

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**LİPOPOLİSAKKARİT İLE SEPSİS OLUŞTURULAN
RATLARIN BÖBREK DOKULARINDA SERBEST RADİKAL
METABOLİZMASININ İNCELENMESİ;
VİTAMİN D’NİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. GÖKÇE ATİKELER**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. CEMAL ÇEVİK**

**ANKARA
EYLÜL 2013**

İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	v
Kısaltmalar.....	vi
Şekil, tablo, grafik ve resim listeleri.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sepsis ile ilgili tanımlamalar.....	3
2.1.2. Sepsis etyolojisi.....	6
2.1.3. Sepsis epidemiyoloji ve insidansı.....	7
2.1.4. Sepsis fizyopatolojisi.....	8
2.1.4.1. Sepsis patogenezi'nde reaktif oksijen türevleri(ROS).....	12
2.1.5. Sepsis ve böbrek.....	14
2.1.6. Sepsiste tedavi yaklaşımları.....	16
2.2. Vitamin D.....	17
2.2.1. Vitamin D formları.....	17
2.2.2. Vitamin D sentez ve metabolizması.....	17
2.2.3. Vitamin D'nin etki mekanizması.....	22
2.2.4. Vitamin D'nin etkileri.....	23
2.2.4.1. Vitamin D'nin iskelet sistemi üzerine etkileri.....	23
2.2.4.2. Vitamin D'nin iskelet dışı sistemler üzerine etkileri.....	24
2.2.4.2.1. Vitamin D ve immün sistem.....	25
2.2.4.2.1.1. Vitamin D ve enfeksiyonlar.....	26

2.2.4.2.1.2. Vitamin D ve sepsis.....	27
2.2.4.2.2. Vitamin D ve kanser.....	28
2.2.4.2.3. Vitamin D ve deri.....	29
2.2.4.2.4. Vitamin D ve kardiyovasküler sistem.....	29
2.2.4.2.5. Vitamin D ve diabetes mellitus.....	30
2.2.4.2.6. Vitamin D ve obezite.....	31
2.2.5. Vitamin D eksikliği.....	31
2.3. Serbest Radikal Metabolizması.....	34
2.3.1. Reaktif oksijen türleri (ROT).....	34
2.3.1.1. Superoksit radikali.....	35
2.3.1.2. Hidrojen peroksit.....	35
2.3.1.3. Hidroksil radikali.....	36
2.3.1.4. Hipokloröz asit.....	36
2.3.1.5. Nitrik oksit.....	36
2.3.2. Serbest radikal harabiyeti riski altındaki hücrel komponentler.....	37
2.3.2.1. Lipidlere olan etkileri.....	37
2.3.2.2. Proteinlere olan etkileri.....	37
2.3.2.3. Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri.....	38
2.3.2.4. Ekstrasellüler etkileri.....	38
2.4. Antioksidan sistem.....	38
2.4.1. Enzim olan antioksidanlar.....	39
2.4.1.1. Superoksit Dismutaz.....	39
2.4.1.2. Katalaz (CAT).....	40

2.4.1.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).....	40
2.4.1.4. Glutasyon redüktaz.....	41
2.4.1.5. Glutasyon S-transferaz.....	41
2.4.2. Enzim olamayan antioksidanlar.....	42
2.5. Vitamin D- Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....	45
3.2. Kullanılan Aletler.....	46
3.3. Yöntemlerin Uygulanması.....	47
3.3.1. Total protein tayini.....	47
3.3.2. Superoksit dismutaz aktivitesinin tayini.....	48
3.3.3. Glutasyon peroksidaz aktivitesinin tayini.....	49
3.3.4. Katalaz aktivitesinin tayini.....	50
3.3.5. Glutasyon-S- transferaz aktivitesinin tayini.....	51
3.3.6. Diğer biyokimyasal parametrelerin ölçümü.....	52
3.4. Dokuların histopatolojik değerlendirilmesi.....	52
3.5. İstatistiksel analiz.....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Ratların rektal yolla ölçülen vücut sıcaklıkları.....	53
4.2. Böbrek fonksiyonunu gösteren testler.....	53
4.3. Rat böbrek dokularında enzim aktiviteleri.....	54
4.3.1. Rat böbrek dokularının SOD aktiviteleri.....	56
4.3.2. Rat böbrek dokularının CAT aktiviteleri.....	56

4.3.3. Rat böbrek dokularının GST aktiviteleri.....	57
4.3.4. Rat böbrek dokularının GSH-Px aktiviteleri.....	57
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	58
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ.....	71
7. KAYNAKLAR.....	72
8. ÖZET.....	85
9. SUMMARY.....	87
10. ÖZGEÇMİŞ.....	89

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana gösterdiği sabır ilgi ve hoşgörü için değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Cemal Çevik'e,

Tezimle ilgili her konuda yardımcı ve destek olan, desteğini hiçbir zaman unutmayacağım değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Kavutçu'ya,

Çalışkanlığı ve enerjisiyle bana örnek olan, desteğini hiç esirgemeyen sevgili hocam, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu'na,

Asistanlık dönemim boyunca, emeği geçen tüm değerli hocalarıma,

Dokuların histopatolojik olarak incelenmesindeki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Candan Özoğul'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca iyi niyetlerini hep arkamda hissettiğim tüm asistan arkadaşlarıma,

Merkez Laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm teknisyen ve görevli personel arkadaşlarıma,

Tüm yaşamımda desteklerini hep hissettiğim, her an yanımda sevgiyle olan canım annem, babam, bitanecik kardeşime,

Yıllardır her türlü sıkıntıyı ve güzelliği paylaştığım, birlikte olmaktan çok mutlu olduğum, her anlamda desteğini hissettiğim sevgili eşime ve ailemize bu yıl huzur getirecek yeni bitaneciğime minnetlerimi ve sevgilerimi sunarım...

KISALTMALAR

BUN: Kan Üre Nitrojeni

CAT: Katalaz

DBP: D vitamini Bağlayıcı Protein

DVR: D vitamini Reseptörü

DIC: Dissemine İntravasküler Koagülasyon

GSH: İndirgenmiş Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

GSSG: Oksitlenmiş Glutasyon

GST: Glutasyon-S-Transferaz

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HMGB1:High mobility group B1

IFN- γ : İnterferon Gama

IL-1: İnterlökin-1

IL-2: İnterlökin-2

IL-4: İnterlökin-4

IL-5: İnterlökin-5

IL-6: İnterlökin-6

IL-10: İnterlökin-10

IL-12: İnterlökin-12

LPS: Lipopolisakkarit

NBT: Nitroblue Tetrazolium

NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa Beta

iNOS: İnduklenebilir nitrik oksit sentaz

NO: Nitrik Oksit

PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitör Tip-1

PAMPs: Patojenle İlişkili Moleküler Yapılar

PAF: Plazminojen aktivatör faktör

PRRs: Patern Tanıyan Reseptörler

PTH: Parathormon

ROS: Reaktif Oksijen Ürünleri

RNS: Reaktif Nitrojen Türleri

SIRS: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu

SOD: Süperoksit Dismutaz

TF: Doku Faktörü

TLR: Toll Like Reseptör

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TRPV5-6: Transportu sağlayan özel kanallar 4-5

TSST: Toksik Şok Sendromu Toksini

VDRE: Vitamin D Responding Element

UVB: Ultraviyole B

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1979-2000 yılları arasında Amerika’da sebep olan mikroorganizmalara göre sepsisli vaka sayısı

Şekil 2. TLR reseptör agonistleri

Şekil 3. Sepsis fizyopatolojisi

Şekil 4. Nötrofilin ekstrasvasküler alana migrasyonu

Şekil 5. ROS ve RNS’nin sepsis patogenezindeki yeri

Şekil 6. Sepsiste renal hasar mekanizmaları

Şekil 7. Vitamin D’nin iki temel formu

Şekil 8. 25 OH Vitamin D’nin renal tübül hücrelerine alımı

Şekil 9. Vitamin D metabolizması

Şekil 10. FGF23 ve Vitamin D

Şekil 11. Vitamin D etki mekanizması

Şekil 12. Vitamin D eksikliği

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. SIRS kriterleri

Tablo 2. Sepsis tanı kriterleri

Tablo 3. Günlük vitamin D ihtiyacı

Tablo 4. Vitamin D eksikliği olan hastalarda tedavi protokolleri

Tablo 5. Ratların rektal yolla ölçülen vücut sıcaklıkları

Tablo 6. Serum Böbrek Fonksiyon Testleri Sonuçları

Tablo 7. Böbrek dokusunda Antioksidan Enzim Aktivite Sonuçları

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Protein Standart Grafiği

Grafik 2. Ratların tüm gruplarda rektal yolla ölçülen ortalama vücut sıcaklıkları

Grafik 3. Tüm gruplarda rat böbrek dokularına ait SOD aktiviteleri

Grafik 4. Tüm gruplarda rat böbrek dokularına ait CAT aktiviteleri

Grafik 5. Tüm gruplarda rat böbrek dokularına ait GST aktiviteleri

Grafik 6. Tüm gruplarda rat böbrek dokularına ait GSH-PX aktiviteleri

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Kontrol grubu: Normal histolojik görünümde böbrek dokusu

Resim 2. Vitamin D grubu: Kontrol grubu ile eşdeğer normal böbrek dokusu

Resim 3. Sepsis grubu: Küçük büyültmede glomerül ve tübül dejenerasyonları

Resim 4. Sepsis grubu: Bowman kapsülünde dilatasyon, glomerüllerde büzülme ve hücre kaybı

Resim 5. Sepsis grubu: Yaygın inflamasyon ve hücresel debrisler

Resim 6. Sepsis+ vitamin D grubu: Yaygın inflamasyon yok. Az sayıda bowman kapsülünde genişleme.

1.GİRİŞ

Sepsis, enfeksiyona karşı gelişen tüm organ ve sistemleri etkileyen sistematik inflamatuvar bir yanıttır.

Sepsis insidansı , yaşlı popölasyonun giderek artmasına, daha sık invaziv girişimler uygulanmasına ve immünsupresif tedavilere bağılı olarak artmaktadır. Antimikrobiyal ajanların kullanımına, ileri yaşam desteğindeki ve bakımdaki gelişmelere rağmen sepsisli hastaların mortalitesi hala % 30-40 dolayındadır.

Sepsiste gerçekleşen ölümlerin enfeksiyon etkeniyle gerçekleşen immün sistem aşırı aktivasyonuyladır olduğu bilinmektedir. Bu yüzden sepsiste etkene yönelik verilen tedavinin yanı sıra immün sistem modölatuvarları da tedavide gündemdedir.(1)

D vitamini, çocuklarda riketsin ve osteomalazinin, yetişkinlerde ise osteoporozun önlenmesinde son derece önemlidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, D vitaminin kemik ve kalsiyum metabolizmasındaki etkilerinin yanı sıra birçok dokuda önemli görevleri olduğunu göstermektedir . Bu etkiler D vitamini reseptörlerinin birçok dokuda yaygın olarak bulunmasına bağılıdır. Vitamin D immunoreglatuvar sistemde özellikle immünsupresif rol oynamaktadır.

D vitaminin immun sistemde ; monosit ve lenfositlerden sitokin salınımını etkileyerek anahtar rol oynadığı düşünülmektedir.(2)

D vitamini ve sepsis ile ilgili yapılan çalışmalarda, D vitaminin özellikle koagülasyonu inhibe ettiği, DIC oluşumunu geciktirdiği bulunmuştur(3).

Son yıllarda D vitaminin oksidan stresi inhibe edici etkileri üzerindeki çalışmalar artmıştır. Özellikle diabetik ratlarda D vitaminin superoksit dismutaz, katalaz, glutayon preoksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığı tespit edilmiştir(4).

Sepsiste proinflamatuvar sitokinler (IL-1-beta,TNF-alfa,IL-6), lipopolisakkarit ile uyarım sonucu artmaktadır ve organizma buna yanıt olarak ise antiinflamatuvar sitokin salınımına neden olmaktadır.(IL-4,IL-10).

Salınan proinflamatuvar mediyatörler serbest radikal oluşumunu tetiklemektedir. Oluşan serbest radikaller oksidatif strese neden olmakta ve oksidatif stresle gelişen endotoksik şok tablosu ile ciddi mortaliteye neden olmaktadır.

Biz D vitaminin, sepsisteki ratlarda antioksidan parametrelere etkisini araştırdık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Sepsis

Sepsis, basit bir enfeksiyon sonrası bile gelişebilen sistemik inflamasyonla karakterize bir sendromdur(5). Enfeksiyon ajanlarına karşı verilen aşırı yanıt ile oluşur. Bu aşırı yanıtta proinflamatuvar ve prokoagulan sistemin kontrolsüz aktivasyonu sorumludur(5). Sepsiste gelişen aşırı immün yanıtla birlikte hipovolemi, periferik vazodilatasyon, miyokardiyal depresyon, artmış endotel permeabilitesi ve ölüm gerçekleşir(5).

2.1.1.Sepsis ile ilgili tanımlamalar

İnfeksiyon: normalde steril olan bir doku, sıvı veya vücut kavitesinin patojenik veya potansiyel olarak patojenik mikroorganizmalar tarafından invazyonudur(6).

Bakteremi: Bakterilerin kanda kültürle gösterilmesidir. Endokardit ve ciddi intravasküler enfeksiyonlarda sürekli bir bakteremi vardır. Diğer bakteriyel enfeksiyonlar da geçici veya aralıklı bakteremi olabilmektedir. Benzer şekilde kanda diğer patojenlerin varlığı da viremi, fungemi, parazitemi olarak adlandırılır.

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS): Organizmanın inflamatuvar yanıtıdır. Özgül olmayan klinik bulgular içerir. Nedeni ne olursa olsun sistemik inflamasyonu gösteren, altta yatan sebebin hızla araştırılmasını ve erken tanıyı zorunlu kılan belirtiler ve semptomlar topluluğu olarak algılanmalıdır. SIRS tanımında, tanımlanan dört kriterden (Tablo 1) iki veya daha fazlasının olması aranır.

