır.<sup>117</sup>

#### **3.6.3. Total Glutatyon (tGSH) Tayini:**



Ölçüm için kullanılan DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] disülfid bir kromojendir ve sülfidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. Meydana gelen sarı renk 412 nm spektrofotometrik olarak ölçülür.<sup>118</sup>

### **3.7. COX Aktivite Analizi**

COX aktivite analiz kiti COX' un POX aktivitesini ölçmektedir. Reaksiyonun prensibi okside N,N,N,N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD) oluşumunun 590 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanır.

### **3.8. Reaktiflerin Hazırlanması**

**3.8.1. Analiz Tamponu:** 3mL analiz tamponu 27 mL HPLC-grade su ile seyreltilerek hazırlandı.

**3.8.2. Hem Reaktifi:** 88 µl hem çözeltisi, önceden hazırlanmış 1.912 mL analiz tamponu ile seyreltildi.

**3.8.3. Araşidonik Asit Çözeltisi:** 100 µl araşidonik aside 100 µl KOH ilave edilip Vortex ile karıştırıldı. Bu karışım 1.8 mL HPLC-grade su ile seyreltildi. Bu reaktiflere ilaveten COX standardı, kolorimetrik substrat, DuP-697 (COX-2 inhibitörü), SC-560 (COX-1 inhibitörü) kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunmaktaydı.

### **3.9. Deneyin Yapılışı**

96 kuyucuk içeren mikroplatenin, kuyucuklarına (well) numune, her bir numune için numune körü, inhibitör ve standart kuyucukları işaretlendi. Numuneler dolaptan çıkarıldı ve çözündükten sonra numune körü için her bir numuneden 50 µl alındı ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Daha sonra mikro santrifüjde, 8000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant numune körü olarak kullanıldı. COX standart kuyucuğuna, numune ve numune körü kuyucuklarına 150 µl analiz tamponu ve 10 µl hem çözeltisi konuldu. Ardından sırasıyla kuyucuklara standart, numune ve inaktif numunelerden 10 µl eklendi. İnhibitör

kuyucuklarına ise 140 µl analiz tamponu, 10 µl hem çözeltisi, 10µl numune, 10 µl SC-560 çözeltisi ilave edildi. Plate çalkalayıcıda birkaç saniye çalkalandıktan sonra 5 dakika 25 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara önce 20 µl kolorimetrik substrat sonra 20 µl araşidonik asit çözeltisi ilave edildi. Plate birkaç saniye karıştırıcıda karıştırıldı ve 5 dk 25 C’de inkübasyonda tutulduktan sonra 590 nm dalga boyunda absorbanslar okundu. Aşağıda verilen formül yardımıyla total COX aktivitesi ve COX-1, COX-2 aktiviteleri hesaplandı. Her numune için total COX aktivitesi hesaplandıktan sonra, SC-560 ile muamele edilmiş numunelerin COX aktiviteleri aynı formülle hesaplandı. Bu sonuçlar numunelerin COX-2 aktiviteleriydi. Total COX aktivitelerinden COX-2 aktiviteleri çıkarılarak numunelerin COX-1 aktivite sonuçları elde edildi. 25 °C’de, 1 dakikada, 1 nmol TMPD’yi okside eden enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak alınıp, örneklerdeki enzim aktiviteleri gram yaş doku başına enzim ünitesi olarak verildi.

$$\text{Total COX Aktivitesi} = \frac{\Delta A_{590}/5 \text{ min}}{0,00826 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,21 \text{ mL}(\text{TH})}{0,01 \text{ mL}(\text{NH})} \div 2^*$$

TH: Total hacim

NH: numune hacmi

\* $\text{PGG}_2$ 'nin  $\text{PGH}_2$ 'ye indirgenmesi için 2 mol TMPD harcanır. Bu yüzden sonuçlar ikiye bölündü.

### 3.10. İmmunohistokimyasal İşlemler

İmmunohistokimyasal işlemlerin yapılması için %10'luk formalin içinde bekletilen sıçan böbrek materyallerinden, 4 mikron kalınlığında kesitler pozitif şarjlı lam üzerine alındı. Leica Bond-Max otomatik immunohistokimya aletine yerleştirildikten sonra 30 dakika 60 °C’de parafinin erimesi sağlanır. Bu işlemin

ardından, 15 dakika dewax solüsyonunda tutularak kesitlerin deparafinizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra kesitler 15 dakika % 99'luk alkolde tutularak rehidratasyon işlemi tamamlandı ve Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkama işlemi yapıldı. Epitop 2 solüsyonunda antijen retrieval işlemi gerçekleştirildikten sonra Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkama işlemi tekrarlandı. Örnekler %3'lük hidrojen peroksidazda 10 dakika, Nova Castra marka Bcl-2 (B hücreli lenfoma-2) antikoru damlatıldıktan sonra ise 60 dakika bekletildi. Bu işlemin ardından örnekler önce Post Primer solüsyon damlatılarak 3 dakika bekletildi, daha sonra Polimer solüsyon damlatılarak 10 dakika bekletilir. Bu prosedürler uygulanmadan önce örnekler Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkama işlemine tabi tutuldu. Wash Buffer solüsyonundaki yıkamadan sonra, saf suda 3 dakika yıkama işlemi uygulandı. Örnekler DAB+Choromogen damlatıldıktan sonrada 3 dakika bekletildi. Örnekler tekrar distile suda yıkandıktan sonra, Hematoksilende 5 dakika boyandı ve son defa distile suda yıkandıktan sonra alkol ve ksilolden geçirilen kesitler entellan ile kapatıldı. Cihaz tarafından yukarıda sayılan basamaklar uygulanarak taramaya hazır hale getirilen kesitler birbirinden bağımsız iki patolog tarafından kör olarak incelemeye alındı. Olympus BX51 mikroskopta yapılan incelemelerde, aşağıdaki gradeleme sistemi kullanılarak interstisyum, glomerül ve tübül yapıları ayrı ayrı Bcl-2 ile boyanma paternlerine göre değerlendirildi. Bu değerlendirmede yaygınlık ve yoğunluk ayrı ayrı göz önünde bulunduruldu. Yaygınlık, boyanın ne kadar alanda var olduğunu, yoğunluk ise boyanma şiddetini gösterir. Yaygınlık için gradeleme: + işareti % 10 un altı, ++ işareti % 10-50'nin altı, +++ işareti % 50 ve üzerindeki hücrelerin boyanmasını ifade etmektedir. Yoğunluk için gradeleme + işareti hafif, ++ işareti orta, +++ işareti hücrelerin şiddetli boyanmasını göstermektedir.

### **3.11. İstatistiksel Analizler**

Deneylerden elde edilen sonuçlar “ortalama değer  $\pm$  standart hata” (  $\bar{x} \pm SEM$  ) olarak ifade edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi one-way ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Takibinde Fisher’s post-hoc LSD (least significant differences) yapıldı. Tüm istatistiksel işlemler “IBM SPSS Statistics Version 20” istatistik programında yapıldı ve  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

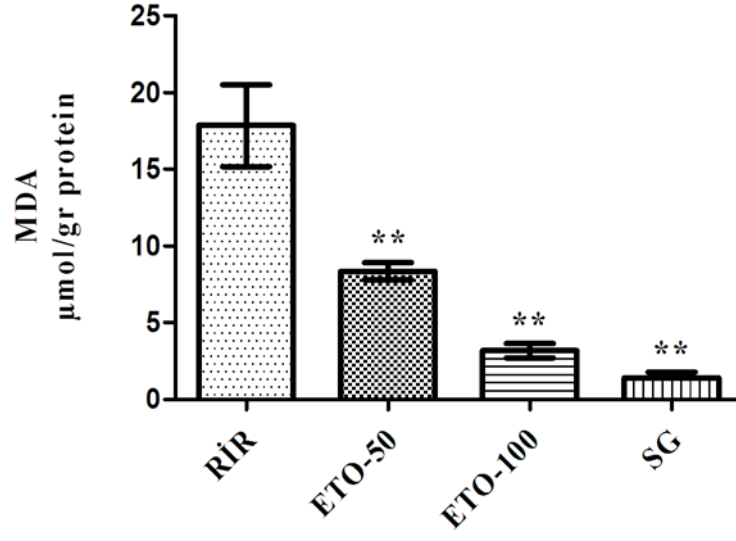
#### 4.1.1. MDA Analiz Sonuçları

Tablo 4.1. ve Şekil 4.1’de görüldüğü gibi RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG sıçan gruplarının böbrek dokusunda MDA miktarı sırası ile  $17.8 \pm 2.6$ ,  $8.3 \pm 0.5$ ,  $3.1 \pm 0.4$ ,  $1.4 \pm 0.3$   $\mu\text{mol/gr}$  protein olarak ölçülmüştür.

**Tablo 4.1.** Sıçan böbrek dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarında MDA düzeyi, MPO aktivitesi ve tGSH düzeyleri.

GRUPLAR	MDA $\mu\text{mol/gr}$ protein	MPO u/gr protein	tGSH nmol/gr protein
RİR	$17.8 \pm 2.6$	$28.5 \pm 2.2$	$2.6 \pm 0.6$
p	-	-	-
ETO-50	$8.3 \pm 0.5$	$12.3 \pm 1.3$	$6.3 \pm 0.7$
p	<0.0001	<0.0001	<0.05
ETO-100	$3.1 \pm 0.4$	$5.5 \pm 0.7$	$12.6 \pm 1.2$
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001
SG	$1.4 \pm 0.3$	$2.6 \pm 0.6$	$14.1 \pm 1.1$
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001

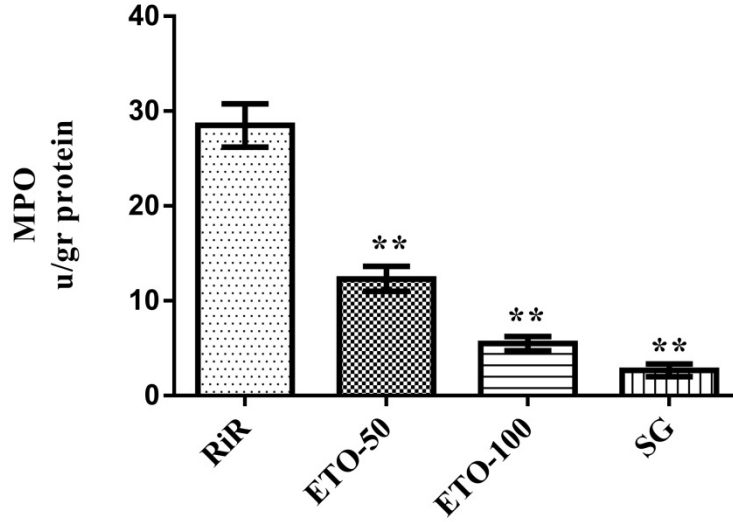
Gruplar RİR grubu ile karşılaştırıldı ve  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirtildi. (N=6).



**Şekil 4.1.** Sıçan böbrek dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarında MDA düzeyleri. Gruplar RİR grubu ile karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. \*\*  $p < 0.0001$  değerini ifade etmektedir. (N=6).