Tablo 1.SIRS kriterleri

Vücut ısısı	>38°C veya <36°C
Kalp hızı	>90 atım/dakika
Solunum hızı	>20 solunum/dakika veya PaCO ₂ <32 mmHg
Lökosit sayısı	>12000/mm ³ veya <4000/mm ³ veya >%10 immatür nötrofil

Sepsis, infeksiyon ile birlikte SIRS varlığıdır(6). SIRS belirteçleri nonspesifik olduğu için 2001 yılında Amerikan Göğüs Hastalıkları (American College of Chest Physicians-ACCP) ve Yoğun Bakım Dernekleri (Society of CriticalCare Medicine-SCCM) uzlaşısı toplantısında “infeksiyona sistemik inflamasyon yanıt” belirteçleri eklenmiştir.

Ağır sepsis; sepsise eşlik eden organ fonksiyon bozukluğunun olmasıdır.

Septik şok; sepsiste olan bir hastada başka bir nedene bağlı olmayan ve sıvı tedavisine yanıtız hipotansiyon “septik şok” olarak tanımlanır. Hipotansiyon, sistolik arteryel basıncın 90 mmHg’nın altında olması, ortalama arter basıncın 60 mmHg’nın altında olması veya kan basıncının bazal normal değerinden 40 mmHg’e kadar düşmesi olarak tanımlanır.

Organ Yetmezliği, Çoklu Organ Yetmezliği; Sepsis hastalarında tablo ağırlaştıkça organ fonksiyon bozuklukları yani organ yetmezlikleri gelişir. Eğer birden fazla organ sistemi fonksiyonlarını kendiliğinden gerçekleştiremiyorsa çoklu organ yetmezliğinden bahsedilir(7).

Tablo 2. Sepsis tanı kriterleri

Kanıtlanmış veya şüphelenilen bir enfeksiyon varlığı ve aşağıdakilerden bir kısmının varlığı:

• Genel kriterler

Ateş ($> 38.3^{\circ}\text{C}$)

Hipotermi ($< 36^{\circ}\text{C}$)

Kalp hızı $> 90/\text{dakika}$ veya $> 2 \text{ SD}$ (yaşa göre)

Takipne

Bilinç değişiklikleri

Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte $> 20 \text{ mL/kg}$)

Hiperglisemi (diyabeti olmayan bir hastada plazma glikoz düzeyi $> 120 \text{ mg/dL}$ veya 7.7 mmol/L)

• İnflamasyon belirteçleri

Lökositoz (beyaz küre sayımı $> 12.000/\text{mm}^3$)

Lökopeni (beyaz küre sayımı $< 4000/\text{mm}^3$)

Normal beyaz küre sayımı ve immatür formlarının $\%10$ 'dan fazla olması

Plazma C-reaktif protein $> 2 \text{ SD}$

Plazma prokalsitonin $> 2 \text{ SD}$

• Hemodinamik belirteçler

Arteriyel hipotansiyon (sistolik kan basıncı $< 90 \text{ mmHg}$, OAB < 70)

$\text{SvO}_2 > \%70$

Kardiyak indeks $> 3.5 \text{ L/dakika}$

• Organ fonksiyon bozuklukları

Arteriyel hipoksi ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 300$)

Akut oligüri (idrar çıkışı $< 0.5 \text{ mL/kg/saat}$ veya 45 mL/L en az iki saat)

Kreatinin artışı $> 0.5 \text{ mg/dL}$

Koagülasyon bozuklukları ($\text{INR} > 1.5$ veya $\text{aPTT} > 60$ saniye)

İleus (bağırsak seslerinin olmaması)

Trombositopeni (trombosit sayısı $< 100.000/\text{mm}^3$)

Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin $> 4 \text{ mg/dL}$ veya 70 mmol/L)

• Doku perfüzyonu

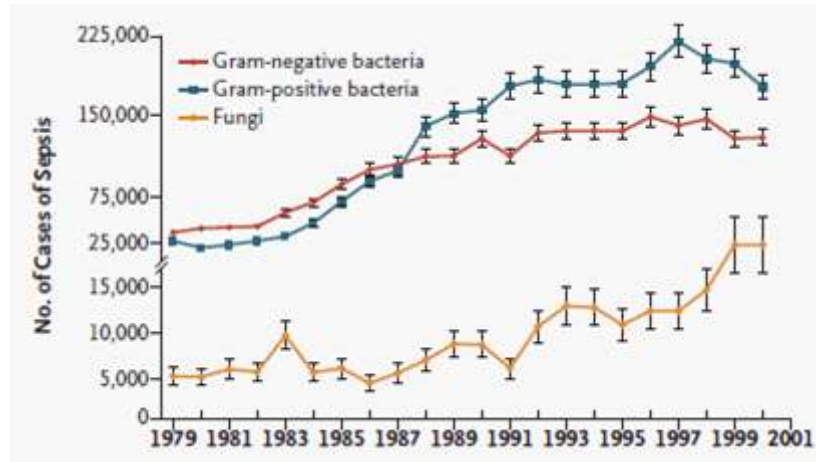
Hiperlaktatemi ($> 1 \text{ mmol/L}$)

Kapiller geri dolumda azalma

SD: Standart sapma, OAB: Ortalama arter basıncı, SvO₂: Mikst venöz oksijen saturasyonu, PaO₂: Parsiyel arteriyel oksijen basıncı, FiO₂:İnspiratuar oksijen fraksiyonu, INR: İnternasyonal normalize edilmiş oran, aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı.

2.1.2. Sepsis etyolojisi

Sepsise 1979 yılından 1987 yılına kadar gram negatif bakteriler daha sıklıkla yol açarken, 2000 yılında bu oranlar değişmiş ve gram pozitif bakterilerin %52,1, gram negatif bakterilerin %37, polimikrobiyal infeksiyonların %4,7, anaerob infeksiyonların %1 ve fungal ajanların %4,6 sıklıkla sepsis sebebi olduğu tespit edilmiştir(8). Özellikle gram pozitif infeksiyonlardaki yıllık ortalama %26.3'lük artış dikkat çekicidir(8). Fungal infeksiyonlardaki artış ise %207'dir, 1979 yılında bildirilen 5231 fungal sepsis vakası varken bu rakamlar 2000 yılında 16,042'ye yükselmiştir(8).



Şekil1. 1979-2000 yılları arasında Amerika'da sebep olan mikroorganizmalara göre sepsisli vaka sayısı(8).

Sepsisli hastaların çoğunda kan kültürlerinde üreme saptanamamaktadır. Bu oranlar sepsis evresiyle değişmekte olup, sepsiste %17, ciddi sepsiste %25 ve septik şokta ise %69 olarak bulunmuştur(8).

Enfeksiyon odağı ise toplum ve hastane kaynaklı sepsislerde değişebilmektedir. Toplum kaynaklı sepsislerde piyelonefrit, pnömoni, deri

yumuşak doku enfeksiyonları, menenjit, endokardit en sık karşılaşılan odaklar olup, hastane kaynaklı sepsislerde ise üriner sonda ilişkili piyelonefrit, ventilatörle ilişkili pnömoni, karın içi enfeksiyon (sekonder peritonit, abse) ve yabancı cisim enfeksiyonları (damar içi kateterler, ventrikülo-peritoneal kateterler) en sık odaklardır(9).

2.1.3. Sepsis epidemiyoloji ve insidansı

Sepsis ve septik şok önemli mortalite ve morbidite nedenlerindendir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1995 yılında yapılan ve toplam 6.621.529 hastayı kapsayan çalışmada 192.980 ağır sepsis olgusu saptanmış ve bu rakamlara göre yapılan tahminlerde ABD'de yıllık 750.000 sepsis olgusu olabileceği öngörülmüştür. Bu çalışmada sepsis insidansı 3/1000 ve mortalite oranı da %28.6 bulunmuştur(10).

Amerika Birleşik Devletleri'de Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi (National Center for Health Statistics) verilerine göre sepsis, 1996'da ölüm nedenleri arasında 10. sırada yer almaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1979-2000 yılları arasını kapsayan, 22 yıllık periyodu tarayan bir çalışmada sepsis insidansının yıllık %8.7'lik bir artışla, 82/100.000'den 240/100.000'e çıktığı görülmüştür. Mortalite oranı 1979-1984 yılları arasında %28 iken 1995-2000 yılları arasında %18'e düşmüştür, fakat toplam kaybedilen hasta sayısı halen artmaya devam etmektedir(8).

Türkiye'de sepsisle ilgili yeterli çalışma yoktur ancak Amerika Birleşik Devletleri'ndeki (ABD) oranlar ülkemiz nüfusuna uyarlandığında yılda 100.000 civarında sepsis görülmesi gerektiği söylenebilir(9). Hacettepe Üniversitesi'nde

yapılan bir çalışmada 1983-1989 yılları arasında 7 yıllık bir periyotta, hastanede yatan hastalar arasında gram negatif sepsis insidansı 4,2/1000 ve mortalitesi %45 olarak bulunmuştur(9).

2002 yılında 24 Avrupa ülkesinde 198 yoğun bakım ünitesini kapsayan toplam 3147 hastada yapılan çalışmada; sepsis insidansı % 34 olarak saptanmış ve septik şoklu olgularda mortalite %54.1 tespit edilmiştir. Sepsise neden olan etkenler %40 gram pozitif bakteriler, %38 gram negatif bakteriler ve mantarlar %17 olarak saptanmıştır(11).

2003 yılında Almanya'da yapılan 454 yoğun bakım ünitesini kaplayan 3877 hastayı kapsayan çalışmada sepsis prevalansı %12,4, septik şok prevalansı ise %11 olarak saptanmış olup mortalite oranı ise %48,4 olarak tespit edilmiştir(12).

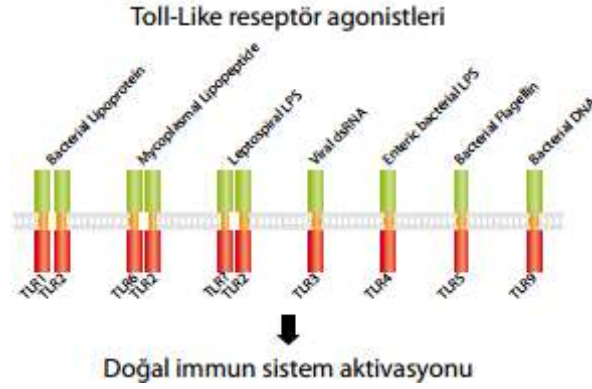
2.1.4. Sepsis fizyopatolojisi

Sepsis fizyopatolojisinde, mikrobik ajanlar ve inflamatuvar yanıt yer almaktadır. Sepsisle ilgili yapılan klinik ve deneysel çalışmaların çoğu sepsisin nasıl meydana geldiği ile ilgilidir. Sepsis fizyopatolojisi ile ilgili 3 hipotez gündemdedir(13). Bunlardan ilki aşırı ve kontrolsüz inflamatuvar cevabın sonucunda sepsisin geliştiğidir(13). Fakat yapılan çalışmalar sonucunda proinflamatuvar cevabın baskılanmasıyla sepsisin önlenemediği görülmüş ve başka hipotezler gündeme gelmiştir(13). İkinci hipotez ise, sepsisin direk aşırı proinflamatuvar cevaptan çok azalmış antiinflamatuvar cevapla ilgili olduğudur. Üçüncü hipotez ise sepsisin; patojenleri, onların ürünlerini temizlemekte yetersiz kalan ve böylece direk doku ve organ hasarı yapan kazanılmış bir

immünyetmezlik olduğudur. Diğer bir deyişle üçüncü hipoteze göre sepsis, bir immunparalizidir(13).

İmmün sistemin ana rolü, patojenleri tanımak ve uzaklaştırmaktır. İlk basamak patojenleri tanımaktır ve immün hücre yüzeyinde yer alan tanıma reseptörleri (pattern recognition receptors-PRRs), patojen bağımlı moleküler yapılar (PAMPs) tarafından aktive edilir(13). Vücudun doğal immünitesi tarafından algılanan ve tanınan bakteri ürünlerine, patojen-bağımlı moleküler yapılar [Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)] denir(14). Patojen-bağımlı moleküler yapılar içerisinde en önemlisi kuşkusuz lipopolisakkarid (LPS)'dir(14). Lipopolisakkarid yapısındaki endotoksinin lipid A bölümü toksisiteden sorumludur. Ayrıca gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısal komponentleri (peptidoglikan ve teikoik asitler), kapsül antijenleri ve ekzotoksinler (*Stafilococcus aureus*'un toksik şok sendromu toksinleri (TSST), *Streptococcus pyogenes*'in pirojenik toksinleri), mantarların hücre duvarı antijenleri, viral veya paraziter antijenler inflamasyona neden olabilir(15). PAMPs'ın doğal immün hücrelerle etkileşirken kullandığı PRRs'lerden en önemlisi Toll like reseptörlerdir (TLR). Antijen tipine, enfeksiyon ajanına bağlı farklı TLR'ler bulunmaktadır(Şekil-2). Örnek olarak TLR-4 reseptörleri lipopolisakkarid antijenini, TLR-2 ise lipoteikoik asiti tanır(13).

İmmün hücre yüzeyinde bulunan PPRs'lerin PAMPs'larla etkileşimi sonucu immün sistem aktive olur ve proliferasyon, fagositoz, sitokinlerin üretimi ve sekresyonu gerçekleşir.