#### 4.1.2. MPO Analiz Sonuçları

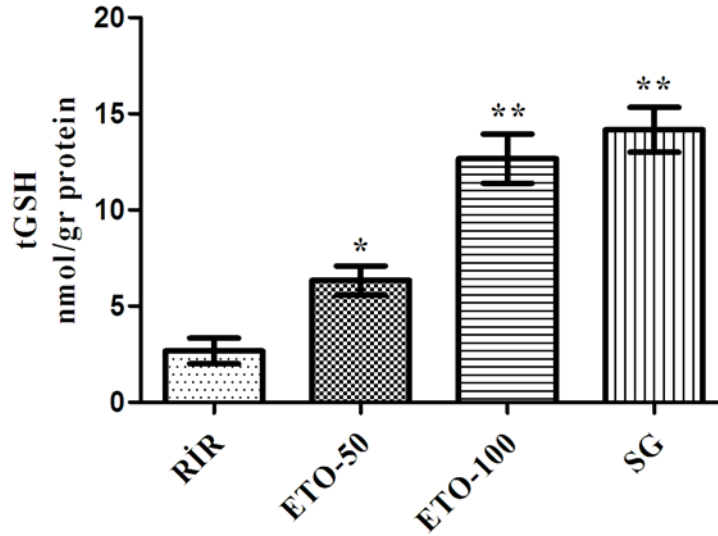
Tablo 4.1. ve Şekil 4.2.'de görüldüğü gibi RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG sıçan gruplarının böbrek dokusunda MPO aktivitesi sırasıyla  $28.5 \pm 2.2$ ,  $12.3 \pm 1.3$ ,  $5.5 \pm 0.7$  ve  $2.6 \pm 0.6$  u/gr protein olarak ölçülmüştür.



**Şekil 4.2.** Sıçan böbrek dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarında MPO aktiviteleri. Gruplar RİR grubu ile karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. \*\*  $p < 0.0001$  değerini ifade etmektedir. (N=6).

#### 4.1.3. tGSH Analiz Sonuçları

Tablo 4.1. ve Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi tGSH analizi RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG sıçan gruplarının böbrek dokusunda sırası ile  $2.6\pm 0.6$ ,  $6.3\pm 0.7$ ,  $12.6\pm 1.2$  ve  $14.1\pm 1.1$  nmol/gr protein olarak ölçülmüştür.



**Şekil 4.3.** Sıçan böbrek dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarında tGSH düzeyleri. Gruplar RİR grubu ile karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.0001$  değerini ifade etmektedir. (N=6).



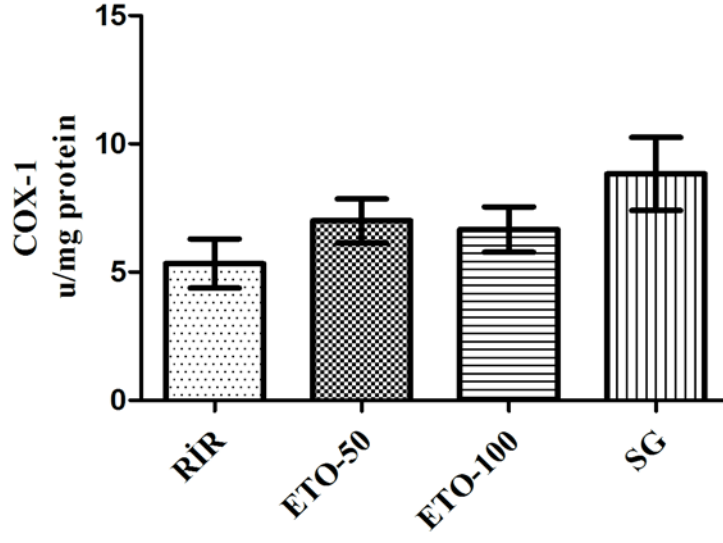
#### 4.1.4. COX-1 Analiz Sonuçları

Tablo 4.2. ve Şekil 4 de görüldüğü gibi RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG sıçan gruplarının böbrek dokusunda ölçülen COX-1 aktivitesi sırası ile  $7.8\pm 1.4$ ,  $7.0\pm 0.8$ ,  $6.6\pm 0.8$  ve  $8.8\pm 1.4$  u/mg protein olarak ölçülmüştür.

**Tablo 4.2.** Sıçan böbrek dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarında COX-1 ve COX-2 aktiviteleri.

GRUPLAR	COX-1 u/mg protein	p	COX-2 u/mg protein	p
RİR	$7.8\pm 1.4$	-	$17.6\pm 1.5$	-
ETO-50	$7.0\pm 0.8$	>0.05	$4.5\pm 0.7$	<0.0001
ETO-100	$6.6\pm 0.8$	>0.05	$2.3\pm 0.5$	<0.0001
SG	$8.8\pm 1.4$	>0.05	$0.7\pm 0.1$	<0.0001

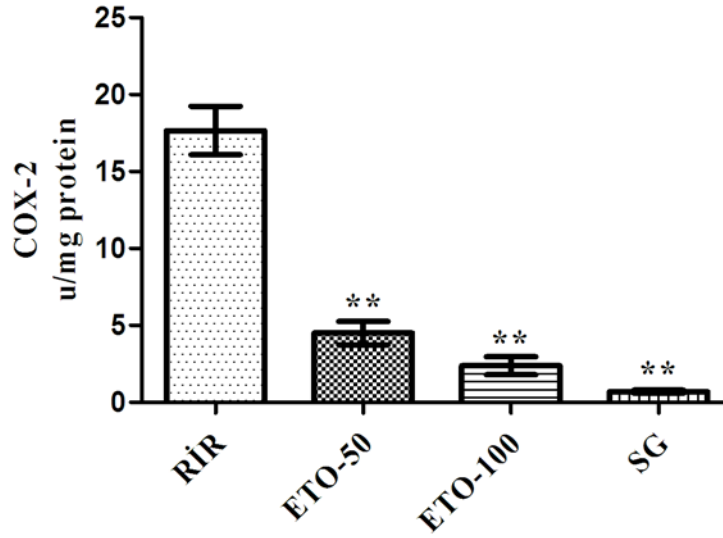
Gruplar RİR grubu ile karşılaştırıldı ve  $p<0.05$  değeri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirtildi. (N=6).



**Şekil 4.4.** Sıçan böbrek dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarında COX-1 aktiviteleri. Gruplar RİR grubu ile karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. (N=6).

#### 4.1.5. COX-2 Analiz Sonuçları

Tablo 4.2. ve Şekil 4.5.'de görüldüğü gibi RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG sıçan gruplarının böbrek dokusunda ölçülen COX-2 aktivitesi sırası ile gruplarda  $17.6 \pm 1.5$ ,  $4.5 \pm 0.7$ ,  $2.3 \pm 0.5$ ,  $0.7 \pm 0.1$ , u/mg protein olmuştur.

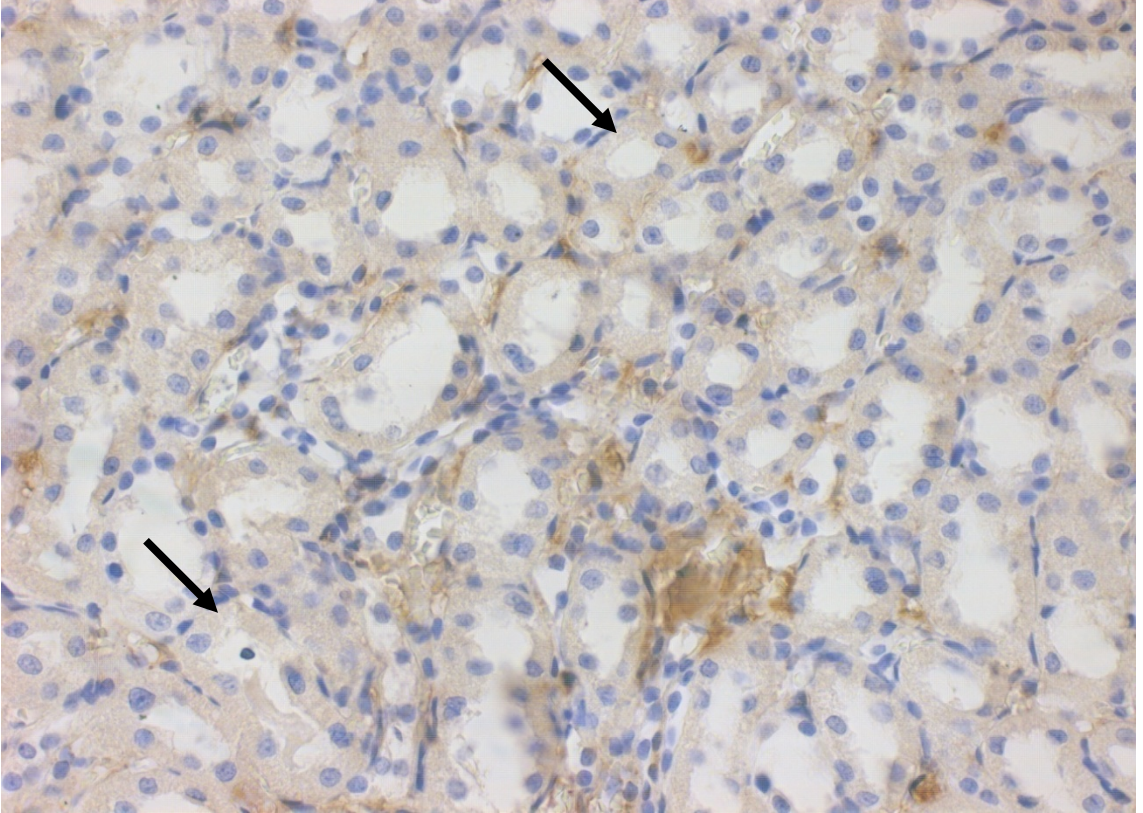


**Şekil 4.5.** Sıçan böbrek dokusunda RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarında COX-2 aktiviteleri. Gruplar RİR grubu ile karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. \*\*  $p < 0.0001$  değerini ifade etmektedir.

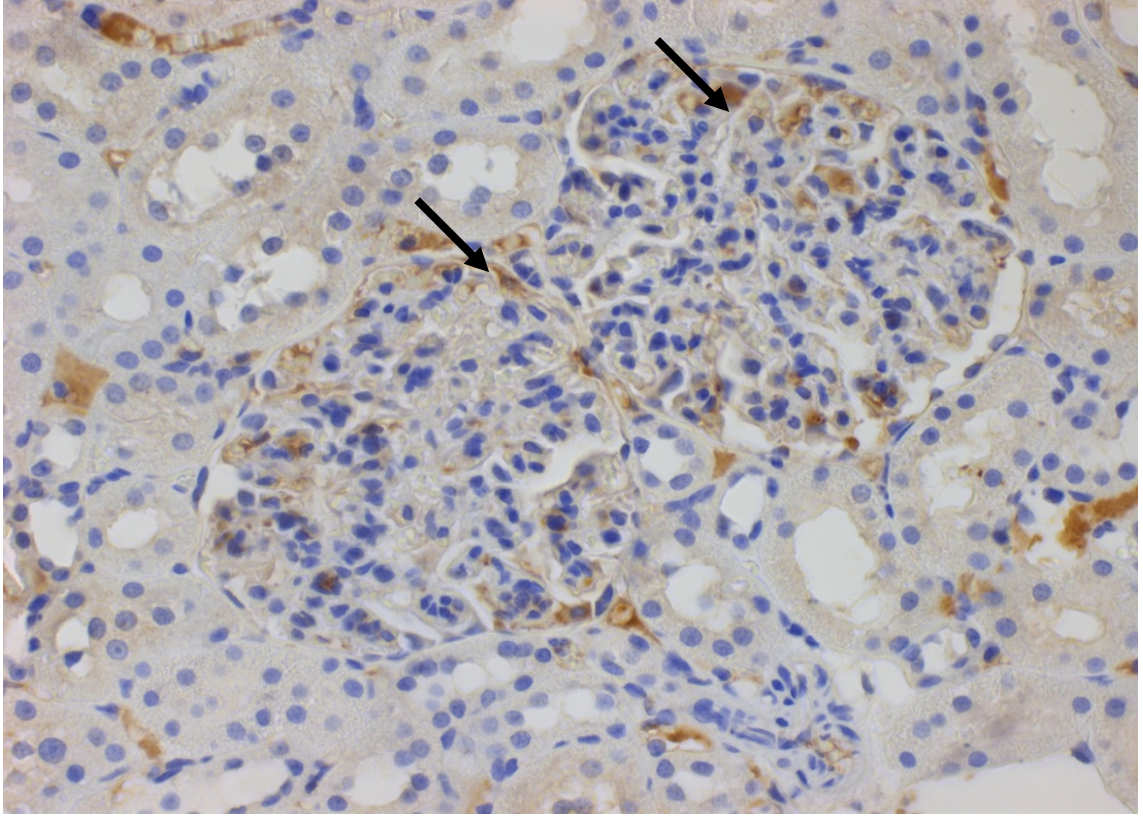
## 4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

### 4.2.1. RİR Sıçan Grubu Böbrek Hücreleri

RİR grubunun tübül ve glomerül hücrelerinde boyanma alanı %10'dan küçük olurken, boyanma yoğunluğu hafif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7., Bcl-2 X 200).