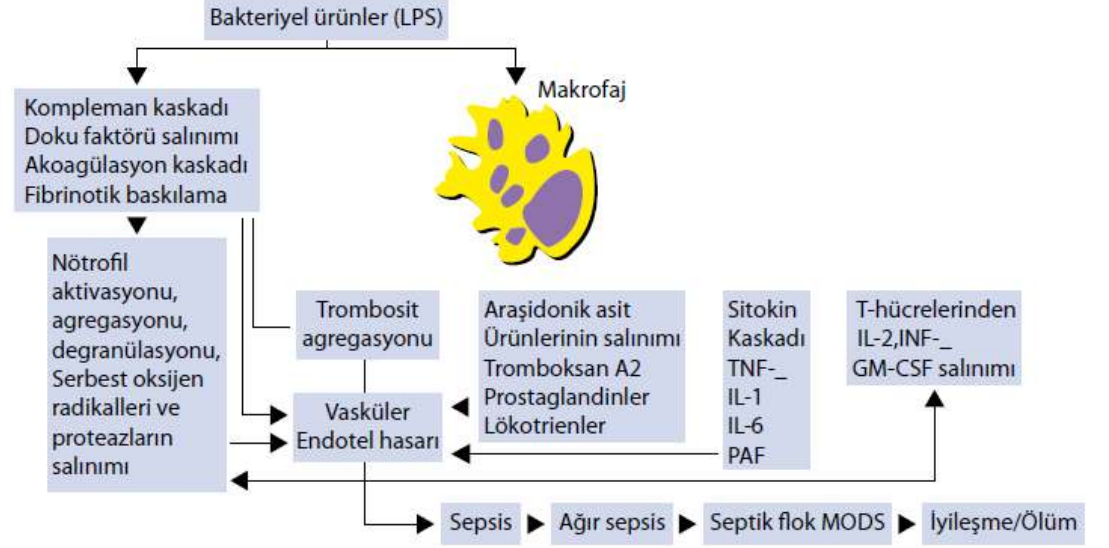


Şekil 2. TLR reseptör agonistleri(15)

PRR'nin uyarılması ile hücre içinde yeni gen ekspresyonları yada hücre fonksiyonları değişimi için aktivasyon başlar(13). Hücre içinde en önemli sinyal mekanizması Nükleer Faktör Kappa B(NF- κ B)'dir. NF- κ B'nin uyarılmasıyla inflamasyon ve immün sistemle ilgili olan genler aktive olur. Sepsis fizyopatolojisinde ana mekanizmalardan biri olduğu için tedavide gündemdedir (13). İnflamasyon ve immün sistem genlerini aktive eden bir diğer yol ise mitojenle aktive olmuş protein kinaz yolağı (MAPK)dır (13). Aktive olan genler sitokin üretimine neden olur. Birçok proinflamatuvar sitokin üretilir, en çok bahsedilen sitokin tümör nekrozis faktör alfa(TNF- α)'dır. Sitokinler proinflamatuvar süreci tetikleyerek lökosit, endotel aktivasyonu, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivasyonu, koagülasyon sistem aktivasyonundan sorumludurlar(Şekil 3)(13).

TNF- α ve interlekin-1 (IL-1) gibi sitokinler proinflamatuvar süreçte ilk 30-60 dakika içerisinde salınırlar. Yeni gündemde olan bir başka sitokin benzeri yapı

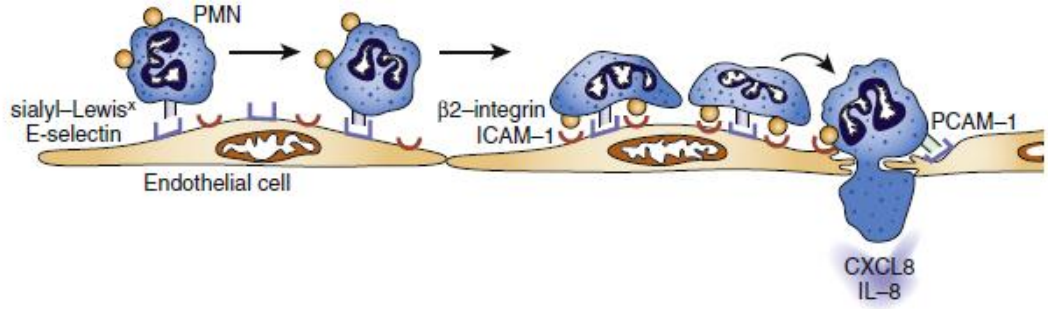
ise High Mobility Group B1(HMGB1), sepsisin daha geç evrelerinde salınır, proinflamatuvar süreci tetikler(13).



Şekil 3.Sepsis fizyopatolojisi (15)

Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı sonucunda endotel yüzeyinde adhezyon molekülleri olan selektin ailesinde bir artış olur, nötrofiller endotele yapışıp aracı moleküller sayesinde ekstravasküler alana dokulara yayılır (Şekil 4).

Nötrofilden salınan reaktif oksijen, nitrojen türevleri ve proteazlar sayesinde patojen yok edilir, ancak bu maddeler aşırı salındığında doku hasarı da yapar. Sepsisle meydana gelen organ hasarından özellikle dokulara lökosit infiltrasyonu sorumludur(13).



Şekil 4.Nötrofilin ekstrasvasküler alana migrasyonu(13)

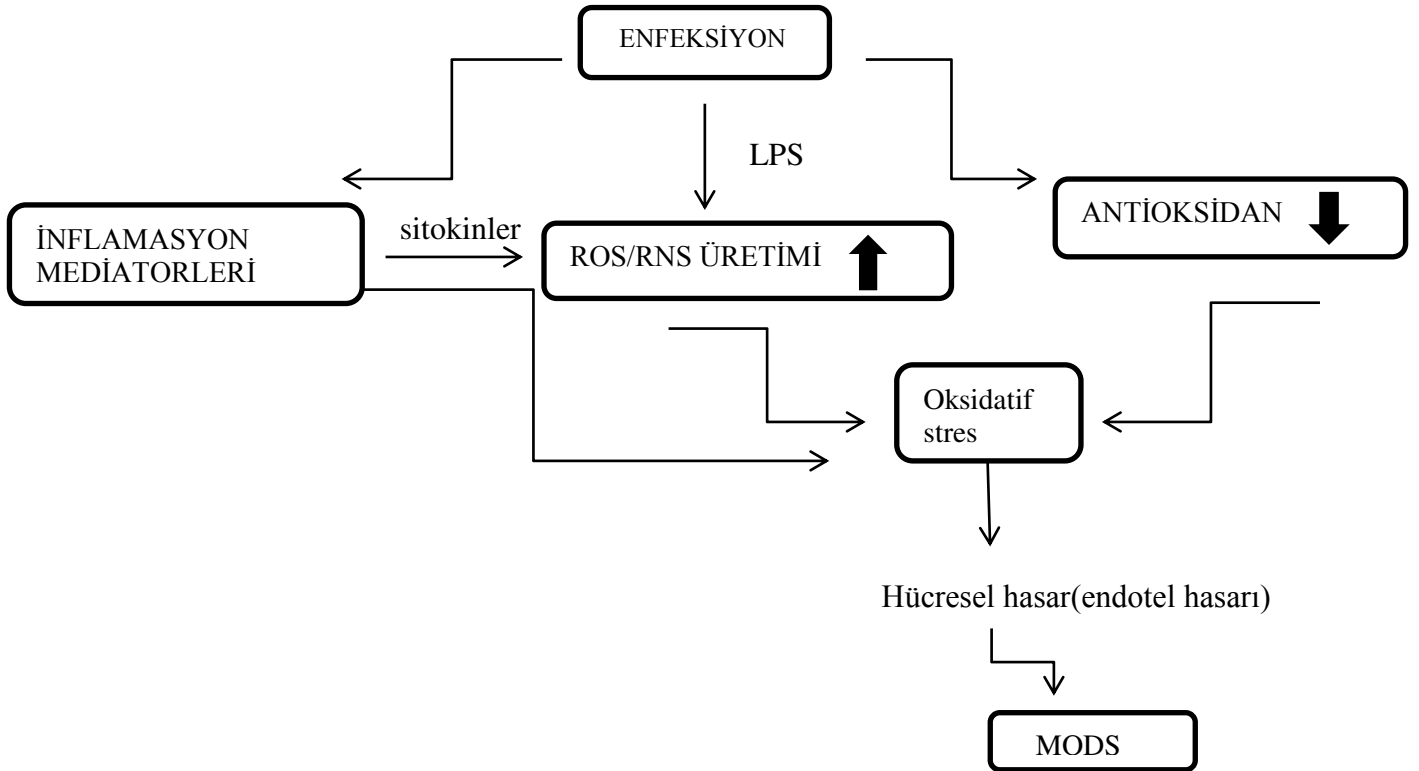
Proinflamatuvar sitokinlerin tetiklediği bir diğer mekanizma iNOS sentezinde artışa neden olarak nitrik oksit (NO) artışıdır. NO aşırı vazodilatasyona ve kardiyak depresyona neden olabilir. Oksidatif stresi tetikleyerek peroksinitrit oluşumuna neden olabilir ve böylece doku hasarına yol açabilir(13).

Proinflamatuvar sitokinler, koagulasyon kaskadını da aktive ederek dissemine intravasküler koagulasyona kadar gidebilecek ciddi problemleri tetikler(14). Doku faktörü üretimini arttırırlar, doku faktörü de daha sonra bir dizi proteolitik kaskadı aktive eder ve protrombin trombine ve fibrinojenden fibrin oluşumuna neden olur(14). Eş zamanlı olarak normal fibrinolitik mekanizmalarda da bir yetmezlik söz konusudur. Bunun en önemli nedeni plazminojen-aktivatör inhibitör tip 1 (PAI-1)'in artmasıdır(14). Bahsedilen olaylar sonucunda fibrin yapımında net bir artış ve yıkımında da bir azalma söz konusudur. Böylece küçük kan damarlarında fibrin tıkaçlar oluşur. Yetersiz doku perfüzyonu ve organ yetmezliği gelişir(14). Özellikle IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler güçlü bir şekilde koagülasyonu tetikler.

2.1.4.1 Sepsis patogenezi'nde reaktif oksijen türevleri (ROS)

Reaktif oksijen türevleri; süperoksit anyonu(O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\cdot$), hidrojen peroksiti(H_2O_2) içerir. Reaktif nitrojen ürünleri (RNS) ise NO, nitrojen dioksit radikalleri ve peroksit anyonudur.(16)

Sepsiste artan sitokinler, immün hücrelerin ve endotel hücrelerin ROS ve RNS üretiminde artışa neden olur. ROS üretimi sepsisin erken safhalarında başlar, çünkü asıl amaç patojenleri öldürmektir(16). Ama unutulmamalıdır ki, oksidatif stres kemotaksiyi azaltarak immün fonksiyonları da etkilemektedir(16). Sepsiste gelişen aşırı oksidatif stres, endotele zarar vererek sistemik vasküler hasara neden olur ve mikrodolaşım bozularak organ yetmezlikleri gelişir.



Şekil 5. ROS ve RNS'nin sepsis patogeneziindeki yeri(16)

Sepsiste artan H_2O_2 ve hidroksil radikali hücre içinde, endotelde protein, lipid ve DNA hasarına yol açarak hasara neden olur. Yapılan birçok çalışmada,

sepsis modellerinde ROS/RNS'de artış ve redox dengesinde meydana gelen dengesizlik sonucu oksidan-antioksidan sisteminde, oksidan sistem lehine artış olduğu gözlenmiştir(17). Bu dengesizliğin sebebi ya ROS aşırı üretimi yada antioksidan sistemdeki yetersizlik olabilir.

Bilinen antioksidanlar superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidazdır. Glutatyon(GSH) hücre içinde bulunan en önemli antioksidanlardandır ve GSH/ GSSG(okside glutatyon) oranı ise hücrenin redox durumunu göstermede indikatör olarak kullanılabilir. Sepsiste GSH düzeyi ve GSH/GSSG oranı düşmekte ve bu redoptaki dengesizliğin aşırı üretilmiş ROS'un GSH sentezini baskılamasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir(18).

Aynı zamanda superoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimlerin miktarında azalma ve imbalans tespit edilmiş, SOD/Katalaz oranının arttığı ve bu artışın da ROS yüzünden aşırı inaktive edilen katalaz yüzünden olduğu düşünülmüştür(19). Sepsiste gelişen SOD/Katalaz imbalansı ortamda H2O2 birikmesine sebep olur ve bu durum sepsis fizyopatolojisinde ciddi öneme sahiptir(19). Bu sebeplerle de sepsis tedavisinde antioksidan sistemi destekleyecek tedavilerin denenmesi gündeme gelmiştir(17).

2.1.5. Sepsis ve böbrek

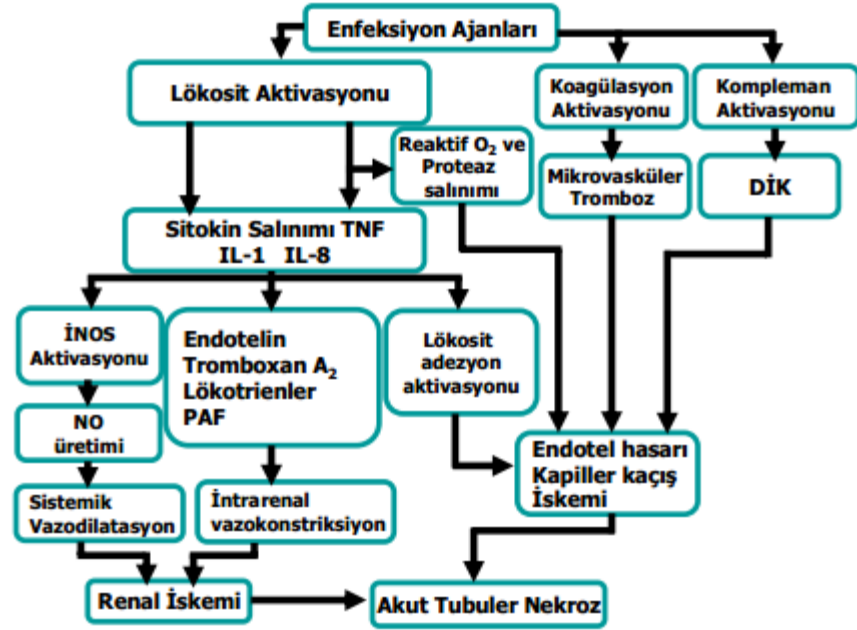
Sepsisle gelişen renal hasar 4 mekanizmayla açıklanabilir (Şekil 6)(20). Bunlardan ilki renal kan akışıdır. Renal kan akımının sepsis ve endotokseide azaldığı gösterilmiştir(21).

İkincisi inflamasyondur. Lipopolisakkaridle uyarımdan sonra hem mezengiyal hemde tübüler hücrelerde proinflamatuvar sitokinler salınır.(IL-1, IL-

6, TNF)(20). Üretilen bu sitokinler, vazokonstriksiyonu, nötrofil agregasyonunu, ROS üretimini, doku faktörü üretimini tetikler. Aynı zamanda TNF ek olarak, mesengiyal ve endotel hücrelerinden PAF, NO, prostoglandin E2, adenoazin, endotelin salınımını artırır(20). Artan ROS'un endotoksemide özellikle renal tübül hasarına yol açtığı gösterilmiştir(20). Endotoksemi sırasında antioksidan enzimlerden özellikle superoksit dismutazın hem kan damarlarında hemde böbrekte azaldığı gösterilmiştir(22). Superoksit dismutaz enzim aktivitesini taklit eden ajanlar hayvanlara verildiğinde sepsiste ölümlerin azaldığı gözlenmiştir(22).

Üçüncüsü hücrel mekanizmalardır. Sepsis sırasında gelişen epitel disfonksiyonunda özellikle renal tübüler epitel hücrelerindeki sıkı bağlantılarda (tight junction) hasar gelişir. İdrar akımı bozulur, silendirler oluşur, idrar ekstrasellüler alana sızar(20). Endotelyal disfonksiyon sepsiste proinflamatuvar sitokinler yüzünden gelişir ve nötrofil agregasyonu artar, mikrodolaşım bozulur.

Renal hasar gelişiminden sorumlu dördüncü ve son mekanizma ise koagulasyondur. LPS ve TNF stimulasyonuna bağlı doku faktörü sentezi artar ve glomerüler kapillerlerde fibrin tıkaçlar oluşarak böbrek dolaşımını bozar(20).



Şekil 6. Sepsiste renal hasar mekanizmaları

2.1.6. Sepsiste tedavi yaklaşımları

Sepsis tablosunun tanı ve tedavisi çok hızlı bir şekilde vakit kaybedilmeden gerçekleştirilmelidir. Mortalitesi %30-50'dir.

Sepsis tedavisinde ilk hedef bozulmuş temel yaşam fonksiyonlarını düzeltmektir(13). Hastanın oksijenasyonunun ve ventilasyonunun sağlanması, kan basıncı kontrolü ilk yapılması gerekenlerdir(13).

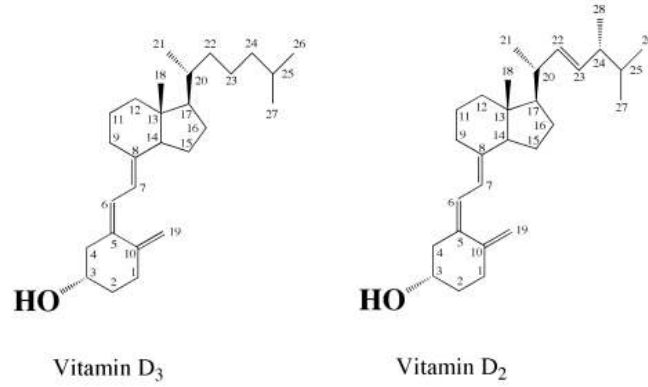
Sebebi olan ajana göre antimikrobiyal tedavi uygulanır. Destek tedavileri yapılmalıdır (vazopressor ajanlar, nutrisyonel destek, inotropik ajanlar, transfüzyon v.s.) Antiinflamatuvar ve antioksidan gibi deneysel tedaviler gündemdedir(16). (Endotoksin blokajı, antiTNF, anti IL-1, anti PAF gibi).

2.2.Vitamin D

Vitamin D, bilinen temel görevi barsaklardan kalsiyum ve fosfor emilimi olan yağda çözünen bir sekosteroiddir.

2.2.1 Vitamin D formları

Vitamin D'nin birçok formu vardır ancak temelde 2 ana formu vardır. (Vitamin D₃ ve Vitamin D₂). Vitamin D₃(kolekalsiferol) hayvan kaynaklıdır. Vitamin D₂(ergokalsiferol) ise bitki kaynaklıdır(Şekil 7).



Şekil 7.Vitamin D'nin iki temel formu(23)

2.2.2 Vitamin D sentez ve metabolizması

Vitamin D'nin %80'i endojen olarak üretilirken, %20'si besinlerle alınmaktadır.

Vitamin D'nin endojen üretimi epidermiste başlar. Epidermis 7 dehidrokolesterol içerir ve güneş ışığı ile gelen ultraviyole B (UVB) ışınlarıyla vitamin D₃ 'e çevrilerek kana salınır(24). Deride vitamin D₃ sentezini düzenleyen mekanizmalar vardır. Bunlardan bir tanesi aşırı UVB maruziyetinde, UVB'nin vitamin D₃ sentezini inhibe etmesidir(24). Bir diğeri ise cilt rengidir. Melanin, 7

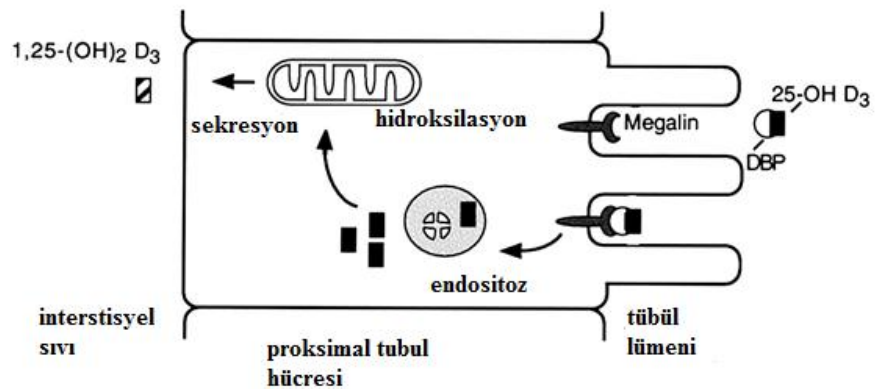
dehidrokolesterolle UVB ışını için yarışır, cilt ne kadar çok melanin içeriyorsa, o kadar az UVB ışını bağlanır ve vitamin D3 sentezi azalır(24). Bu yüzden açık tenli ırklarda yeterli vitamin D sentezi için 5-10 dakika güneş maruziyeti yeterliyken, siyah ırklarda bu süre en az 1 saattir. Ayrıca ekvatora yakın yaşayan insanlar sürekli güneş maruziyetinde olduklarından cilt rengi koyulaşır ve artan melanin UVB ile yarışarak endojen vitamin D sentezini azaltarak toksisiteyi önlemiş olur(25).

Vitamin D'nin asıl kaynağı endojen olduğundan, dengeli bir beslenmeyle bile yeterli vitamin D alımı sağlanamayabilir(25). Çünkü çok az besinde D vitamini vardır. Doğal haliyle vitamin D içeren besinler; yumurta sarısı, karaciğer, yağlı balık, balık yağıdır(25). Amerika, Kanada, Avustralya gibi ülkelerde vitamin D ile zenginleştirilmiş gıdalar üretilmektedir, özellikle yağda çözündüğünden margarinlere, sütlere, hatta portakal sularına bile yaklaşık 400 IU d vitamini eklenmektedir(25).

Vitamin D endojen olarak üretildikten veya besinler yoluyla alındıktan sonra kana geçer. Kanda önemli bir taşıyıcı protein olan vitamin d bağlayıcı proteinle karaciğere taşınır(25). Vitamin D bağlayıcı protein(DBP); ilk olarak 1959 yılında tanımlanmış, 58-kD ağırlığında alfa globülin ailesine ait bir proteindir(25). Karaciğerde sentezlenir. Vitamin D metabolitlerine olan ilgisi; $25(\text{OH})\text{D}_3 = 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3 > 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 > \text{Vitamin D} > 1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ şeklindedir(25). Serumda $25(\text{OH})\text{D}$ 'nin 0.04%'ü ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin 0.4%'ü serbest formda bulunur. Bu yüzden dolaşımdaki $25(\text{OH})\text{D}$ deposu DBP'dir. DBP'nin d vitamini transport proteini olmasının yanında çeşitli görevleri

keşfedilmiştir. Monomerik G aktin moleküllerini bağlayıp immün cevapta rol oynadığı, makrofaj aktive edici faktör olarak görev yapabildiği, anjiogenezi önlediği, özellikle tümör gelişiminde antianjiyogenik etkili olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur(26).

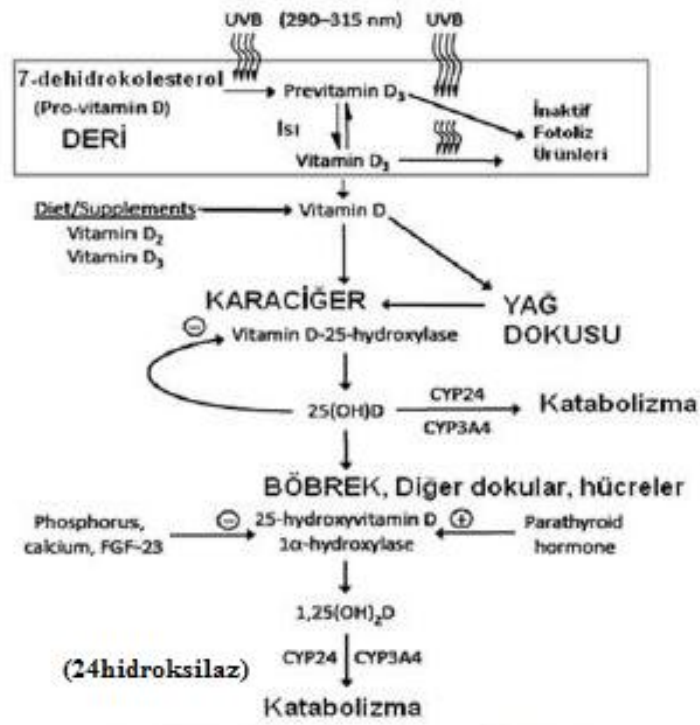
Kanda DBP ile karaciğere gelen vitamin D, 25. karbonundan hidroksilasyona uğrar(24). Dolaşımda bulunan temel vitamin D3 derivativesi, 25-OH vitamin D'dir. 25 hidroksilasyon vitamin D aktivasyonunda ilk basamaktır(23). Karaciğerde bulunan sitokrom p450 enzimlerinden CYP2R1 anahtar enzimdir(24). Karaciğerden tekrar kana geçen 25-OH vitamin D, böbreklere taşınır. Böbreklere gelen 25(OH)D3 glomerüllerden filtre edildikten sonra hem difüzyonla hemde endositoz yoluyla proksimal tübül hücresine tekrar emilir. (bu işlem sadece böbrekte değil tüm hücrelerde gerçekleşir). Endositoz için aracılık eden reseptör kompleksi mevcuttur, reseptör kompleksi megalin ve kubilinden oluşur(Şekil 8). Yapılan bir çalışmada megalin geni inhibe edildiğinde ratlarda ciddi proteinüri, 25(OH)D vitamini kaybı ve rikets gözlenmiştir(25).



Şekil 8. 25OH Vitamin D'nin renal tübül hücresine alımı(27)

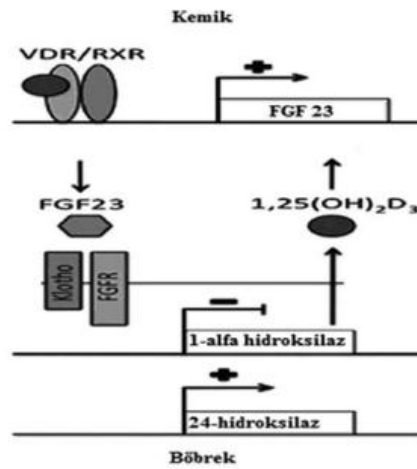
Proksimal tübülüs hücresine alınan 25-OH vitamin D mitokondride 1 alfa hidroksilasyona uğrayarak aktif form olan 1,25 OH Vitamin D haline dönüşür. Aynı zamanda deri, kemik, makrofaj, kolon, plasenta, prostat dokularında da 1 alfa hidroksilaz aktivitesi mevcuttur(25). Renal 1 alfa hidroksilaz aktivitesinin temel düzenleyicisi parathormondur(25). Parathormon(PTH) ve kalsitonin 1 alfa hidroksilaz aktivitesini artırırken; kalsiyum, fosfor, 1,25 OH Vitamin D, fibroblast büyüme faktörü(FGF)23 aktiviteyi inhibe eder(25). Ekstrarenal dokulardaki 1 alfa hidroksilaz aktivitesi lokaldir. Renal dokudaki 1 alfa hidroksilaz aktivitesi düzenleyicileri ekstrarenal dokularda etkili değildir(25).

Böbrekte 1 alfa hidroksilaz aktivitesinin yanısıra 24 hidroksilaz aktivitesi de vardır (Şekil 9). Serum kalsiyum fosfor ve PTH düzeylerinin normal olduğu durumlarda 25(OH)D ve 1-25(OH)2D, böbreklerden 24-alfa hidroksilaz enziminin aktivasyonu ile biyolojik olarak inaktif şekillere metabolize olmaktadır. (24-25 dihidroksi vitamin D ve 1,24,25 trihidroksi vitamin D)(28).



Şekil 9. Vitamin D metabolizması(28)

1-25(OH)₂D sentezi azaldığında 1-alfa hidroksilaz enzim aktivitesi artarken, 24-hidroksilaz enzim aktivitesi azalmaktadır. Yine, FGF 23'ün, 24-hidroksilaz enzim aktivitesini artırdığı gösterilmiştir(29)(Şekil 10).