Şekil 4.6. RİR grubunun böbrek tübül hücrelerinde Bcl-2'nin yaygınlık ve yoğunluk derecesi.

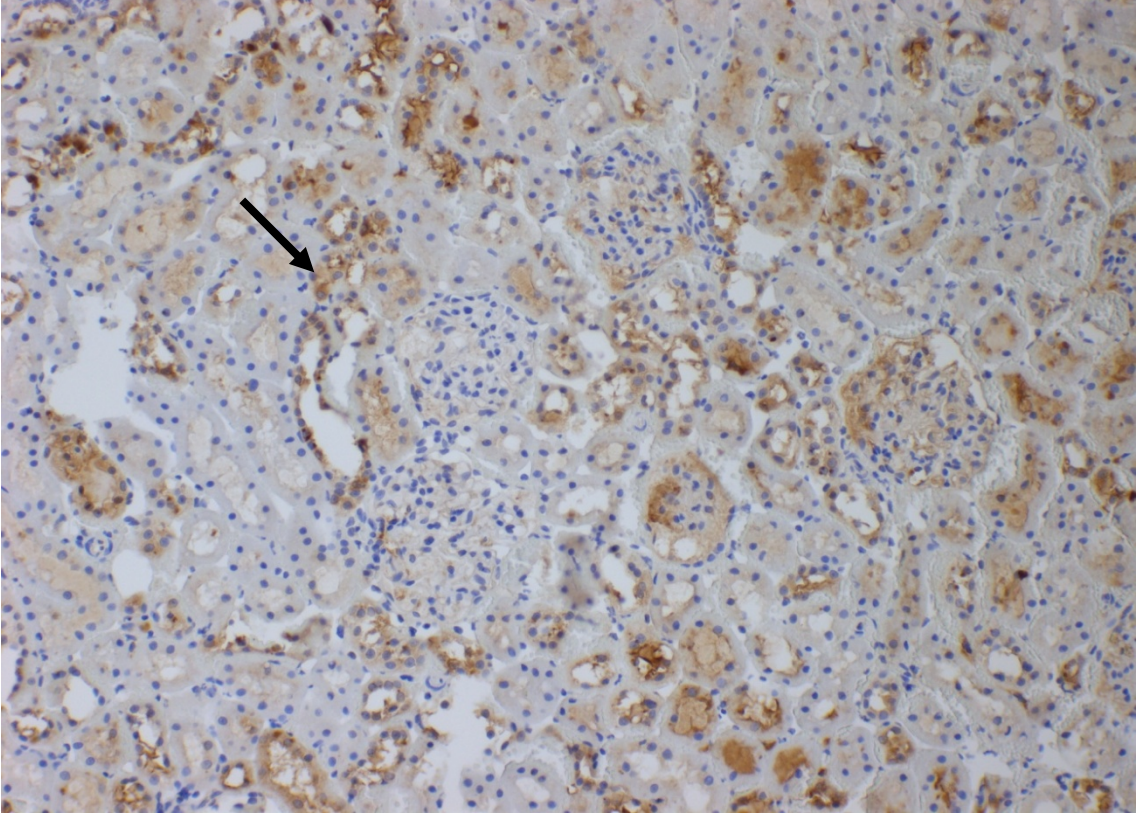


Şekil 4.7. RİR grubunun böbrek glomerül hücrelerinde Bcl-2'nin yaygınlık ve yoğunluk derecesi.

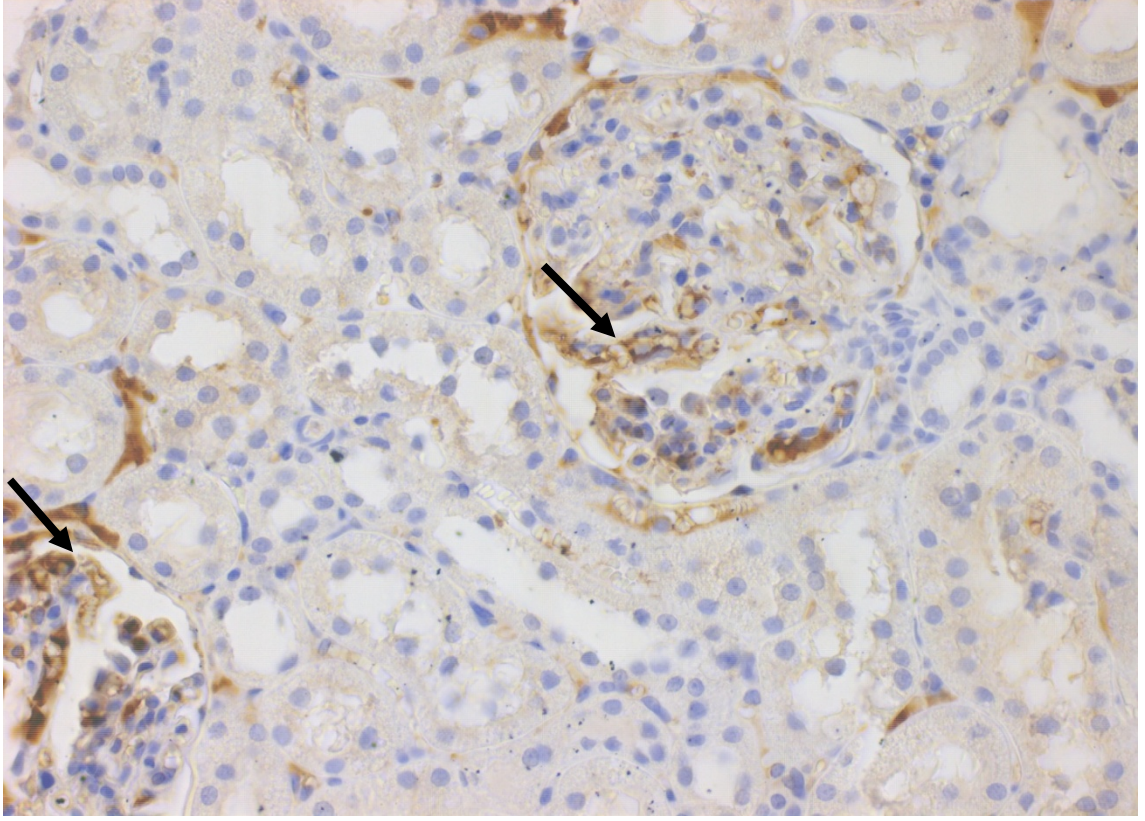


#### 4.2.2. ETO-50 Sıçan Grubu Böbrek Hücreleri

Fakat ETO-50 grubunun tübül hücrelerinde boyanma alanı % 50'den büyük, boyanma yoğunluğu ise hafif olarak izlenmiştir (Şekil 4.8., Bcl-2 X 200). ETO-50 grubunun glomerül hücrelerindeki boyanma alanı aynı olurken, boyanma yoğunluğu orta şiddette görülmüştür (Şekil 4.9., Bcl-2 X 200).



Şekil 4.8. ETO-50 grubunun böbrek tübül hücrelerinde Bcl-2'nin yaygınlık ve yoğunluk derecesi.