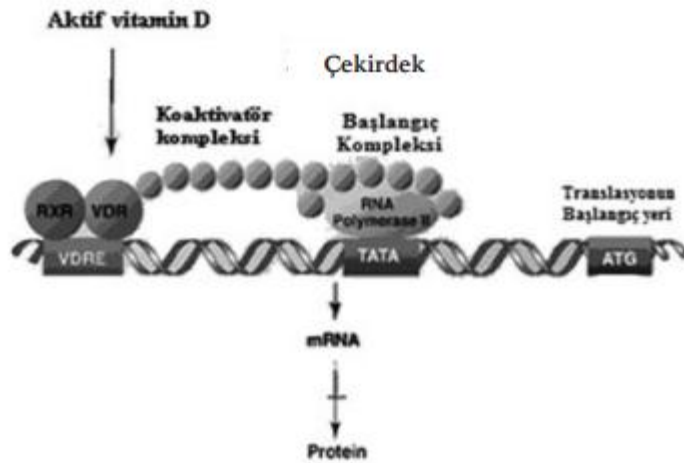


Şekil 10. FGF 23 ve Vitamin D (28)

2.2.3. Vitamin D'nin etki mekanizması

D vitamininin reseptör düzeyindeki etkisi aktif D vitamini sayesinde gerçekleşir ve bu etki ya doğrudan nükleer d vitamini reseptörü (DVR) üzerinden gen transkripsiyonunu regüle ederek ya da hücre membranı üzerindeki DVR üzerinden genellikle geçici olan iyonların kalsiyum(Ca), klorür (Cl) transmembran geçişini değiştirerek veya hücre içi sinyal yolak aktivitelerini (cAMP, PKA, PLC, PI-3 kinaz ve MAP kinaz), aktive ederek gerçekleştirmektedir(28).

DVR; steroidler, retinoik asit reseptörlerini içeren bir nükleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesidir(25). DVR geninin hedef gende eksprese olabilmesi için retinoik asit X reseptörü (RXR) ile bir heterodimer oluşturması gerekir(25). Böylece, aktif D vitamininin bağlı olduğu kompleks, DNA üzerinde bulunan D vitamini cevap elemanı (vitamin D responsive element, VDRE), olarak bilinen bölgeye bağlanır transkripsiyon gerçekleşmiş olur.(Şekil 11)



Şekil 11.Vitamin D etki mekanizması(28)

Böylece, DVR-gen ekspresyonu sayesinde kalsiyum bağlayıcı protein veya osteokalsin gibi gen ürünleri üretilerek yada inhibe edilerek gen düzeyinde D vitamininin etkisi gerçekleşir(genomik etki)(28). Diğer yandan, aktif D vitamini, plazma membran reseptörüne bağlanıp cAMP gibi ikinci habercileri aktive ederek Ca kanalları, pankreasın beta hücreleri, vasküler düz kaslar, bağırsaklar ve monositler üzerinde de etkili olabilmektedir (non-genomik etki)(28).

2.2.4. Vitamin D'nin etkileri

2.2.4.1. Vitamin D'nin iskelet sistemi üzerine etkileri

Vitamin D barsaklardan kalsiyum ve fosfor Emilimini sağlayarak kemik mineralizasyonunu sağlar. Barsaklardan kalsiyum Emilimi parasetülör yada transportu sağlayan özel kanallar(TRPV 5-6) aracılığıyla olur(25). 1,25 (OH) Vitamin D ise TRPV5-6 ekspresyonunu arttırarak, kalsiyum bağlayıcı protein (kalbindin) sentezini arttırarak kalsiyum Emilimini sağlar(25).

Vitamin D eksikliğinde normal kemik mineralizasyonu bozulur ve çocuklarda rikets, erişkinlerde ise osteomalazi gözlenir(25). Vitamin D'nin kemik üzerinde hem direk hem de indirek etkileri söz konusudur. Direk etkisi, osteoblastları maturasyon, diferansiasyon ve proliferasyon yönünde uyarmasıdır(25). İndirek etkisi ise, osteokalsin, osteopontin, alkalen fosfataz, matriks metalloproteinaz-9 ve kollajen gibi moleküllerin gen düzeyinde sentezi etkilemesidir(25). 1,25 (OH) Vitamin D aynı zamanda kemik rezorpsiyonunu da uyarır, bu etkisini prekürsör hücrelerin osteoklasta çevrilmesini uyarak yapar(25).

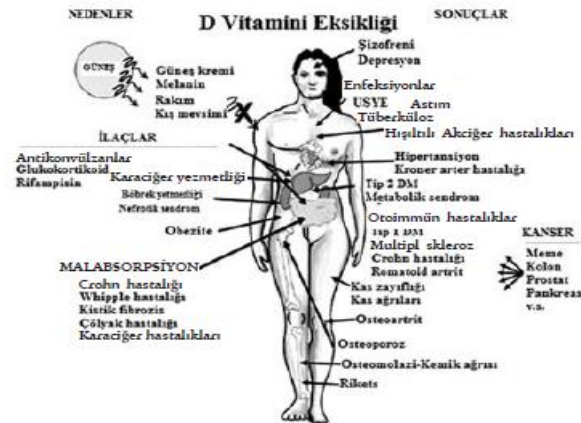
Sonuç olarak, Vitamin D iskelet sistemi üzerinde kemik mineralizasyon dengesini, kalsiyum ve fosfor emilimini arttırarak, hem osteoblastları hem de osteoklastları uyarak sağlar.

2.2.4.2. Vitamin D'nin iskelet dışı sistemler üzerine etkileri

Vitamin D reseptörü iskelet sistemi dışında birçok hücrede bulunmaktadır.(hematopoetik hücreler, makrofajlar, prostat, meme, epidermis ve kanser hücreleri...).Bu sebeple VDR'nin bulunduğu her hücrede 1,25 (OH) Vitamin D etkisi gözlenmektedir.

Son epidemiyolojik çalışmalarda vitamin D'nin antiinflamatuar, immünmodülatör özellikleri ve sitokin seviyeleri üzerine olası etkileri nedeniyle, düşük vitamin D seviyeleri; kanserler, otoimmün hastalıklar, hipertansiyon ve enfeksiyöz hastalıklar gibi birçok hastalığın artmış riskiyle ilişkilendirilmektedir(28)(Şekil 12).

D vitamininin iskelet sistemi dışındaki etkilerini üç grupta toplamak mümkündür. Bunlar immün fonksiyonların regülasyonu, hücrel proliferasyon ve diferansiasyonun regülasyonu, ve hormon sekresyonunun regülasyonudur.



Şekil 12. Vitamin D eksikliği

2.2.4.2.1 Vitamin D ve immün sistem

D vitamini veya onun aktif metabolitlerinin immün fonksiyonların modülasyonu üzerine olan etkileri bilinmektedir(25). DVR birçok hücrede bulunduğu gibi antijen sunucu hücrelerde (makrofaj, monosit, dendritik hücreler) de bulunur(25). DVR'nin timus ve periferik T hücrelerinde bulunması D vitamininin T hücre fonksiyonu ve gelişimi üzerine etkisi olduğunu göstermektedir. B hücrelerinde ise DVR ihmal edilebilecek düzeydedir(28).

D vitamini kazanılmış immün cevap üzerine inhibitör etki gösterir. Özellikle immünglobülin üretimini baskılar, T hücre proliferasyonu üzerine inhibitör etki yapar(30). Antijenle uyarılan T hücreleri sitokin üretme durumuna göre iki farklı tip T hücreye ayrışır. Bunlar Th1 (inflamatuvar T-hücreler), Th2 (anti-inflamatuvar T-hücreler) Th 1 hücreleri; proinflamatuvar sitokinler, IFN- (interferon) gamma, interlökin-2(IL-2) ve TNF alfa, üretirler ve bu sayede kuvvetli hücresel immün cevaptan sorumludurlar(28). Th-2 hücreleri ise anti-inflamatuvar sitokinler, interlökin-4 (IL-4) ve interlökin-5 (IL-5) üretir ve antikor merkezli immün cevaptan sorumludur(28). Bu iki hücre tipi arasındaki dengenin bozulması immün yanıtın hangi yönde çalışacağını gösterir. Yapılan çalışmalarla D vitamininin Th2 hücreleri uyatarak anti-inflamatuvar sitokinlerin (IL-4, IL-5) üretimini arttırdığı gözlenmiştir(31). Yine D vitamini pro-inflamatuvar Th1 hücre üzerinden IFN-gamma, IL-2, TNF-alfa salınımını inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterebilmektedir(31). D vitamini eksikliğinde aktive olan ve Th1 yanıtı için karakteristik olan proinflamatuvar sitokinler aslında tip 1 diabetes mellitus, multiple skleroz, romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi

otoimmün hastalıkların etyopatogenezinde de görev almaktadırlar(25). D vitamini, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını inhibe ederek interlökin 12 (IL-12) salınımını inhibe ederken, antiinflamatuvar sitokin olan interlökin 10 (IL-10) salınımını artırır ve dengenin Th2 yönüne kaymasını sağlar(25). Yine, Th1 ve Th2 hücrelerine ek olarak CD4 T hücreleri, regülatuar (Treg) ve süpresör T hücrelerine dönüşebilir (Şekil 5). T(reg) hücrelerin asıl görevi periferik T hücrelerinin oto-aktivasyonunu önlemektir. D vitamini, regülatuar T hücrelerini olumlu yönde etkiler. D vitamini eksikliği durumunda Treg sayı ve aktivitesi bozulur; Th1 üzerindeki inhibisyonu kalkar ve otoimmün hastalıkların gelişimine zemin hazırlanır(25).

D vitamini doğal immünite de ise “naturel killer” hücreleri ve solunum yolunun epiteliyal hücrelerinden antimikrobiyal peptit-katolisidin sentezini uyarır. Buradan D vitamini sayesinde, solunum yolu ile bulaşan mikroorganizmaların neden olabileceği hastalıkların engellenmiş olabileceği anlaşılmaktadır(32). Böylece D vitamini doğal immün sistem etkileşimine bağlı olarak organizmayı çevresel patojenlere karşı korumuş olmaktadır.

2.2.4.2.1.1. Vitamin D ve enfeksiyonlar

Vitamin D güçlü bir immünmodülatördür. Vitamin D’nin immünmodülatör etkisi ile ilgili ilk deliller; düşük vitamin D düzeyleri olanların M. tuberculosis enfeksiyonuna daha hassas ve hastalığı daha ağır geçiriyor olmalarının fark edilmesiyle gündeme gelmiştir(33).

Mikrobiyal invazyona ilk direnç doğal immün sistem hücreleriyle olur. Mikrobiyal eradikasyonundaki temel mekanizma antimikrobiyal peptidler

tarafından uyarılan TLR'nin uyarılmasıyla gerçekleşir. 1,25 (OH) Vitamin D, immün hücrelerde katelisidin (antimikrobiyal peptid) sentezini uyarır(34). Aynı zamanda doğal immün sistemin önemli düzenleyicilerinden olan kalprotektin ve S-100 proteinleri de aktif vitamin D aracılığıyla artmaktadır(35).

Üst solunum yolu enfeksiyonları ile ilgili yapılan bir çalışmada, vitamin D düzeyi düşük olanlarda enfeksiyon sıklığının arttığı gösterilmiştir(36).

Monosit ve makrofajların D vitaminin bulunduğu bir ortamda kemotaktik ve fagositik özelliklerini arttırdığı gösterilmiştir(37).

D vitaminin immunmodulasyonda bu denli etkili olması vitamin D'nin sepsis tedavisinde kullanılabileceğini gündeme getirmiştir.

2.2.4.2.1.2. Vitamin D ve sepsis

Vitamin D, kök hücrelerden monosit ve makrofaj gelişimini miyeloid dokuda bulunan vitamin D reseptörüyle stimüle eder(3). İnflamatuvar sitokinlerden TNF alfa ve benzeri sitokinlerin salınımı özellikle SIRS gelişiminde anahtar rol oynar, ve vitamin D'nin bu sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek sepsis gelişimini inhibe edebileceği düşünülmektedir(3). Aynı zamanda vasküler yapıda bulunan vitamin D reseptörleri , vitamin D nin direk inotropik etkilerine aracılık ederek sepsiste gelişen hemodinamik bozukluğu düzeltmede katkıda bulunabilir(3).

Sepsis yapılan eş zamanlı aktif D vitamini verilen farelerde,48 saat sonra yaşam oranının %39 arttığı tespit edilmiş ve endotoksemi inhibisyonunun tromboksan regülasyonu aracılığıyla olduğu iddia edilmiştir(38).

E.coli LPS ile sepsis yapılan ratlarda verilen d vitaminin trombosit sayısı, ALT, kreatinine yararlı etkiler gösterdiği ve özellikle dissemine intravasküler koagulasyona (DIC) karşı koruyucu etkilerinin olduğu gözlenmiştir(39). Sepsiste DIC gelişimi hastaların mortalitesine önemli etkide bulunur. Vitamin D'nin monositlerde trombomodulini upregule, doku faktörünü (TF) ise down regüle ederek DIC'i önleyebileceği tespit edilmiştir(39).

Sepsiste; makrofajların optimum dozda katelisinin üretebilmesi için ortamda yeterli miktarda D vitaminin olması gerekir(32). Ortalama vitamin D ve katelisinin seviyeleri sepsisli hastalarda düşük bulunmuştur(32).

Vitamin D 'nin aktif formu, interferon gama, IL-12 üretimini azaltarak, monositlerin diferensiasyonunu uyarak ve CD14 ekspresyonunu arttırarak LPS'ye cevabı arttırır(40).

Sepsiste immün aktivasyonun gerçekleştirilmesinde bir diğer önemli olan vasküler endotelial hücrelerdir ve bu hücrelerde yapılan bir çalışmada gram negatif LPS ile sepsis yapıldıktan sonra NF- κ B ve immün aşırı aktivasyonu sağlayan proinflatuar sitokinlerin D vitamini tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir(40).