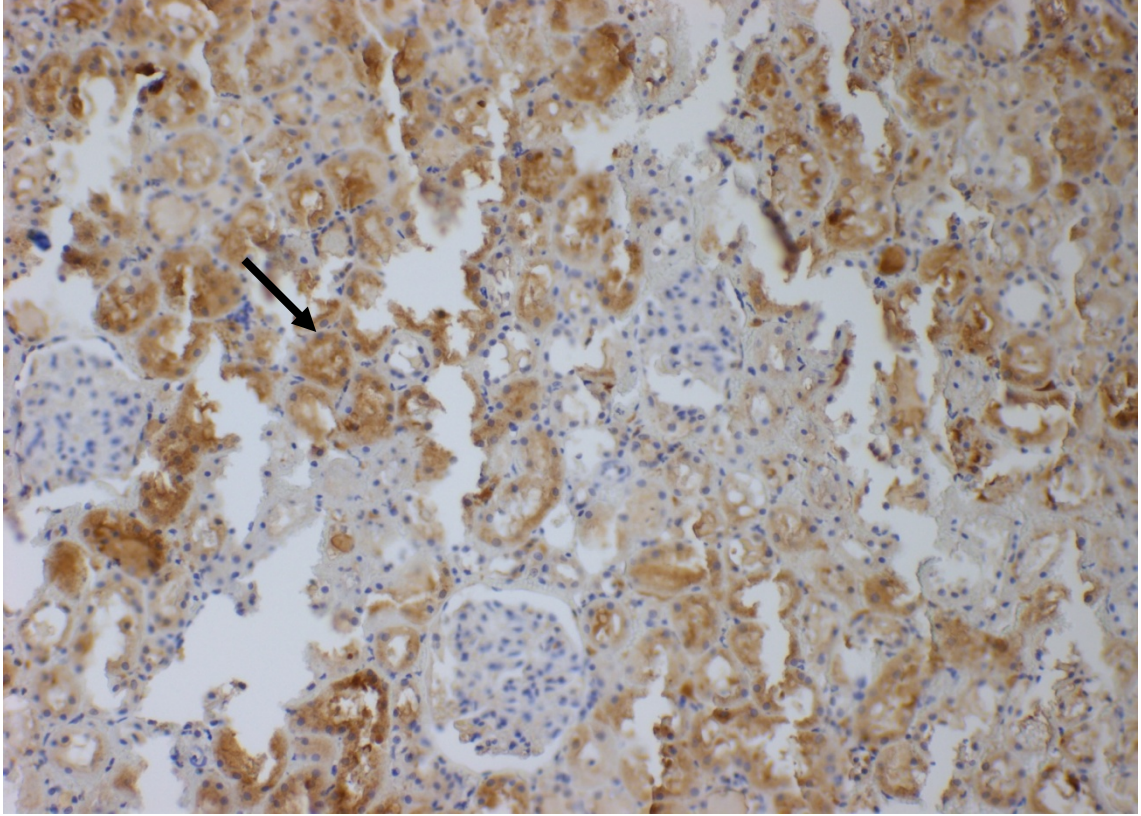


**Şekil 4.9.** ETO-50 grubunun böbrek glomerül hücrelerinde Bcl-2'nin yaygınlık ve boyanma derecesi



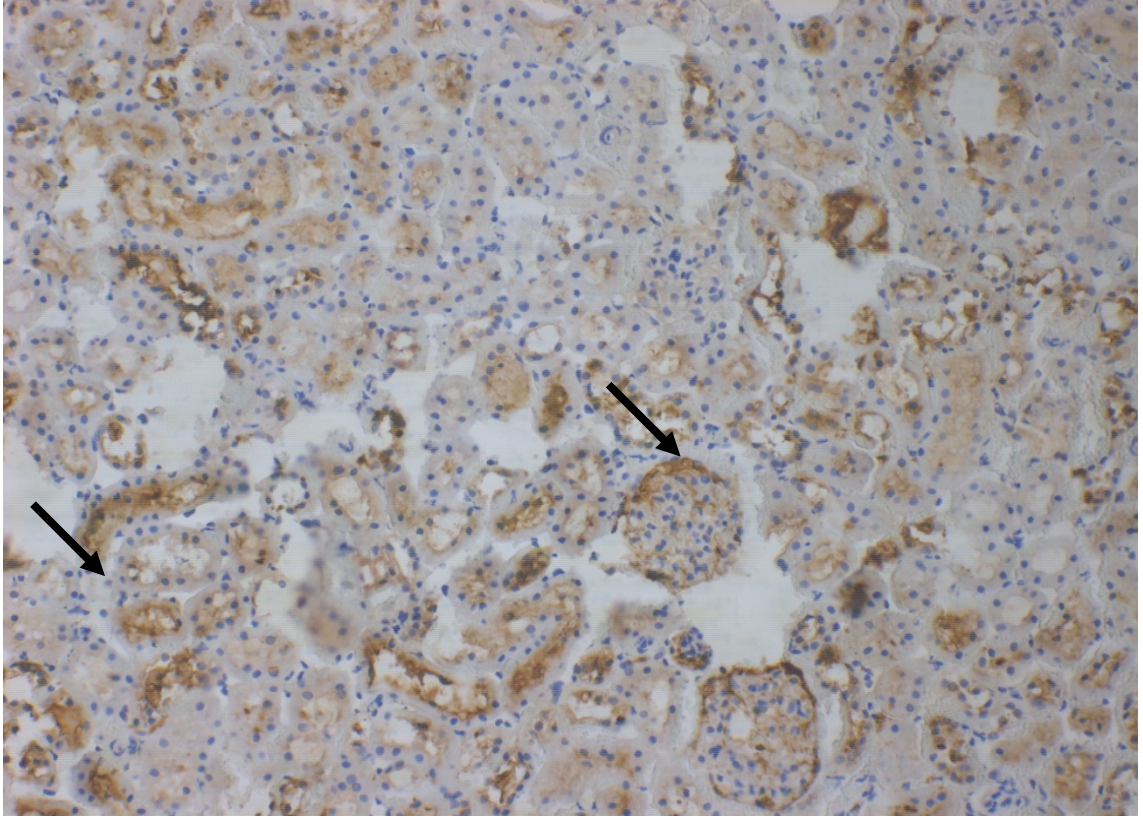
### 4.2.3. ETO-100 Sıçan Grubu Böbrek Hücreleri

ETO-100 grubunun tübül ve glomerül hücrelerinde boyanma alanı % 50'nin üzerinde iken, boyanma yoğunluğu da her iki yapının hücresinde orta şiddette izlendi (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11., Bcl-2 X 200).



Şekil 4.10. ETO-100 böbrek tübül hücrelerinde Bcl-2'nin yaygınlık ve yoğunluk derecesi.

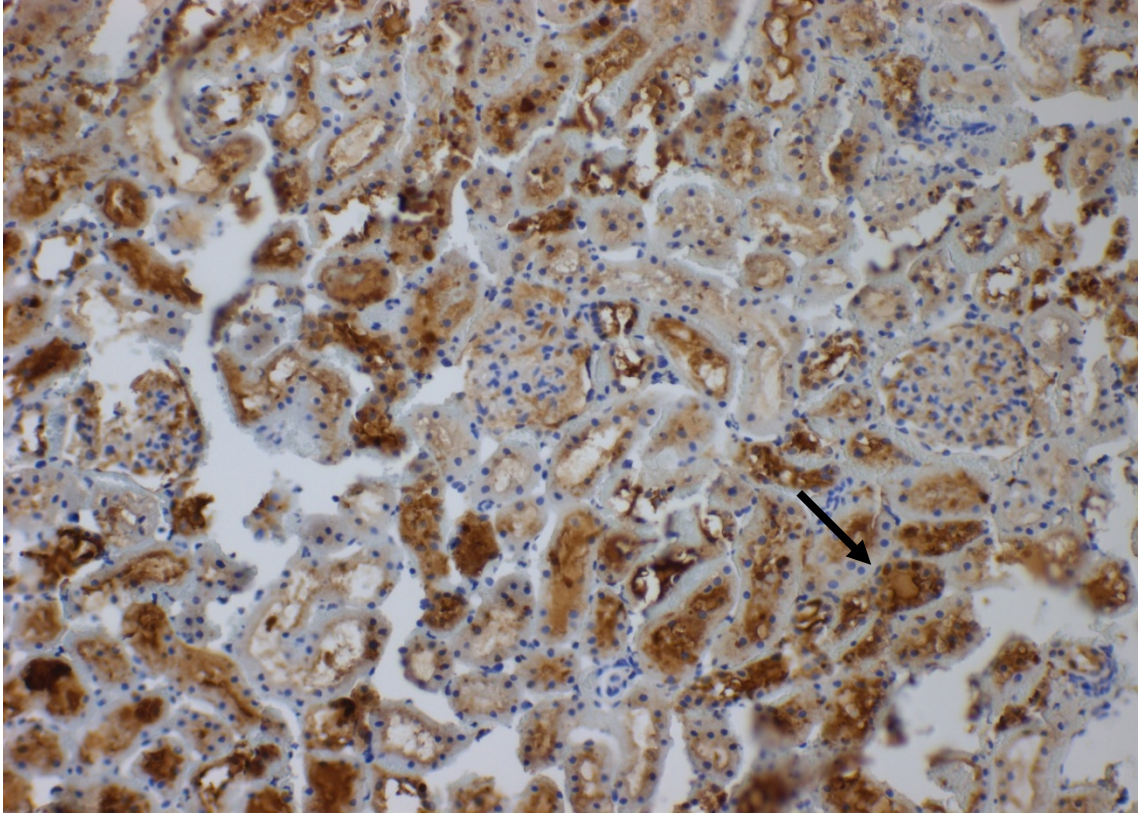




**Şekil 4.11.** ETO-100 böbrek glomerül hücrelerinde Bcl-2'nin yaygınlık ve yoğunluk derecesi

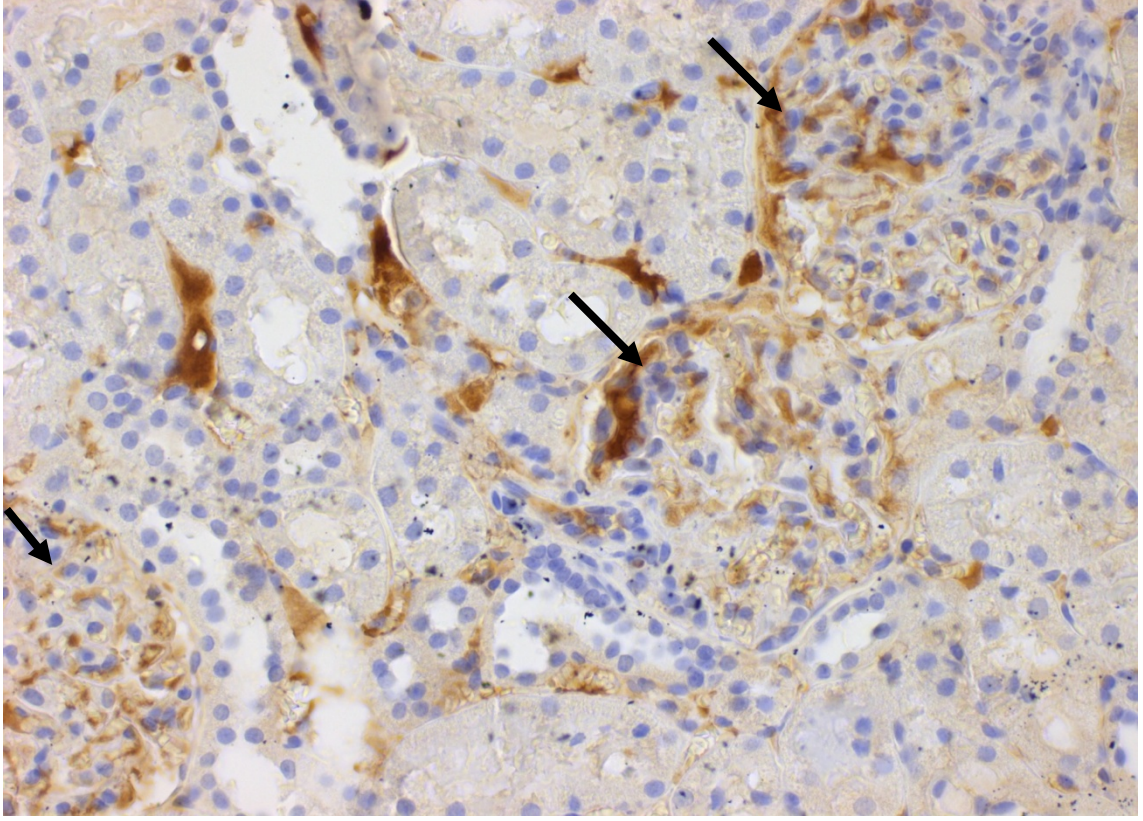
#### 4.2.4. SG Sıçan Grubu Böbrek Hücreleri

SG grubunun tübül hücrelerinin boyanma alını % 50'nin üzerinde iken, boyanma yoğunluğu ise şiddetli olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12., Bcl-2 X 200). Glomerül hücrelerinde de Bcl-2'nin yaygınlık ve yoğunluk derecesi tübül hücrelerinin yaygınlık ve yoğunluk derecesi ile aynı olmuştur (Şekil 4.13., Bcl-2 X 200).



Şekil 4.12. SG böbrek tübül hücrelerinde Bcl-2'nin yaygınlık ve yoğunluk derecesi.





Şekil 4.13. SG böbrek glomerül hücrelerinde Bcl-2'nin yaygınlık ve boyanma derecesi.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, etorikoksibin sıçan böbreklerinde İ/R ile oluşturulan hasara etkisi biyokimyasal ve immunohistokimyasal olarak araştırıldı. Deney sonuçlarımız, İ/R işleminin böbrek dokusunda belirgin oksidatif hasar oluşturduğunu göstermiştir. Bilindiği gibi, reperfüzyon, iskemik hasarın düzeltilebilmesi için uygulanan önemli bir cerrahi tedavi yöntemidir. Ancak, reperfüzyonla bol miktarda oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi, iskemik dokunun daha fazla hasarına neden olmaktadır.<sup>1</sup> Bu nedenle reperfüzyon hasarından, iskemili dokuya bol miktarda sunulan oksijen sorumlu tutulmaktadır. İ/R hasarının mekanizmasına yönelik çalışmalar, iskemili dokunun yeniden oksijenlenmesi ile büyük miktarlarda serbest oksijen radikallerinin üretildiğini göstermiştir.<sup>119</sup> Serbest oksijen radikallerinin hücrelerde başlattığı en zararlı etki lipid peroksidasyonudur.<sup>120</sup> Lipid peroksidasyonu, hücre membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar. Bu reaksiyon lipid radikalinin oluşmasına yol açar. Lipid radikali daha sonra moleküler oksijenle etkileşir ve lipidperoksid radikaline (LOO-) dönüşür. LOO- zincirleme reaksiyonunu başlatır ve membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek hidroperoksit (ROOH) radikali ve lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA oluşumu ile sonlanır.<sup>39</sup> MDA, ek olarak membran bileşenlerinin çapraz bağ yapmalarına ve hücre hasarının daha da şiddetlenmesine neden olur.<sup>1, 39</sup>

Çalışmamızda, İ/R uygulanan böbrek dokusunda MDA miktarı ETO-50, ETO-100 ve SG sıçan gruplarına göre çok daha anlamlı yüksek bulunmuştur. İ/R grubu böbrek dokusundaki MDA miktarı ile ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarının MDA miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İ/R'nin oluşturduğu hasarlı dokuda MDA miktarının yükseldiğini gösteren çok sayıda bilimsel çalışmalar bulunmaktadır.<sup>121, 122</sup> Altuner D ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda, İ/R

işleminin böbrek dokusunda oksidatif hasar oluşturduğu bildirilmiştir.<sup>123</sup> İ/R hasarına karşı denenen etorikoksib, İ/R uygulanmış hasarlı böbrek dokusunda artan MDA miktarını doza bağımlı olarak anlamlı azaltmıştır. Bu da, deney sonuçlarımızın literatür bilgileri ile uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

Yine, İR oluşturulan böbrek dokusunda MPO aktivitesi, SG ve etorikoksib alan gruplara göre daha yüksek bulundu. Bilindiği gibi MPO, polimorf nükleer lökositlerin (PNL) infiltrasyonu ve aktivasyonunun bir parametresi olarak tanımlanmaktadır.<sup>124</sup> İ/R hasarında serbest oksijen radikalleri PNL'leri aktive eder. Aktive olmuş PNL'ler ise MPO gibi çeşitli enzimleri ve serbest oksijen radikalleri salıverirler buna bağlı olarak hasarı daha da şiddetlendirirler.<sup>125</sup> Aktive PNL'lerden salıverilen MPO, klorür iyonlarının varlığında hidrojen peroksidi hipoklorik aside indirger. Hipoklorik asit, birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilen ve şiddetli doku hasarına yol açabilen bir oksidandır.<sup>28</sup> Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar PNL aktivasyon derecesi ile reperfüzyon hasar derecesi arasında bir bağlantının olduğunu göstermiştir.<sup>126</sup> Son yıllarda yapılan çalışmalarda Kumbasar S ve arkadaşları, İ/R uygulanmış over dokusunda MPO aktivitesinin yükseldiğini rapor etmişlerdir.<sup>127</sup> Etorikoksib, İ/R işleminin yol açtığı böbrek hasarında MDA ve MPO gibi oksidan parametrelerin artışı, endojen antioksidan parametre olan tGSH miktarının ise azalmasını anlamlı olarak önlemiştir.

Fizyolojik şartlarda oksidan/antioksidan denge antioksidanların üstünlüğüyle sürdürülmektedir. Bu dengenin bozulması doku hasarına yol açmaktadır. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır ve doku hasarının oluşup oluşmadığı oksidan/antioksidan dengesi ile değerlendirilmektedir. Canlı dokularda oluşturulan çeşitli hasar modellerinde oksidan/antioksidan dengenin oksidanların lehine değiştiği ve oksidan seviyelerinde artış, antioksidan seviyelerinde azalma olduğu rapor

edilmektedir.<sup>31</sup> Bu da, dokularda sürekli bir şekilde oksidan mekanizmalara karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan mekanizmaların kontrollü bir şekilde üretildiğini göstermektedir. Oksidatif hasara karşı hücre savunmasında non-enzimatik endojen antioksidanların en önemlilerinden biri tGSH'dır. GSH canlı dokularda hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksil (OH<sup>-</sup>), süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), alkoksil (RO<sup>·</sup>) radikalleri ile direkt olarak etkileşime girer ve hücreyi serbest radikallerin hasar oluşturucu etkisinden korur.<sup>128</sup> Yüksek GSH miktarı, hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesidir.<sup>52</sup> GSH miktarının düşmesi ise hücre içi savunma sisteminin zayıflaması ve hasar belirteçleri olarak kabul edilir.<sup>129</sup> Çalışmalar İ/R döneminde böbreklerde glutasyon düzeyinin azaldığı ve İ/R süresince bu azalmanın yoğun oksidatif stresten ileri geldiğini göstermektedir.<sup>130</sup> Tok A ve arkadaşları da sıçan böbreklerinde İ/R işlemimin tGSH miktarında azalmaya yol açtığını ve ciddi oksidatif hasar oluşturduğunu ve bu hasarın antioksidan aktivite ile azaltılabileceğini ortaya koymuşlardır.<sup>131</sup> Demiryılmaz ve arkadaşları da İ/R uygulanmış over dokusunda MDA artışına paralel olarak tGSH miktarının azaldığını belirtmişlerdir.<sup>132</sup> Oksidan parametreler iskemi sonrası reperfüzyon döneminde artmaktadır. Bu nedenle serbest oksijen radikalleri reperfüzyon mediyatörleri olarak da bilinmektedir. Deney sonuçlarımız ve literatür bilgileri, etorikoksibin böbrek dokusunda İ/R ile indüklenen oksidatif hasarı antioksidan özelliğiyle önlediğini ortaya koymaktadır. Etorikoksibin deneysel beyin iskemisine bağlı oksidatif stresi anlamlı önlediği bildirilmiştir.<sup>21</sup> Etorikoksibin, İ/R'nin oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruyucu etkisine ait herhangi bir literatür bilgilerine rastlanmasa da, farklı yöntemlerle oluşturulan oksidatif doku hasarında antioksidan aktivite gösterdiğine ait literatürler bulunmaktadır.<sup>133</sup>

Çalışmamızda ayrıca, RİR grubunun böbrek dokusunda COX-2 aktivitesi ETO-50, ETO-100 ve SG grubunun böbrek dokusundaki COX-2 aktivitesinden çok daha

yüksek olduğu görülmüştür. RİR grubundaki COX-2 aktivitesi ile ETO-50, ETO-100 ve SG gruplarındaki COX-2 aktivitesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Etorikoksibin COX-2 enzim aktivitesini anlamlı baskıladığı, COX-1 üzerindeki inhibitör etkisinin ise istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptanmıştır. Son zamanlarda İ/R hasarı, dokunun oksijensiz kalması ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile devam eden ve inflamatuvar yanıtla genişleyen karmaşık patolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır.<sup>24</sup>

İ/R hasarındaki, inflamasyonun şiddetlenmesinde proinflamatuvar PNL'lerin rolünün olduğu bilinmektedir. Post-iskemik dokular, PNL'leri aktive edebilen inflamatuvar mediyatörler üretir.<sup>134</sup> PNL'lerin aktivasyonu iskemi döneminde intrasellüler kalsiyumun artmasına ve fosfolipaz A2'nin aktive olmasına neden olur. Fosfolipaz A2 membran fosfolipidlerinden araşidonik asit üretimini artırır. Doku İ/R hasarında siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimi aktifleşir ve araşidonik asitten proinflamatuvar prostoglandinler ve serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasını sağlar.<sup>16, 27, 29, 135</sup> İsaoglu U ve arkadaşları da çalışmalarında iskemi-reperfüzyon oluşturulmuş over dokularında COX-1 aktivitesinde azalma, COX-2 aktivitesinde artma olduğunu işaret etmişlerdir; ayrıca çalışmada COX-1 aktivitesi düşük, COX-2 aktivitesi yüksek bulunan hasarlı dokuda oksidan parametreler düzeyi yüksek, antioksidan parametreler düzeyi düşük bulunmuştur.<sup>30</sup> Bilindiği gibi, COX-1 sitoprotektif prostaglandinlerin sentezinde iştirak eder.<sup>121</sup> COX-2 ise proinflamatuvar ajanlarla aktive edilmektedir.<sup>136</sup> Bu nedenle, COX-1 inhibisyonu doku hasarına, COX-2 inhibisyonu ise hasarın baskılanmasına neden olmaktadır. COX-2 üretimi sağlıklı dokularda çok düşük iken, inflamasyonlu dokularda COX-2 aktivitesi belirgin artış göstermektedir.<sup>137</sup> İ/R uygulanmayan SG grubunda COX-2 aktivitesinin çok düşük, RİR grubunda ise çok daha yüksek olması deney sonuçlarımızın literatür bilgileri ile örtüştüğünü işaret

etmektedir. COX-2' nin inflamasyonun şekillenmesinden sorumlu bir enzim olduğu bilinmektedir. COX-2, inflamasyonu başlatan proinflamatuvar prostaglandin (PG) üretimini sağlar. COX-2 enzim ürünü olan bu PG'ler inflamatuvar reaksiyonlarda major mediyatörlerdir.<sup>138</sup> Farelerde siklooksijenaz enzim inhibisyonuyla karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarının azaltıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca İ/R hasarında COX aktivitesinin yükselmesi iskemi döneminde hücre membranının kalsiyum iyonlarına karşı geçirgenliğinin artmasından ileri geldiği bildirilmiştir.<sup>14</sup> Bu literatür bilgileri de, çalışma sonuçlarımızın doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Yine bu çalışmamızda, İ/R uygulanmış ve etorikoksib ile tedavi edilmiş sıçan gruplarının böbrek dokuları immunohistokimyasal olarak incelendi. Deney sonuçları, immunohistokimyasal bulguların, biyokimyasal bulgularla örtüştüğünü göstermiştir. MDA, MPO ve COX-2 düzeyleri yüksek, tGSH miktarı düşük bulunan RİR grubunun böbrek tübül ve glomerül dokusunda immunohistokimyasal parametre olan Bcl-2 gen ekspresyonu da hafif bulunmuştur. İ/R uygulanan hasarlı dokuda MDA, MPO ve COX-2 düzeylerinin artışı, tGSH miktarının ise düşmesini önleyen etorikoksibin, Bcl-2 gen ekspresyonunu doza bağımlı olarak artırdığı görülmüştür. Bcl-2 geni, anti-apoptotik role sahip olan bir onkoproteindir. Bcl-2 onkoproteininin endotelial hücrelerin apoptozise uğramasını önleyerek sağ kalma sürelerini uzattığı bildirilmiştir. Bcl-2 hücre proliferasyonuna neden olmadan, hücrenin canlılığını sağlayan apoptozu inhibe eder ve değişik stimuluslar tarafından başlatılan hücre ölümünü belirgin derecede azaltır.<sup>22, 23</sup> Bcl-2'nin kaspazları direkt ve indirekt mekanizmalarla engelleyerek apoptozu önlediği rapor edilmiştir.<sup>72</sup> Ito T ve arkadaşları da Bcl-2'nin, serbest radikallerin oluşturduğu hücre ölümünü azalttığını bildirmişlerdir.<sup>139</sup> Fennell DA ve arkadaşları ise, Bcl-2'nin bu koruyucu etkiyi mitokondrilerden sitokrom-c ve apoptozu uyaran faktör (AIF)'un sitoplazmaya salınımını önleyerek oluşturduğunu ortaya koymuşlardır.<sup>73</sup> Sitokrom-c