Sepsisli hastaların vitamin D eksikliği olanlarında mortalite daha yüksektir(32). Bune ek olarak septik hastalarda vitamin d bağlayıcı protein de düştüğü için vitamin D eksikliği gelişmektedir(32).

2.2.4.2.2.Vitamin D ve kanser

Kanser mortalitesinin ekvatoran uzaklaştıkça arttığı geçen yüzyılın başlarında bildirilmiştir(41). 1940'lı yıllarda kanser mortalitesinin kuzeyde

yaşayanlarda güneyde yaşayanlara göre yüksek olduğu, 1980’li yıllarda ise kolorektal kanser ve yaşanan enlem arasındaki ilişki bildirilmiştir(41). Kolon, prostat ve meme kanseri insidansının UVB ışınlarının bol olduğu bölgelerde daha düşük olduğu gösterilmiştir(41).

1,25 (OH) D hücre proliferasyonunu ve diferansiasyonunu inhibe eder(25). Çeşitli büyüme faktörlerini kullanarak, G1/G0 fazında hücre siklusunu durdurur(25). Siklin bağımlı kinaz aktivitesini inhibe eder.(p21-p27)(25). Apoptozisi indükler, antiapoptotik gen olan bcl-2 yi inhibe eder(25). Anjiyogenezi inhibe eder(25). Prostoglandin sentezini inhibe ederek, antiinflamatuvar etki gösterebilir. İnflamatuvar sitokin düzeyini azaltır. Bu sayılan sebepler yüzünden d vitamini eksikliği kanser gelişimi açısından risk faktörüdür.

2.2.4.2.3. Vitamin D ve deri

Kültüre keratinositlerde yapılan çalışmalarda D vitamininin keratinosit proliferasyonunu inhibe ettiği ve diferansiasyonunu ise stimüle ettiği gösterilmiştir. Psöriazisin fizyopatolojisinde ise keratinosit hiperproliferasyonu olduğundan özellikle tedavide kullanılmaktadır(42). Yine deride d vitamini proinflamatuvar sitokinleri baskıladığından çeşitli hiperkeratozlarda tedavide kullanılabilir. D vitamini ayrıca UVB’nin derideki zararlı etkilerini bir antioksidan olan metallothionenin üretimini artırarak önleyici olabilmektedir(42).

2.2.4.2.4. Vitamin D ve kardiyovasküler sistem

Vitamin D vasküler kalsifikasyonu azaltır. NHANES(The National Health and Nutritional Examination Surveys)1988-1994, 2000-2004 yılları arasındaki

16.603 kişide yaptığı çalışmalarda iskemik kalp hastalığı ve inmesi olan hastaların büyük çoğunluğunda D vitamini düşük gözlenmiştir. Koroner kalp hastalarının %74ünde, <17,8ng/ml'dir. Framingham çalışmasında ise, kardiyovasküler hastalığı olmayan ve vitamin D düzeyleri <10 ng/ml olanların, ilk 5 yıl içinde kardiyovasküler olay geçirme riskleri >15 ng/ml olanlara göre çok daha yüksek bulunmuştur. 3000 tane koroner anjiyo yapılan hastada <10 ng/ml olanların 7 yıllık takibinde ani kardiyak ölüm, kalp krizi, fatal inme gelişme riski >30 ng/ml'ye göre 3-5 kat artmış tespit edilmiştir.

Kardiyovasküler sisteme ait endotelial hücreler, kardiomyositler, vasküler düz kas hücrelerinde DVR bulunur ve aktif D vitamini ile etkileşime girerler. Vitamin D özellikle vasküler tonusu ayarlama endotele kalsiyum giriş çıkışını ayarlama önemlidir. VDR knockout farelerde kardiyak hipertrofi, hipertansiyon ve atrial natriüretik peptid sentezinde artış gözlenmiştir.

2.2.4.2.5.Vitamin D ve diabetes mellitus

Otoimmün olarak pankreasın beta hücreleri tahribatı sonucu gelişen Tip 1 diabetes mellitus (DM)'ta her ne kadar genetik faktörler etkili ise de, identik ikizlerde konkordansın düşük oluşu ve genetik yatkınlığı olan birçok çocukta hastalığın görülmemesi, çevresel faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmüştür(37). Diabetes mellitusla ilgili çevresel faktörler gözönüne alındığında vitamin D'nin önemli olabileceğini düşündüren bazı araştırmalar vardır. Tip 1 DM önlenmesinde vitamin D'nin etkin olduğu, Finlandiya'da yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Hayatlarının ilk yılında 2000 IU vitamin D

verilen çocuklarda Tip 1 DM oluşma riskinin %78 azaldığı, 31 yıllık takip sonucu anlaşılmıştır (43).

1,25(OH)2D3 insülin salgısını stimüle eder. Bunun etki mekanizması tam anlaşılamamakla birlikte nükleer vitamin d reseptörleri aracılığıyla olduğu düşünülmektedir(44). Vitamin D eksikliğinin insülin direncine, pankreatik b hücre disfonksiyonuna ve metabolik sendroma yatkınlık yarattığı da saptanmıştır(45).

Düşük 25-OH vitamin D seviyeleri hayvanlarda yüksek glukoz konsantrasyonuna ve azalmış insülin sensitivitesine yol açarak diabet gelişimine zemin hazırlar(46). İnsan çalışmalarında ise özellikle d vitamini düzeylerinin düşüklüğü glukoz intoleransının gelişmesine tip 2 diabet ve metabolik sendrom gelişimine yol açmaktadır(47). Ve vitamin D tedavisinin tip 2 diabetli hastalarda insülin sensitivitesini ve sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir(48).

2.2.4.2.6.Vitamin D ve obezite

Obezitenin vitamin D yetersizliğine neden olduğu saptanmıştır. Fazla olan yağ dokusunda vitamin D'nin fazla tutulmasıyla metabolik olarak kandan arındırıldığı ileri sürülmüştür.

Birçok araştırma erişkin obezitesinin vitamin D düzeyleri ile ters orantılı olduğunu göstermiştir ve adipogenezin 1,25(OH)2D3 ile inhibe olduğu ileri sürülmüştür(49). Normal serum vitamin D düzeyleri olan kadınlarda, düşük olanlara göre vücut ağırlığı, vücut kitlesi; bütün bölgelerdeki ölçülmüş yağ miktarları daha düşük bulunmuştur(50).

2.2.5.Vitamin D eksikliği

Hastaların vitamin D durumunu yansıtan 25(OH) Vitamin D'dir. 1,25 (OH) Vitamin D'yi ölçmek daha zordur, 25(OH) Vitamin D'ye göre serumda 1000 kat daha az bulunurlar ve yarı ömrü çok kısadır.1,25(OH) Vitamin D radioimmünassay yöntemle ölçülebilmektedir. 25(OH)Vitamin D ölçümünde ise immünassay yöntemlerin (kemiluminesans,radioimmünassay..) yanısıra HPLC (High performance liquid chromatography) ve HPLC-tandem kütle spektrometri de kullanılmaktadır(25). Referans yöntem olmamakla birlikte HPLC-tandem kütle spektrometri ölçüm yöntemi olarak önerilmektedir(25).

Vitamin D referans aralığı ile ilgili henüz çalışmalar sürmektedir, otörlerin birçoğu 10-68 ng/ml aralığını kabul etmektedir, 10 düşük bir değer olmakla birlikte henüz kaçaya yükseltilmesi gerektiği ile ilgili bir konsensüs oluşmamıştır(25). 25(OH) Vitamin D düzeyleri için <20 ng/ml eksiklik, 20-30 ng/ml arası yetmezlik olarak tanımlanmaktadır(51). >150 ng/ml ise toksik doz olarak kabul edilmektedir.

Ağızdan alınan 1 mikrogram(40 IU) 25 (OH) D, serumda 0,48 ng/ml 'lık yükselmeye yol açar(25). Bu durumda bir kişinin vitamin D düzeyinin 20 ng/ml üzerine çıkması için günlük ihtiyacı 600 IU, 30 ng/ml üzerine çıkması için ise 800-1000 IU'dir(25). Amerika'da şimdiki guidelinelar çocuklarda 200-400 IU/gün, erişkinde 200-400 IU/gün, yaşlılarda ise 600-800 IU/gün ek vitamin D kullanımını önermektedir(25).(Tablo-3)

Yaş	Yeterli	>30 ng/ml
0-1 yaş	400 IU/gün	
1-18 yaş	400-600IU/gün	1000 IU/gün
19-50 yaş	600IU/gün	1500-2000IU/gün
50-70 yaş	600-800 IU/gün	1500-2000IU/gün
Hamile-emzirme	600-800 IU/gün	1500-2000 IU/gün

Tablo 3. Günlük vitamin D ihtiyacı(52)

Toplumda güneş maruziyetinin azalmasıyla birlikte vitamin D eksikliği oluşmaktadır. Amerika’da genç sağlıklı erişkinlerin %36’sında, hastaneye giden yada tedavi alan erişkinlerin ise %57’sinde vitamin D eksikliği tespit edilmiştir(53).

Ankara Etlik Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde yapılan bir çalışmada retrospektif olarak taranan verilerde hastaneye başvuran hastaların %51.8 inde vitamin D eksikliği, %20.7’sinde ise vitamin D yetmezliği tespit edilmiştir(54).

Akman ve arkadaşlarının 1-16 yaş grubu çocuklarda Türkiye’de yaptıkları çalışmada 20 ng/ml sınır değer olarak alındığında %8 oranında D vitamini eksikliği, %25.5 oranında D vitamini yetersizliği tespit edilmiştir(55).

Vitamin D eksikliğinin en sık sebebi güneş maruziyetinin az olmasıdır. Deriden azalmış sentez(mevsim, deri pigmentasyonu, yaşlanma, yaşanan enlem), azalmış biyoyararlanım (malabsorbsiyon, obezite) artmış katabolizma (antikonvulzan, kortikosteroid), laktasyon, azalmış sentez (karaciğer hastalıkları) vitamin D eksikliğinin sebepleridir. Vitamin D eksikliğinde, çeşitli tedavi protokolleri uygulanabilir(Tablo 4).

Vitamin d eksikliği olan hastalar		
0-1 yaş	6 hafta; 2000IU/gün yada 50000 IU/hafta	Devamında 400-1000IU/gün
1-18 yaş	6 hafta; 2000IU/gün yada 50000 IU/hafta	Devamında 600-1000IU/gün
Erişkin	8 hafta; 6000IU/gün yada 50000IU/hafta	Devamında 1500-2000IU/gün

Tablo 4. Vitamin D eksikliği olan hastalarda tedavi protokolleri

Vitamin D toksisitesi ise genelde 10.000 IU/gün alınan dozlarda gözlenir(52).

2.3. Serbest Radikal Metabolizması

Bir serbest radikal 1,3,5 gibi tek sayıda elektronlara sahip herhangi bir molekül olarak tanımlanır. Hem organik hem de inorganik moleküler halde bulunurlar ve oldukça reaktif özellikler taşırlar. İn vivo, normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan serbest radikaller ayrıca organizmanın radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara(ilaçlar..) ve doğal durumda serbest radikal metabolitleri oluşturan ksenobiyotiklere maruz kalınan durumlarda meydana gelirler(56).

Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri sayısız enzimatik tepkime ve biyolojik fonksiyon için gereklidir. Ancak her bir radikalın yapısı ve etkili olduğu yere göre hücrel hedefler risk altındadır(56).

Genellikle kararsız ve çok reaktiftirler. Bu yüzden çevrelerindeki atom ve moleküllerle etkileşirler. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir(57).

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Oksijenin indirgenme sürecinin tam olarak tamamlanamasıyla veya elektron düzeninde oluşan değişikliklerle reaktif oksijen türevleri oluşur. Reaktif oksijen türevleri diye adlandırılan moleküller, süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojenperoksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalıdır ($\bullet OH$)(58).

2.3.1.1. Superoksit Radikali

Moleküler oksijen dış yörüngesinde eşlenmemiş 2 elektron içerdiği için diradikaldır. Bu iki elektron iki farklı spinde bulunur, oksijen kararlı duruma geçmek için suya dönüşmek amacıyla elektron almak ister ve elektronları teker teker alarak superoksit anyon radikalini($O_2^{\bullet-}$) oluştur(59).

Superoksit anyon radikali başlıca elektron transport zincirindeki kaçak elektronlardan kaynaklanır(59). NADPH'ın NADPH oksidaz tarafından oksitlenmesiyle, ksantin ve hipoksantin ksantin oksidazla oksitlenmesiyle, geçiş metalleri varlığında hemoglobinin ve monoaminlerin otooksidasyonu ile moleküler oksijenden oluşabilir(59).

2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

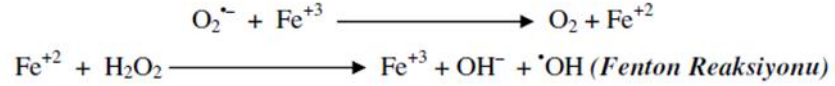
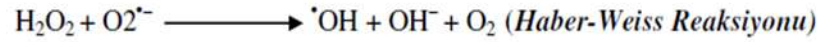
Eğer moleküler oksijene 2 elektron eklenirse hidrojen peroksit(H_2O_2) oluşur. Genellikle superoksit dismutaz enziminin katalizlenmesiyle ya da spontan gerçekleşen 2 superoksit molekülünün girdiği reaksiyonla gerçekleşir. Bu reaksiyon bir dismutasyon reaksiyonudur. Hidrojen peroksit bir radikal değildir ama yapısı çok kararsızdır. Geçiş metalleri (ferröz demir) hidrojen peroksit bir

elektron vererek hidroksil radikali oluşumuna yol açar(59). Hidrojen peroksit membranları su gibi kolayca geçebilir(56).