enziminin mitokondrilerden sitoplazmaya salınışını gerçekleştiren faktörlerden bazılarının caspase-3 ve caspase-8 olduğu gösterilmiştir.<sup>74</sup> Deneysel çalışmalar, bazı maddelerin sitokrom-c translokasyonunu inhibe ederek, sitokrom-c bağımlı caspase-3 ve caspase-9 aktivasyonunu baskılayarak ve Bcl-2/Bax oranını normale getirerek yaptığını göstermiştir.<sup>140</sup> Bcl-2'nin anti-apoptotik etkisinin bir başka mekanizması Bax'sı (bcl-2-associated x protein) inhibe etmesidir.<sup>67</sup> Bax, Pro-apoptotik aktivite gösteren Bcl-2 ailesinin üyelerinden biridir.<sup>69</sup> Bu bilgiler de apoptozun, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki denge tarafından düzenlendiğini işaret eder. Deney sonuçlarımız ve literatür bilgileri, Bcl-2'nin hücre apoptozisini önlediğini göstermektedir ve ayrıca doku hasarının indüklenmesinde apoptozisin stimülasyonunun, önlenmesinde ise inhibiyonunun önemli olduğunu açıklamaktadır. Apoptozis kontrollü hücre ölümüdür. Yani genetik olarak kontrol edilebilen kendine has bir programlı ölüm şeklidir.<sup>141</sup> Çalışmamızda, apoptozisin oksidan ve proinflamatuvar parametrelerin yükseldiği, antioksidan parametrelerin düştüğü RİR böbrek dokusunda, etorikoksib alan ve SG gruplarına göre artmış olduğu düşünülmektedir. Literatürlerde de apoptozisin canlı hücrelerinin reperfüzyondan hasar görmelerinde önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir.<sup>142, 143</sup> Yine, apoptozisin endojen antioksidan olan GSH ile yakından ilişkisinin olduğu ileri sürülmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi GSH, hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir. Hücre GSH içeriğinin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasına neden olmaktadır ve apoptotik hücre ölümünün erken sinyalini oluşturmaktadır.<sup>144</sup> Pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktivitenin değerlendirilmesinde Bcl-2 gen ekspresyonu önemli birkaç parametreden biridir. RİR, ETO-50, ETO-100 ve SG grubunun böbrek dokusundaki tGSH miktarı ile Bcl-2 gen ekspresyonu arasında doğrudan bir bağlantının olması çalışma sonuçlarımızın literatür bilgileri ile uyum içerisinde olduğunu gösterir. Yine Bcl-2 gen ekspresyonunun

yüksek olduğu böbrek dokularında (SG, ETO-100) proinflamatuvar COX-2 aktivitesi azalmış, Bcl-2 gen ekspresyonunun düşük olduğu böbrek dokularında ise (İR, ETO-50) COX-2 aktivitesi yüksek olmuştur. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktivite arasındaki dengenin pro-apoptotik aktivite lehine değişmesinin inflamasyona yol açabileceği rapor edilmiştir. Bu literatür bilgileri de deney sonuçlarımızı desteklemektedir.<sup>141</sup> Çeşitli hayvan ve insanlarda iskeminin apoptoza neden olduğu ortaya konmuş olmasına rağmen, <sup>145, 146</sup> artan kanıtlar apoptoz ekspresyonunun öncelikle reperfüzyon sırasında meydana geldiğini işaret etmektedir.<sup>147</sup> Yıldar M ve arkadaşları da İR ile oksidatif stresin olduğu böbrek dokusunda apoptozisin şiddetlendiğini göstermişlerdir.<sup>148</sup>

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İskemi-reperfüzyon hasarının, dokunun oksijensiz kalması ile başlayan, oksidan/antioksidan dengenin oksidanların lehine değişmesi ile devam eden ve inflamatuvar yanıtla genişleyen karmaşık patolojik bir süreç olduğu anlaşılmıştır.

İskemi-reperfüzyon hasarında değişen COX-1/COX-2 aktivite ile oksidan/antioksidan denge arasında doğrudan bir bağlantının olduğu görülmüştür.

İskemi-reperfüzyon hasarında MDA, MPO ve COX-2 düzeylerinin yükselmesiyle Bcl-2 gen ekspresyonunun azaldığı, tGSH ve COX-1 düzeylerinin artmasıyla Bcl-2 gen ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.

Etorikoksib 100 mg/kg dozda İ/R hasarını 50 mg/kg doza göre istatistiksel olarak daha anlamlı önlemiştir. Etorikoksibin bilinen antiinflamatuvar aktivitesinin yanı sıra, antioksidan aktivite oluşturduğu anlaşılmıştır. Bu çalışma sonuçları etorikoksibin klinikte İ/R hasarının önlenmesinde kullanılabileceğini gösterir.

## KAYNAKLAR

1. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion Injury. *Surgical Clinics of North America* 1992, 72: 65-83.
2. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed Graft Function in Kidney Transplantation. *The Lancet*, 2004, 364: 1814-1827.
3. Sheridan AM, Bonventre JV. Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. *Contributions to Nephrology*, 2001: 7-21.
4. Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, Lopez B, Arregui B, Salom MG. N-Acetyl-L-Cysteine Improves Renal Medullary Hypoperfusion in Acute Renal Failure. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 281: 730-737.
5. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of Ischaemia Reperfusion Injury: Central Role of The Neutrophil. *British Journal of Surgery*, 1991, 78: 651-655.
6. Woolfson RG, Millar CG, Neild GH. Ischaemia and Reperfusion Injury in The Kidney: Current Status and Future Direction. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1994, 9: 1529-1531.
7. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. The Effect of Ischemia/Reperfusion on Adenine Nucleotide Metabolism and Xanthine Oxidase Production In Skeletal Muscle. *Journal of Vascular Surgery*, 1990, 12: 8-15.
8. Lien YH, Lai LW, Silva AL. Pathogenesis of Renal Ischemia/Reperfusion Injury: Lessons From Knockout Mice. *Life Sciences*, 2003, 74: 543-552.
9. Baud L, Ardaillou R. Involvement of Reactive Oxygen Species in Kidney Damage. *British Medical Bulletin*, 1993, 49: 621-629.

10. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic Role of Selectins and Their Ligands in Ischemia Reperfusion Injury. *Frontiers In Bioscience*, 2000, 1: 103-109.
11. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Disease States and Inflammation. *Critical Care Medicine*, 1993, 21: 447-463.
12. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP Activates A Reactive Oxygen Species-Dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 2871-2879.
13. Beutler B. Neo-Ligands for Innate Immune Receptors and The Etiology of Sterile Inflammatory Disease. *Immunological Reviews*, 2007, 220: 113-128.
14. Hamada T, Tsuchihashi S, Avanesyan A, Duarte S, Moore C, Busuttill RW, Coito AJ. Cyclooxygenase-2 Deficiency Enhances Th2 Immune Responses and Impairs Neutrophil Recruitment in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 1843-1853.
15. Suleyman H, Demircan B, Karagoz Y. Anti-Inflammatory and Side Effects of Cyclooxygenase Inhibitors. *Pharmacological Reports* 2007, 59: 247-258.
16. Vilanova JM, Figueras-Aloy J, Rosello J, Gomez G, Gelpi E, Jimenez R. Arachidonic Acid Metabolitesv in CSF in Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy of Newborn Infants. *Acta Paediatrica*, 1998, 87: 588-592.
17. Dupouy VM, Ferre PJ, Uro-Coste E, Lefebvre HP. Time Course Of COX-1 and COX-2 Expression During Ischemia-Reperfusion in Rat Skeletal Muscle. *Journal of Applied Physiology (1985)*, 2006, 100: 233-239.

18. Suleyman H, Albayrak A, Bilici M, Cadirci E, Halici Z. Different Mechanisms in Formation and Prevention of Indomethacin-Induced Gastric Ulcers. *Inflammation*, 2010, 33: 224-234.
19. Gatti D, Adami S. Coxibs: A Significant Therapeutic Opportunity. *Acta Biomedica*, 2010, 81: 217-224.
20. Lories RJ. Etoricoxib and the Treatment of Ankylosing Spondylitis. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2012, 8: 1599-1608.
21. Maheshwari A, Badgujar L, Phukan B, Bodhankar SL, Thakurdesai P. Protective Effect of Etoricoxib Against Middle Cerebral Artery Occlusion Induced Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 667: 230-237.
22. Cho S, Hahm JH, Hong YS. Analysis of P53 and BAX Mutations, Loss of Heterozygosity, P53 and BCL2 Expression and Apoptosis in Basal Cell Carcinoma in Korean Patients. *British Journal of Dermatology* 2001, 144: 841-848.
23. Ramdial PK, Madaree A, Reddy R, Chetty R. Bcl-2 Protein Expression in Aggressive and Non-Aggressive Basal Cell Carcinomas. *Journal of Cutaneous Pathology*, 2000, 27: 283-291.
24. Yapca OE, Borekci B, Suleyman H. Ischemia-Reperfusion Damage. *The Eurasian Journal of Medicine*, 2013, 45: 126-127.
25. Li C, Jackson RM. Reactive Species Mechanisms of Cellular Hypoxia-Reoxygenation Injury. *Cell Physiology - American Journal of Physiology*, 2002, 282: 227-241.
26. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Oxidase in Ischemic Rat Intestine: A Reevaluation. *American Journal of Physiology*, 1988, 254: 768-774.

27. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of Ischaemia-Reperfusion Injury. *The Journal of Pathology*, 2000, 190: 255-266.
28. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive Oxygen Metabolites, Neutrophils, and the Pathogenesis of Ischemic-Tissue/Reperfusion. *Clinical Cardiology*, 1993, 16: 119-126.
29. Udassin R, Vromen A, Haskel Y. The Time Sequence of Injury and Recovery Following Transient Reversible Intestinal Ischemia. *Journal of Surgical Research* 1994, 56: 221-225.
30. Isaoglu U, Yılmaz M, Sener E, Cetin N, Altuner D, Bilen H, Yapca OE, Demiryılmaz İ, Isaoglu N, Gul MA, Kumbasar S, Suleyman H. The Impaired Balances of Oxidant/Antioxidant and COX-1/COX-2 in Ovarian Ischemia-Reperfusion Injury and Prevention by Nimesulide. *Latin American Journal Of Pharmacy*, 2012, 31: 1481-1488.
31. Kisaoglu A, Borekci B, Yapca OE, Bilen H, Suleyman H. Tissue Damage and Oxidant/Antioxidant Balance. *The Eurasian Journal of Medicine*, 2013, 45: 47-49.
32. Granger DN. Ischemia-Reperfusion: Mechanisms of Microvascular Dysfunction and the Influence of Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Microcirculation*, 1999, 6: 167-178.
33. Teke Z, Kabay B, Özden A. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi. *Pamukkale Medical Journal*, 2008, 1: 65-72.
34. Craggs MD, Vaizey CJ. Neurophysiology of The Bladder and Bowel. Fowler CJ (Ed). *Neurology of Bladder, Bowel, and Sexual Dysfunction*, Woburn, MA, Butterworth-Heinemann, 1999: 19-32.
35. Slater TF. Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury. *Biochemical Journal*, 1984, 222: 1-15.

36. Farber JL. Mechanisms of Cell Injury By Activated Oxygen Species. *Environmental Health Perspectives*, 1994, 102 Suppl 10: 17-24.
37. Kako KJ. Free Radical Effects on Membrane Protein in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Molecular And Cellular Cardiology* 1987, 19: 209-211.
38. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) As a Lipid Peroxidation Marker. *Wiad Lek Journal*, 2004, 57: 453-455.
39. Girotti AW. Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in Biological Systems. *The Journal of Lipid Research*, 1998, 39: 1529-1542.
40. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The Effects Of Vitamin C and Vitamin E on Oxidative DNA Damage: Results from a Randomized Controlled Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2000, 9: 647-652.
41. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA Damage. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 361-370.
42. Memisogulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, 3: 30-39.
43. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Yuzuncu Yıl*, 2004, 15: 91-96.
44. Sasaki M, Joh T. Oxidative Stress and Ischemia-Reperfusion Injury in Gastrointestinal Tract and Antioxidant, Protective Agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2007, 40: 1-12.
45. Fridovich I. Mitochondria: Are They the Seat of Senescence? *Aging Cell*, 2004, 3: 13-16.
46. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160: 1-40.