2.3.1.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali Haber–Weiss reaksiyonu, Fenton reaksiyonu ya da suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşan bir oksidandır Hidroksil radikali yarı ömrü çok kısa fakat hasarlayıcı bir moleküldür. Birçok organik molekülü oksitleme kapasitesine sahiptir(60).



2.3.1.4. Hipokloröz Asit (HOCl)

Enzimatik olarak nötrofiller tarafından üretilir, güçlü bir oksidandır. Aktive olan nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller süperoksit üretirler. Özellikle nötrofiller, içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığı ile süperoksitin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür(57).

2.3.1.5. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit azot monoksit veya nitrojen monoksit olarak da bilinir. L-argininden nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla üretilir. Yarı ömrü çok kısadır. NO eşlenmemiş bir elektron içerdiği için oksijen, superoksit radikalleri, geçiş metalleriyle hızla reaksiyona girmektedir. Nitrik oksit radikali superoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyona girerek onlardan daha oksidan bir ajan olan peroksinitriti (ONOOH) meydana getirir. Peroksinitrit bir radikal değildir ancak reaktif bir moleküldür(61).

2.3.2. Serbest Radikal Harabiyeti Riski Altındaki Hücresel Komponentler

2.3.2.1. Lipidlere olan etkileri

Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluşturlar(56). Reaktif oksijen türleri çoklu doymamış yağ asidi molekülünden bir hidrojen atomu çıkardığı zaman bir lipid radikali meydana gelir ve buna da oksijenin katılmasıyla lipid peroksil radikali oluşur. Birçok yıkım sonrası son ürün olan malondialdehid (MDA) oluşur. Dokudaki ve kandaki MDA seviyesi lipid peroksidasyonu ve lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. MDA, hücre için çok toksik bir molekül olup aynı zamanda mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olarak kabul edilir(62).

2.3.2.2. Proteinlere etkileri

Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asid kompozisyonlarına bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, methionin, sistein gibi doymamış ve sülfür içeren amino asitler daha fazla olmak üzere amino asit türü ve dizilimine göre serbest radikallerden etkilenirler ve dimerler, büyük

agregatlar oluşur. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden ne kadar etkileneceği amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir(56).

2.3.2.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya etkileri

Radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek tek ya da çift dal kırıklarına neden olurlar. DNA üzerinde etki ile hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste, büyük oranda, ya nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine, ya da DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır(56).

2.3.2.4. Ekstrasellüler Etkileri

Serbest radikaller, inflamatuvar cevabı ve ardından gelen doku harabiyetini modüle etmede önemli rol oynarlar(56). İnflamatuvar hücre kaynaklı serbest radikallerin oluşturduğu harabiyetten en çok etkilenen ekstrasellüler doku komponentleri olan hyaluronik asit ve kollajendir(56). Kollajen, superoksit radikalının jelasyonu engellemesi sonucu harap olur. Eklemde sinoviyal sıvının viskozitesini sağlayan hyaluronik asit ise superoksit radikali tarafından depolimerize edilir(56).

2.4. Antioksidan Sistem

Yükseltgenebilir bir substratla (protein, lipid, karbonhidrat..) karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu zaman o substratın oksidasyonunu belirgin biçimde geciktiren yada önleyen maddeye antioksidan denir(63). Antioksidanlar, biyomoleküllerde bozulmaya neden olan ROT'ları ortadan kaldırabilen, oksidatif hasarın yayılmasını engelleyen maddelerdir. Farklı

organ, hücre ve hücre organellerinde farklı ROT'lara karşı, farklı antioksidanlar bulunmaktadır(64).

Antioksidan savunma mekanizmaları etkilerini; hasarlı hedef moleküllerin yerini alarak, ROT oluşumunu minimumda tutarak, hasarlı hedef molekülleri onararak, metal iyonlarını bağlayarak gösterebilirler(65). İnsan vücudunda pek çok antioksidan sistem kullanılır; bu sistemler hem intrasellüler hem de ekstrasellüler kompartmanda mevcuttur. İntrasellüler olarak hücrede süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz da dahil olmak üzere çeşitli enzimleri içermektedir. Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplandırılabilirler. Yerleşimlerine göre (intrasellüler, ekstrasellüler), yapılarına göre (enzim olanlar, olmayanlar), kaynaklarına göre (endojen, ekzojen), çözünürlüklerine göre (suda çözünen, yağda çözünen) gruplandırılabilirler.

2.4.1. Enzim olan Antioksidanlar

2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz enzimi (SOD) süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüğü reaksiyonu katalizleyen enzimdir. SOD enziminin bakır-çinko, mangan ve demir içeren üç tip izoenzimi bulunur. Bakır ve çinko içeren Cu-Zn-SOD sitoplazmada, mangan içeren Mn-SOD mitokondride aktivite gösterir(66). Cu-Zn-SOD ve Mn-SOD aynı mekanizma üzerinden etki gösterirler ancak Mn-SOD pH 7 nin üzerinde aktivitesini kaybederken Cu-Zn-SOD un aktivitesi pH 5-10 aralığında değişmez.

SOD enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon spontan olana göre 4000 kat hızlı olur. Dolayısıyla SOD enzimi antioksidan savunmada son derece önemli bir

enzimdir. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır ancak ekstrasellüler sıvılarda aktivitesi oldukça düşüktür.

2.4.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz enzimi hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizler. Enzim hücre içinde peroksizomlarda yerleşmiştir. Bir hemoproteindir(66). 2 hidrojen peroksit molekülünü kullanarak diğerini oksitler. Reaksiyon hidrojen peroksit konsantrasyonları yükseldiğinde önem kazanırken, düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarında diğer peroksidazlar daha az reaktif olan alkol yada suya parçalanmayı katalizlerler(66). Kanda, karaciğer ve böbrekte bulunur.

Hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonda olduğu durumlarda katalazın Km'i yüksek olduğundan ilgisi düşüktür ve aktivite düşük olur, diğer peroksidazlar (glutasyon peroksidaz) daha aktif olabilir(66). Bununla birlikte Km'in yüksek olması katalazın substratı olan hidrojen peroksit miktarı arttıkça lineer olarak katalazın da artmasına olanak sağlar ve bu da oksidatif strese karşı korunmada mükemmel bir olanak sağlar(66).

2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Bir hidroperoksidazdır. Substratı hidrojen peroksit veya organik peroksitlerdir. Sitoplazmada yer alan bir tetramerdir. Aktif bölgesinde 4 adet selenyum bulunur. Eritrositlerde ve diğer dokularda redükte glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin parçalanmasında rol alır. Lipid peroksidasyonunu engelleyerek membran lipidlerini ve hemoglobini peroksitler aracılığıyla oluşabilecek oksidasyona karşı korur(67).

GSH-Px in iki substratı olan peroksitler alkolle indirgenirken diğer substrat olan glutayon (GSH) yükseltgenir. Ortaya çıkan yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) , glutatyon redüktaz enziminin katalizlenen başka bir reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutatyona çevrilir.

2.4.1.4. Glutatyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)

Hidrojen peroksitin indirgenmesi sırasında GSH (glutatyon) oksitlenir. Glutatyon peroksidazın fonksiyonunun devamlılığı için okside glutatyon tekrar indirgenmelidir. Reaksiyon GSH redüktaz tarafından katalizlenir. Enzim NADPH bağımlıdır. Hem sitoplazmada hemde mitokondride bulunur(62).

2.4.1.5. Glutatyon S-Transferaz (GST)

Glutatyon (y glutamil sisteinil glisin) glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Glutatyon (GSH) ile ksenobiyotiklerin reaksiyonunu katalizleyen enzimlere “glutatyon S- transferazlar” kısaca “GST” denir.

Detoksifikasyon metabolik yolunda son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. Glutatyon ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşiklerin bağlanması gerçekleşmektedir(68). GST karaciğer, böbrek, dalak, plasenta gibi birçok dokuda hem sitozolde hem de membranda bulunabilir.

GST çok substratlı bir enzimdir. GST besinlerle alınan toksik maddelerin eliminasyonunu sağladığı gibi, prostoglandinlerin izomerizasyonu, hem, bilirubin, safra tuzu gibi maddeleri de GSH'ya bağlayarak taşınmasını da sağlamaktadır(69). Ayrıca reaktif bileşiklerin vücuda zarar vermesini onlarla kovalent bağ yaparak önlemektedir.

2.4.2. Enzim olmayan antioksidanlar

Glutasyon (GSH), glutamat, sistein, glisin, amino asitlerinden sentezlenen ve hücrede en fazla tiyol içeren bileşiktir. GSH sentezinde kullanılan sisteinin kaynağı N-asetilsisteindir. Glutaminin glutaminaz ile hidrolizi ve alfa-ketoglutarat ile dallı zincirli aminoasitlerin transaminasyonu GSH sentezinde kullanılan glutamatın temel kaynaklarıdır. GSH dan kaynaklanan glutasyon radikali bir prooksidandır ancak 2 tane glutasyon radikali bir araya geldiğinde okside glutasyonu (GSSG) oluştururlar. Ve bu da GSH redüktaz tarafından GSH'ya indirgenir. Böylece doğrudan yada dolaylı olarak reaktif oksijen türlerini temizler. Önemli tiyol bileşikler ile etkileşime girebilir(70).

E vitamini yağda çözünen en güçlü antioksidandır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden türeyen lipid hidroperoksitlerinin oluşumunu önler, peroksinitritten oluşan serbest radikalleri temizler.

C vitamini biyolojik sıvılarda en çok bulunan ve suda çözünen bir antioksidandır. Superoksit, hidroksil radikallerini toplayabilme özelliğine sahiptir ve glutasyon, NAD, NADP gibi hücre içi antioksidanlarca rejenere edilebilmesi sebebiyle önemlidir.

Karotenoidler, bitki kaynaklıdır. Singlet oksijen ve peroksil radikalini temizlerler.

Melatonin en potent radikallerden olan hidroksil radikalini yok edebilen güçlü bir antioksidandır. Lipofiliktir.

2.5. Vitamin D - Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi

Vitamin D nin serbest radikallerle ilişkisinin mekanizması tam olarak net değildir, yapılmış çok çalışma vardır ve birbiriyle çelişen sonuçlar vardır.

Vitamin D yapısal olarak endojen östrojene benzediği için intranükleer östrojen reseptörlerine bağlanıp SOD, CAT ve GSH-Px gen transkripsiyonuna neden olarak antioksidan enzimlerin seviyelerinde artışa neden olmaktadır(71).

Hemodiyaliz hastalarına verilen D vitamini tedavisi sonrası vitamin D nin GSH, SOD, CAT aktivitesini arttırarak antioksidan etki gösterdiğinden bahsedilmiştir(72).

Vasküler düz kas hücrelerine 1,25 (OH) Vitamin D nin etkileri incelendiğinde SOD aktivitesini arttırdığı görülmüştür(73).

Diabetik ratlarda yapılan bir çalışmada, vitamin D nin insülin salgılanmasını arttırdığı bunun yanısıra SOD, CAT, GSH-Px aktivitesini özellikle karaciğer ve böbrekte arttırdığı ve oksidatif strese karşı koruyucu olabileceği vurgulanmıştır(74).

Hamden K.'nın diabetik ratların testislerinde yaptığı çalışmada ise, diabetin SOD, CAT, GSH-Px düzeylerinin testiste düştüğü ancak verilen D vitaminin diabetin antioksidan enzimler üzerine yaptığı inhibisyonu kaldırdığını göstermişlerdir(75).

Ratlarda vitamin D ve vitamin E nin etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, vitamin D uygulanan ratlarda vitamin E ye benzer şekilde lipid peroksidasyonunun azaldığı ve SOD, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz aktivitesinin arttığı izlenirken, glutatyon redüktaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir(76).

Ilka ve ark. yaptığı bir çalışmada ise 1,25 (OH) Vitamin D metaboliti olan 24,25 (OH) Vitamin D nin intestinal hücrelerde katalaz enzimine bağlandığı ve inaktive ettiği, ortamdaki hidrojen peroksit miktarını arttırdığını tespit etmişlerdir(77).

Meme kanserli hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, vitamin D nin hücre içi GSSG/GSH dengelerini değiştirdiğini, GST ve GSH-Px'i değiştirmediğini ve dolayısıyla ortamdaki hidrojen peroksit miktarını arttırarak prooksidan olabileceğini vurgulamışlardır(78).

Gentamisinle akut böbrek yetmezliği yapılan ratlarda verilen D vitaminin GSH miktarını arttırdığı gösterilmiştir(79). Bir başka çalışmadada vitamin D verilen monositlerin glutamat sistein ligaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon miktarlarını arttırdığı gösterilmiştir(80).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM) ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 17/01/2012 tarihinde 6-985 sayı numarası ile onay alınmıştır.

3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Deneylerde ağırlıkları yaklaşık 250-350 gr olan 24 adet 2 aylık dişi Wistar Albino rat kullanıldı. Denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık sürecinde tutuldu. Serbest diyet ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

Deneyler rastgele oluşturulan dört grup üzerinde gerçekleştirildi.

1. Kontrol grubu
2. Sepsis grubu
3. 25(OH)Vitamin D3 grubu
- 4.25(OH)Vitamin D3 +sepsis grubu

Kontrol grubu: Bu gruptaki 6 rat normal laboratuvar diyeti ve içme suyu ile 1 hafta beslendi. 4.günden itibaren 0,75 ml/gün ayçiçek yağı gavaj yoluyla verildi. 7.günde intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi.

Sepsis grubu: Bu gruptaki 6 rata 3 gün normal beslenme sonrası 4. günde 16 mg/kg dozunda LPS E.coli (O111.b4) intraperitoneal yolla verildi.

25(OH)Vitamin D3 grubu: Bu gruptaki 6 rata 3 gün boyunca 2 mg/kg 25(OH)Vitamin D3 (ayçiçek yağında çözülerek) gavaj yolula verildi.