47. Sert C, Celik MS. Radioprotective Agents. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 1996, 16: 292-298.
48. Ault JG, Lawrence DA. Glutathione Distribution in Normal and Oxidatively Stressed Cells. *Experimental Cell Research*, 2003, 285: 9-14.
49. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular Glutathione and Thiols Metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 64: 1019-1026.
50. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and Hepatobiliary Disease. *Hepatology*, 1995, 21: 1725-1741.
51. Leker RR, Shohami E. Cerebral Ischemia and Trauma-Different Etiologies Yet Similar Mechanisms: Neuroprotective Opportunities. *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 39: 55-73.
52. Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular Mechanisms of Reduced Glutathione Transport: Role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A Families of Membrane Proteins. *Toxicology Applied Pharmacology* 2005, 204: 238-255.
53. Jaeschke H. Molecular Mechanisms of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Preconditioning. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2003, 284: G15-26.
54. Knapen MF, Zusterzeel PL, Peters WH, Steegers EA. Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. A Review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 1999, 82: 171-184.
55. Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, Van Zanden J, Van Bladeren PJ. The Interplay of Glutathione-Related Processes in Antioxidant Defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2001, 10: 141-152.

56. Hall L, Williams K, Perry AC, Frayne J, Jury JA. The Majority of Human Glutathione Peroxidase Type 5 (GPX5) Transcripts are Incorrectly Spliced: Implications for the Role of GPX5 in The Male Reproductive Tract. *Biochemical Journal*, 1998, 333 ( Pt 1): 5-9.
57. De Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I. Mice With a Homozygous Null Mutation for the Most Abundant Glutathione Peroxidase, Gpx1, Show Increased Susceptibility to the Oxidative Stress-Inducing Agents Paraquat and Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 22528-22536.
58. Nordberg J, Arner ES. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31: 1287-1312.
59. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*, 2001, 54: 176-186.
60. Kinnula VL, Paakko P, Soini Y. Antioxidant Enzymes and Redox Regulating Thiol Proteins in Malignancies of Human Lung. *FEBS Letters*, 2004, 569: 1-6.
61. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-Transferase Family of Enzymes. *Mutation Research*, 2001, 482: 21-26.
62. Ozkan A, Fıskın K. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *International Journal of Hematology and Oncology*, 2004, 14: 52-60.
63. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide Dismutases in Malignant Cells and Human Tumors. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 36: 718-744.
64. Zamocky M, Koller F. Understanding The Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and in Vitro Mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, 72: 19-66.

65. Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee AK, Murray JJ, Coggi G, Viale G. Bcl-2 Oncoprotein in Colorectal Hyperplastic Polyps, Adenomas, and Adenocarcinomas. *Human Pathology*, 1995, 26: 534-540.
66. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a P53-Dependent Negative Response Element in the Bcl-2 Gene. *Cancer Research*, 1994, 54: 3131-3135.
67. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*, 1998, 281: 1322-1326.
68. Nor JE, Christensen J, Liu J, Peters M, Mooney DJ, Strieter RM, Polverini PJ. Up-Regulation of Bcl-2 in Microvascular Endothelial Cells Enhances Intratumoral Angiogenesis and Accelerates Tumor Growth. *Cancer Research*, 2001, 61: 2183-2188.
69. Tilli CM, Stavast-Koey AJ, Ramaekers FC, Neumann HA. Bax Expression and Growth Behavior of Basal Cell Carcinomas. *Journal of Cutaneous Pathology*, 2002, 29: 79-87.
70. Delehedde M, Cho SH, Sarkiss M, Brisbay S, Davies M, El-Naggar AK, McDonnell TJ. Altered Expression of Bcl-2 Family Member Proteins in Nonmelanoma Skin Cancer. *Cancer*, 1999, 85: 1514-1522.
71. Fels C, Schafer C, Huppe B, Bahn H, Heidecke V, Kramm CM, Lautenschlager C, Rainov NG. Bcl-2 Expression in Higher-Grade Human Glioma: A Clinical and Experimental Study. *Journal of Neuro-Oncology*, 2000, 48: 207-216.
72. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 Family Proteins in Apoptosis: Apoptosomes or Mitochondria? *Genes Cells*, 1998, 3: 697-707.
73. Fennell DA, Cotter FE. Controlling the Mitochondrial Gatekeeper for Effective Chemotherapy. *British Journal of Haematology*, 2000, 111: 52-60.
74. Levi M, Knol JA, Ensminger WD, Deremer SJ, Dou C, Lunte SM, Bonner HS, Shaw LM, Smith DE. Regional Pharmacokinetics of Amifostine in Anesthetized Dogs:

Role of the Liver, Gastrointestinal Tract, Lungs, and Kidneys. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, 30: 1425-1230.

75. Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, Schaeffers HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase-1 and -2 Isoenzymes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, 31: 551-557.

76. Singh B, Lucci A. Role Of Cyclooxygenase-2 in Breast Cancer. *Journal of Surgical Research* 2002, 108: 173-179.

77. Singh-Ranger G, Mokbel K. The Role of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Breast Cancer, and Implications of COX-2 Inhibition. *European Journal of Surgical Oncology* 2002, 28: 729-737.

78. Arun B, Goss P. The Role Of COX-2 Inhibition in Breast Cancer Treatment and Prevention. *Seminars in Oncology*, 2004, 31: 22-29.

79. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Regulation of Prostaglandin Production by Nitric Oxide; an in Vivo Analysis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1995, 114: 1171-1178.

80. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, Et Al. Renal Abnormalities and an Altered Inflammatory Response in Mice Lacking Cyclooxygenase II. *Nature*, 1995, 378: 406-409.

81. Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM. Functional and Molecular Aspects Of Renal Prostaglandin Receptors. *Journals of the American Society of Nephrology*, 1996, 7: 8-17.

82. Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 Inhibition Decreases Renin Content and Lowers Blood Pressure in a Model of Renovascular Hypertension. *Hypertension*, 1999, 34: 96-101.

83. Traynor TR, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. Inhibition of Macula Densa-Stimulated Renin Secretion by Pharmacological Blockade of Cyclooxygenase-2. *American Journal of Physiology*, 1999, 277: F706-710.
84. Swan SK, Rudy DW, Lasseter KC, Ryan CF, Buechel KL, Lambrecht LJ, Pinto MB, Dilzer SC, Obrda O, Sundblad KJ, Gumbs CP, Ebel DL, Quan H, Larson PJ, Schwartz JI, Musliner TA, Gertz BJ, Brater DC, Yao SL. Effect Of Cyclooxygenase-2 Inhibition on Renal Function in Elderly Persons Receiving a Low-Salt Diet. A Randomized, Controlled Trial. *Annals of Internal Medicine*, 2000, 133: 1-9.
85. Muscara MN, Vergnolle N, Lovren F, Triggle CR, Elliott SN, Asfaha S, Wallace JL. Selective Cyclo-Oxygenase-2 Inhibition with Celecoxib Elevates Blood Pressure and Promotes Leukocyte Adherence. *British Journal of Pharmacology*, 2000, 129: 1423-1430.
86. Wang JL, Cheng HF, Shappell S, Harris RC. A Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor Decreases Proteinuria and Retards Progressive Renal Injury in Rats. *Kidney International*, 2000, 57: 2334-2342.
87. Muller FO, Middle MV, Schall R, Terblanche J, Hundt HK, Groenewoud G. An Evaluation of the Interaction of Meloxicam With Frusemide in Patients With Compensated Chronic Cardiac Failure. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1997, 44: 393-398.
88. Hao CM, Komhoff M, Guan Y, Redha R, Breyer MD. Selective Targeting of Cyclooxygenase-2 Reveals Its Role in Renal Medullary Interstitial Cell Survival. *American Journal of Physiology*, 1999, 277: F352-359.
89. Stichtenoth DO, Wagner B, Frolich JC. Effect of Selective Inhibition of the Inducible Cyclooxygenase on Renin Release in Healthy Volunteers. *The Journal of Medical Investigation*, 1998, 46: 290-296.

90. Catella-Lawson F, Mcadam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, Fitzgerald GA. Effects of Specific Inhibition of Cyclooxygenase-2 On Sodium Balance, Hemodynamics, and Vasoactive Eicosanoids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999, 289: 735-741.
91. Tomasoni S, Noris M, Zappella S, Gotti E, Casiraghi F, Bonazzola S, Benigni A, Remuzzi G. Upregulation of Renal and Systemic Cyclooxygenase-2 in Patients with Active Lupus Nephritis. *Journal of The American Society of Nephrology*, 1998, 9: 1202-1212.
92. Schneider A, Harendza S, Zahner G, Jocks T, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA. Cyclooxygenase Metabolites Mediate Glomerular Monocyte Chemoattractant Protein-1 Formation and Monocyte Recruitment in Experimental Glomerulonephritis. *Kidney International*, 1999, 55: 430-441.
93. Nakada SY, Jerde TJ, Bjorling DE, Saban R. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors Reduce Ureteral Contraction in Vitro: A Better Alternative for Renal Colic? *Journal of Urology*, 2000, 163: 607-612.
94. Lanas A, Hirschowitz BI. Toxicity of Nsaids in the Stomach and Duodenum. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1999, 11: 375-381.
95. Laine L, Harper S, Simon T, Bath R, Johanson J, Schwartz H, Stern S, Quan H, Bolognese J. A Randomized Trial Comparing the Effect of Rofecoxib, A Cyclooxygenase 2-Specific Inhibitor, with that of Ibuprofen on the Gastroduodenal Mucosa of Patients with Osteoarthritis. Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Study Group. *Gastroenterology*, 1999, 117: 776-783.
96. Laine L. Approaches To Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use in the High-Risk Patient. *Gastroenterology*, 2001, 120: 594-606.

97. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ, Group VS. Comparison of Upper Gastrointestinal Toxicity of Rofecoxib and Naproxen in Patients With Rheumatoid Arthritis. VIGOR Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 2000, 343: 1520-8, 2 P Following 1528.
98. McCormack PL. Celecoxib: A Review of Its Use for Symptomatic Relief in the Treatment of Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis. *Drugs*, 2011, 71: 2457-2489.
99. Brune K, Hinz B. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Similarities and Differences. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 2004, 33: 1-6.
100. Van Ryn J, Trummlitz G, Pairet M. COX-2 Selectivity and Inflammatory Processes. *Current Medicinal Chemistry*, 2000, 7: 1145-1161.
101. Garcia Rodriguez LA, Jick H. Risk of Upper Gastrointestinal Bleeding and Perforation Associated with Individual Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Lancet*, 1994, 343: 769-772.
102. Burke A, Smyth E, Fitzgerald G. *Analgesic-Antipyretic Agents; Pharmacotherapy Of Gout*, 11 Ed. New-York, Mcgraw-Hill, 2006.
103. Talley JJ, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Koboldt CM, Masferrer JL, Perkins WE, Rogers RS, Shaffer AF, Zhang YY, Zweifel BS, Seibert K. 4-[5-Methyl-3-Phenylisoxazol-4-Yl]- Benzenesulfonamide, Valdecoxib: A Potent and Selective Inhibitor Of COX-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43: 775-777.
104. Talley JJ, Bertenshaw SR, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Kellogg MS, Koboldt CM, Yuan J, Zhang YY, Seibert K. N-[[5-Methyl-3-Phenylisoxazol-4-Yl)-Phenyl]Sulfonyl]Propanamide, Sodium Salt, Parecoxib Sodium: A Potent and Selective

Inhibitor of COX-2 for Parenteral Administration. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43: 1661-1663.

105. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dubé D, Ethier D, Falguyret JP, Friesen RW, Gordon R, Greig G, Guay J, Mancini J, Ouellet M, Wong E, Xu L, Boyce S, Visco D, Girard Y, Prasit P, Zamboni R, Rodger IW, Gresser M, Ford-Hutchinson AW, Young RN, Chan CC. Etoricoxib (MK-0663): Preclinical Profile A and Comparison with other Agents that Selectively Inhibit Cyclooxygenase-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 296: 558-566.

106. Stichtenoth DO, Frölich JC. The Second Generation of COX-2 Inhibitors: What Advantages do the Newest Offer? *Drugs*, 2003, 63: 33-45.

107. Cochrane DJ, Jarvis B, Keating GM. Etoricoxib. *Drugs*, 2002, 62: 2637-51; Discussion 2652-2653.

108. Cheer SM, Goa KL. Parecoxib (Parecoxib Sodium). *Drugs*, 2001, 61: 1133-41; Discussion 1142-1143.

109. Patrignani P, Capone ML, Tacconelli S. Clinical Pharmacology of Etoricoxib: A Novel Selective COX2 Inhibitor. *Expert Opin Pharmacother*, 2003, 4: 265-284.

110. Daniels SE, Grossman EH, Kuss ME, Talwalker S, Hubbard RC. A Double-Blind, Randomized Comparison of Intramuscularly and Intravenously Administered Parecoxib Sodium Versus Ketorolac and Placebo in a Post-Oral Surgery Pain Model. *Clinical Therapeutics*, 2001, 23: 1018-1031.

111. Birbara CA, Puopolo AD, Munoz DR, Sheldon EA, Mangione A, Bohidar NR, Geba GP, Etoricoxib Protocol 042 Study G. Treatment of Chronic Low Back Pain With Etoricoxib, a New Cyclo-Oxygenase-2 Selective Inhibitor: Improvement in Pain and Disability--A Randomized, Placebo-Controlled, 3-Month Trial. *Journal of Pain*, 2003, 4: 307-315.



112. Collantes E, Curtis SP, Lee KW, Casas N, Mccarthy T, Melian A, Zhao PL, Rodgers DB, McCormick CL, Lee M, Lines CR, Gertz BJ, Etoricoxib Rheumatoid Arthritis Study G. A Multinational Randomized, Controlled, Clinical Trial of Etoricoxib in the treatment of Rheumatoid Arthritis [ISRCTN25142273]. *BMC Family Practice*, 2002, 3: 10.
113. Bensen W, Weaver A, Espinoza L, Zhao WW, Riley W, Paperiello B, Recker DP. Efficacy and Safety of Valdecoxib in Treating the Signs and Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Randomized, Controlled Comparison with Placebo and Naproxen. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41: 1008-1016.
114. Sikes DH, Agrawal NM, Zhao WW, Kent JD, Recker DP, Verburg KM. Incidence Of Gastroduodenal Ulcers Associated with Valdecoxib Compared with that of İbuprofen and Diclofenac in Patients with Osteoarthritis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2002 14: 1101-1111.
115. Stoltz RR, Harris SI, Kuss ME, Lecomte D, Talwalker S, Dhadda S, Hubbard RC. Upper GI Mucosal Effects of Parecoxib Sodium in Healthy Elderly Subjects. *The American Journal of Gastroenterology*, 2002, 97: 65-71.
116. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay For Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95: 351-358.
117. Wei H, Frenkel K. In Vivo Formation of Oxidized DNA Bases in Tumor Promoter-Treated Mouse Skin. *Cancer Research*, 1991, 51: 4443-4449.
118. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Analytical Biochemistry*, 1968, 25: 192-205.

119. Kuzu MA, Koksoy C, Kale IT, Tanik A, Terzi C, Elhan AH. Reperfusion Injury Delays Healing of Intestinal Anastomosis in a Rat. *The American Journal of Surgery* 1998, 176: 348-351.
120. Grace PA. Ischaemia-Reperfusion Injury. *British Journal of Surgery*, 1994, 81: 637-647.
121. Yang S, Chou WP, Pei L. Effects of Propofol on Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Exp Ther Med*, 2013, 6: 1177-1183.
122. Chen TH, Yang YC, Wang JC, Wang JJ. Curcumin Treatment Protects Against Renal Ischemia and Reperfusion Injury-Induced Cardiac Dysfunction and Myocardial Injury. *Transplantation Proceedings*, 2013, 45: 3546-3549.
123. Altuner D, Cetin N, Suleyman B, Aslan Z, Hacimuftuoglu A, Gulaboglu M, Isaoglu N, Demiryilmaz I, Suleyman H. Effect of Thiamine Pyrophosphate on Ischemia-Reperfusion Induced Oxidative Damage in Rat Kidney. *Indian Journal of Pharmacology*, 2013, 45: 339-343.
124. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA, Jr. Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in the Pathophysiologic Alterations After Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in the Rat. *Journal of Clinical Investigation* 1990, 85: 1936-1943.
125. Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B, Lesmasters JJ. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen Species During Reductive Stress in Rat Hepatocytes. *American Journal Of Physiology*, 1993, 264: 961-967.
126. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *Journal of Surgical Research* 1996, 61: 469-472.

127. Kumbasar S, Yapca OE, Bilen H, Suleyman B, Ozgeris FB, Borekci B, Suleyman H. The Effect of Lacidipine on Ischemia-Reperfusion Induced Oxidative Damage in Ovaries of Female Rats. *Biomed Research International*, 2012, 23: 495-500.
128. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 1983, 52: 711-760.
129. Santa T. Recent Advances In Analysis of Glutathione in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography: A Brief Overview. *Drug Discovery Therapeutics*, 2013, 7: 172-177.
130. Paller MS. Renal Work, Glutathione and Susceptibility to Free Radical-Mediated Postischemic Injury. *Kidney International*, 1988, 33: 843-849.
131. Tok A, Sener E, Albayrak A, Cetin N, Polat B, Suleyman B, Akcay F, Suleyman H. Effect of Mirtazapine on Oxidative Stress Created in Rat Kidneys by Ischemia-Reperfusion. *Renal Failure*, 2012, 34: 103-110.
132. Demiryilmaz I, Sener E, Cetin N, Altuner D, Akcay F, Suleyman H. A Comparative Investigation Of Biochemical And Histopathological Effects of Thiamine and Thiamine Pyrophosphate on Ischemia-Reperfusion Induced Oxidative Damage in Rat Ovarian Tissue. *Archives of Pharmacal Research*, 2013, 36: 1133-1139.
133. Mittal N, Kanwar SS, Sanyal SN. Effect of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Procarcinogen 1,2-Dimethylhydrazine on the Antioxidant Defense System. *International Journal of Toxicology*, 2008, 27: 169-174.
134. Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Immunological and Physiological Responses to Aortic Surgery: Effect of Reperfusion on Neutrophil and Monocyte Activation and Pulmonary Function. *British Journal of Surgery*, 1997, 84: 513-519.

135. Fern R, Moller T. Rapid Ischemic Cell Death in Immature Oligodendrocytes: A Fatal Glutamate Release Feedback Loop. *The Journal of Neuroscience*, 2000, 20: 34-42.
136. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2-10 Years Later. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, 300: 367-375.
137. Krause MM, Brand MD, Krauss S, Meisel C, Vergin H, Burmester GR, Buttgerit F. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and a Selective Cyclooxygenase 2 Inhibitor Uncouple Mitochondria in Intact Cells. *Arthritis & Rheumatism*, 2003, 48: 1438-1444.
138. Smith WL, Garavito RM, Dewitt DL. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 33157-33160.
139. Ito T, Deng X, Carr B, May WS. Bcl-2 Phosphorylation Required for Anti-Apoptosis Function. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 11671-11673.
140. Lehmann TG, Heger M, Münch S, Kirschfink M, Klar E. In Vivo Microscopy Reveals that Complement Inhibition by C1-Esterase Inhibitor Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in the Liver. *Transplant International*, 2000, 13: 5447-5550.
141. Thompson CB. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science*, 1995, 267: 1456-1462.
142. Hwang WY, Koh LP, Ng HJ, Tan PH, Chuah CT, Fook SC, Chow H, Tan KW, Wong C, Tan CH, Goh YT. A Randomized Trial of Amifostine as a Cytoprotectant for Patients Receiving Myeloablative Therapy for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2004, 34: 51-56.
143. Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, Matsumura S, Yabushita K, Okano N, Tsuji T. Cytokine Profile in the Liver of Primary Biliary Cirrhosis. *Journal of Clinical Immunology*, 1999, 19: 422-427.

144. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of Ischaemia and Reperfusion on Liver Regeneration in Rats. *European Journal of Surgery* 1993, 159: 393-398.
145. Chalmers-Redman RM, Fraser AD, Ju WY, Wadia J, Tatton NA, Tatton WG. Mechanisms of Nerve Cell Death: Apoptosis or Necrosis after Cerebral Ischaemia. *International Review of Neurobiology*, 1997, 40: 1-25.
146. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL. Myocardial Infarction and Apoptosis after Myocardial Ischemia and Reperfusion: Role of the Terminal Complement Components and Inhibition by Anti-C5 Therapy. *Circulation*, 1998, 97: 2259-2267.
147. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Myocardial Apoptosis and Ischemic Preconditioning. *Cardiovascular Research*, 2002, 55: 438-455.
148. Yildar M, Aksit H, Korkut O, Ozyigit MO, Sunay B, Seyrek K. Protective Effect of 2-Aminoethyl Diphenylborinate on Acute Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Kidney. *Journal of Surgical Research*, 2013, In Press.

## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

<b>KİŞİSEL BİLGİLER</b>	
Adı Soyadı	: Bahadır SÜLEYMAN
Doğum tarihi	: 11.05.1982
Doğum yeri	: ÖZBEKİSTAN
Medeni hali	: Evli
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM
Tel	: 0530 884 91 76
Faks	-
E-mail	: bahadirsuleyman@yandex.com.tr
<b>EĞİTİM</b>	
Lise	: Erzurum Lisesi (2000)
Lisans	: Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi (2001-2006)
Yüksek lisans	: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD. (2007-2010)
Doktora	: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD. (2010-)
<b>YABANCI DİL BİLGİSİ</b>	
İngilizce	: ÜDS- 62 (2010)
<b>ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR</b>	
-	
<b>İLGİ ALANLARI, HOBİLER</b>	
Spor	

## EK-2.HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ONAY FORMU



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-34  
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

04.06.2013  
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

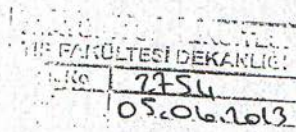
25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 22.05.2013 tarih ve 42190979-01-02/2237 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Fatma GÖÇER'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Etorikoksibin Sıçanlarda Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarına Etkisi" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 31.05.2013 tarih ve 1 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 19 no'lu karar ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR  
Başkan Vekili



06 Haziran 2013  
Prof. Dr. Özkan POLA  
Dekan

Toplantı Tarihi : 31.05.2013

Toplantı Sayısı : 1

KARAR NO : 19- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Fatma GÖÇER'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Etorikoksibin Sıçanlarda Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarına Etkisi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 22.05.2013 tarih ve 42190979-01-02/2237 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, 25240 – Yakutiye / ERZURUM  
Telefon : 0 442 226 00 00