25(OH)Vitamin D3 +sepsis grubu: Bu gruptaki 6 rata sepsis oluşturmadan 3 gün önce, her gün 2 mg/kg 25(OH)Vitamin D3 (ayıek yağında çözülerek) gavaj yoluyla verildi ve 3.günün sonunda 16 mg/kg dozunda LPS E.coli (O111.b4) intraperitoneal yolla uygulandı.

Çalışma sresinin sonunda hayvanların anestezi altında kanları alındıktan sonra sakrifiye edildi. Böbrek dokuları çıkarıldı ve soğuk (+4°C) serum fizyolojik ile dokuların temizliği yapıldı. Bir miktar doku, içerisinde formol bulunan temiz şişelere konularak histopatolojik inceleme için ayrıldı. Kalan böbrek dokuları sıvı azot içinde dondurularak analiz gününe kadar –80°C de saklandı.

Ratlardan alınan kanlar 3700 rpm’de 7 dakika santrifüj edildi. Serum kısımları ayrılıp porsiyonlanarak -20°C’de saklandı.

Enzim analizlerinden önce her bir gruba ait böbrek dokuları tartılarak 5 katı serum fizyolojik içerisinde Heidolph DIAX 900 marka homojenizatör ile 1-1,5 dakika 4000 devir/dk. homojenize edildi. Homojenat soğutmalı santrifüjde 4500g’de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları ayrıldı.

3.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (Heidolph DIAX 900)

Vortex (Heidolph Reax 2000)

Santrifüj (Hermle Z 380 K)

Soğutmalı Santrifüj (Damon IEC, B-20A soğutmalı, Hermle Z 323 K)

Spektrofotometre (Schimadzu, UV 1601)

pH metre (Jenway)

Manyetik Karıştırıcı, Otomatik ve cam pipetler

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

3.3.1 Total Protein Tayini

Süpernatanlarındaki total protein miktarı Lowry metoduna göre yapıldı(81).

Metodun Prensibi: Alkali ortamda proteinlerin Cu^{2+} ile Cu^{++} - protein kompleksi oluşturarak fosfomolibdat- fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu Phenol reaktifini) indirgeyerek mavi-mor renkli ürün oluşturması esasına dayanır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaktifler:

1) A reaktifi: 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1.0 gr $\text{Na}_3\text{-Sitrata}$ bir miktar distile suda çözüldükten sonra 100ml'ye tamamlandı.

2) B reaktifi: 20gr Na_2CO_3 ve 4.0 gr NaOH bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlandı.

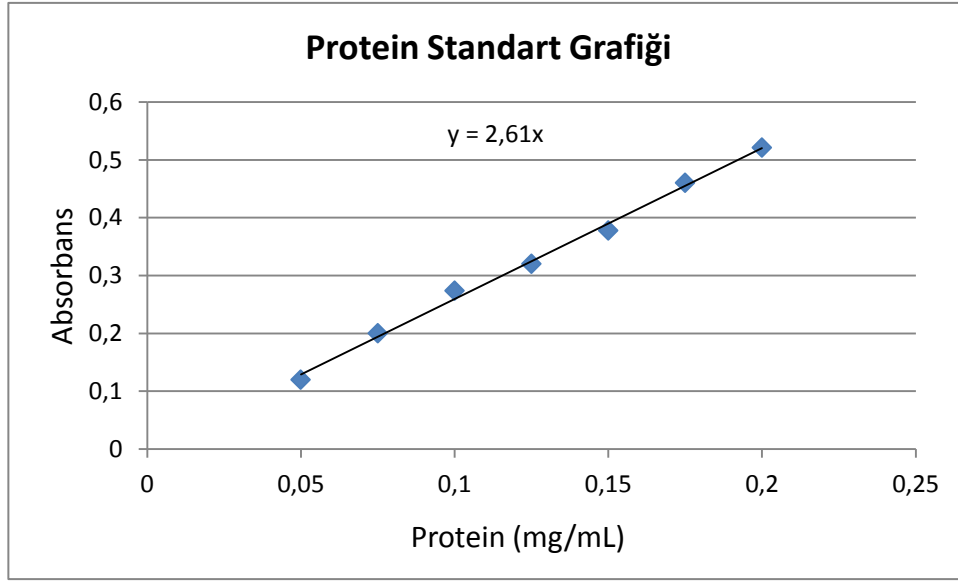
3) C reaktifi: 50 ml B çözeltisi + 1.0 ml A çözeltisi karışımı hazırlandı.

4) D reaktifi (Folin-Ciocalteu Çözeltisi): 10 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi 10 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Kör ve numune tüplerine 2.5 ml C reaktifi ve numune tüpüne 10µl süpernatan eklendikten sonra iyice karıştırılarak laboratuvar sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Kör ve numune tüplerine 250 µl D reaktifi eklendikten sonra laboratuvar sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve 700nm'de numunelerin

absorbansları köre karşı okundu. Sonuçlar standart eğim grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Standart olarak 0-0,5 mg/ml konsantrasyonlarında BSA hazırlanarak absorbans konsantrasyon(mg/ml) grafisi çizildi.



Grafik 1. Protein Standard Grafiği

3.3.2 Superoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Böbrek doku örneklerinde SOD aktivitesi Durak I. ve arkadaşları tarafından modifiye edilen metoda göre çalışıldı(82).

Metodun prensibi: Ksantin-Ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen süperoksit radikalleri için SOD/NBT yarışması esasına dayanmaktadır.

Kullanılan reaktifler:

- Ksantin (0,30mM)
- NBT (150 μ M)
- Na₂CO₃ (400mM)

- BSA (1g/L)
- XO (167U/L)
- CuCl₂ (8mM)

Deneyin yapılışı:

Numune tüplerine ölçüm reaktifi, numune ve ksantin oksidaz enzimi; kör tüplerine ise ölçüm reaktifi ve ksantin oksidaz enzimi konuldu. Tüpler 25⁰C’de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numune tüplerine sadece CuCl₂, kör tüplerine ise CuCl₂ ile reaksiyon durdurulduktan sonra numune eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra her bir tüpün absorbansı 560 nm’de distile suya karşı okundu. Sonuçlar U/mg protein olarak verildi. Metoda göre 1U SOD aktivitesi, NBT indirgenmesini %50 inhibe eden enzim aktivitesi olarak tarif edilmektedir.

3.3.3 Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

GSH-PX aktivitesi Paglia DE ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı(83).

Metodunun prensibi: 340 nm’de NADPH’nin absorbans değişimine dayanmaktadır. Enzim aktivitesi ise NADPH’nin ϵ değerinden ($6,22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) yararlanılarak hesaplandı.

Kullanılan Reaktifler:

- GSH (150mM)
- NADPH (3mM)
- H₂O₂ (100mM)
- NaN₃ (2M)

- Fosfat tampon (pH:7,0; 50mM) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$)
- GSH-red: Sıvı enzimden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile seyreltilerek hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

Numune tüplerine EDTA'lı Fosfat tamponu, NaN_3 , GSH, NADPH, GSH-Red ve numune konuldu. Kör tüpüne ise H_2O_2 hariç diğer reaktifler kondu. 340 nm'de suya karşı sıfır ayarı yapıldıktan sonra körün absorbansı okundu. H_2O_2 ilave edilir edilmez numunedeki absorbans azalması 0-5 dakika boyunca takip edildi. Lineer bölgenin dakikadaki absorbans değişiminden $\Delta A/\text{dak}$ değeri hesaplandı. Sonuçlar IU/mg protein olarak verildi.

3.3.4. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Böbrek doku örneklerinde Katalaz aktivitesinin tayini Aebi H'nın metoduna göre yapıldı(84).

Metodun prensibi:

240 nm'de katalaz tarafından yıkılan hidrojen peroksitin absorbans değişiminin izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan reaktifler:

- Fosfat tamponu(50mM,pH=7)
- Tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi

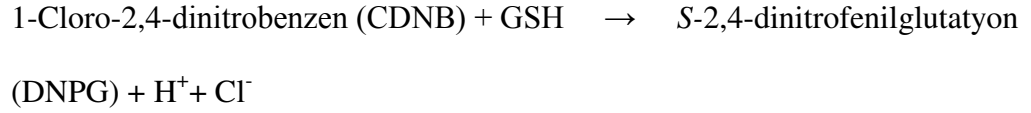
Deneyin yapılışı:

Tampon çözelti ile sıfır ayarı yapılmış spektrofotometreye içerisinde tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi (absorbans aralığı yaklaşık 0.5) bulunan küvet konuldu, absorbans değişimi 1 dakika boyunca takip edildi. Daha sonra numune

ilave edildi, küvet 2-3 kez altüst edilip karıştırılarak numunenin absorbansı değişimi 5 dakika boyunca takip edildi. Lineer olan bölgeden $\Delta A/\text{dak}$ değeri bulunarak aktivite hesaplandı. Sonuçlar IU/mg protein olarak verildi.

3.3.5. Glutasyon-S-Transferaz Tayini

Glutasyon S-transferaz aktivitesi tayini Habig W.H. ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı(85).



Bu reaksiyon sırasında oluşan DNPG bileşiğinin 340 nm'de absorbans artışı takip edilmektedir.

Kullanılan Reaktifler:

- 100 mM. pH:6 fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$)
- CDNB (1-Kloro 2,4-Dinitrobenzen): 25 mM, saf etanolde çözüldü.
- GSH:50 mM (tamponda çözülür)

Deneyin Yapılışı:

Numune ve kör tüplerine fosfat tamponu, CDNB, numune eklenip iyice karıştırıldı. 340 nm de köre karşı sıfır ayarı yapıldıktan sonra numunedeki absorbans değişimi 1 dakika takip edildi. Daha sonra küvete redükte glutasyon (GSH) eklendi ve absorbans değişimi 3 dakika boyunca takip edildi. Lineer bölgeden $\Delta A/\text{dak}$ değeri bulunarak aktivite hesaplandı. GST aktivitesi DNPG'un ϵ katsayısından yararlanılarak hesaplandı (ϵ : $10 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Sonuçlar spesifik aktivite (IU/mg protein) olarak verildi.

3.3.6. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Rat serumlarında BUN(Kan üre nitrojeni), kreatinin düzeyleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Acil Laboratuvarı'nda Roche Cobas Integra 800 cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.4. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi

Böbrek dokuları %10'luk formalinde tespit edildikten sonra ince dilimler halinde kesilip parafin bloklara gömüldü. Her bir parafin bloktan seri kesitler yapıp hematoksilin ve eozin ile boyandı. Histopatolojik değişiklikler mikroskop altında incelendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS for Windows 15.0 paket programında yapıldı. Değerlendirmelerde gruplar arası karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi, grupların ikili karşılaştırmaları için de Mann-Whitney U testi uygulandı.

İstatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

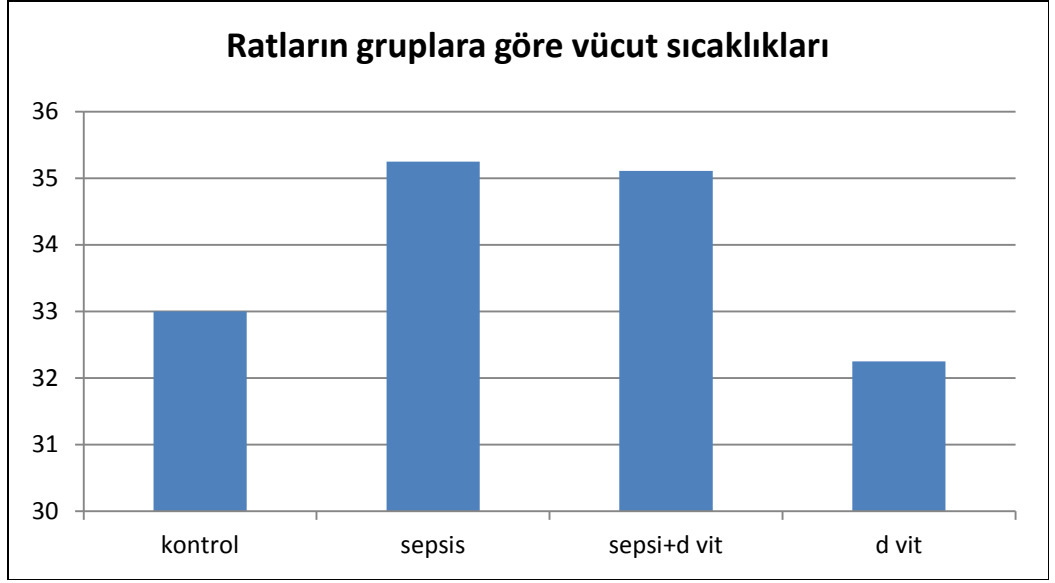
4.BULGULAR

4.1. Ratların Rektal Yolla Ölçülen Vücut Sıcaklıkları

Ratların vücut sıcaklıkları rektal yolla ölçülmüştür. Ölçüm bütün ratlarda anestezi uygulandıktan hemen sonra yapılmıştır.

Tablo 5. Ratların rektal yolla ölçülen vücut sıcaklıkları

GRUP	Vücut Sıcaklıkları $\pm$ Standart sapma
Kontrol	$33,0 \pm 0,6$ °C
Sepsis	$35,2 \pm 0,2$ °C
Sepsis+D vitamini	$35,1 \pm 0,4$ °C
D vitamini	$32,2 \pm 0,2$ °C
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	
1-2	$P<0,05$
1-3	$P<0,05$
1-4	$p>0,05$
2-3	$p>0,05$
2-4	$P<0,05$
3-4	$P<0,05$



Grafik 2. Ratların tüm gruplarda rektal yolla ölçülen ortalama vücut sıcaklıkları

4.2. Böbrek Fonksiyonunu Gösteren Testler

Deney sonrası rat serumları böbrek fonksiyon testleri parametrelerine ait ortalama $\pm$ standart sapma değerleri Tablo 6’de görülmektedir.

Tablo 6. Serum Böbrek Fonksiyon Testleri Sonuçları

Grup	BUN(mg/dl)	Kreatinin(mg/dl)
1.Kontrol	59,2±7,4	0,42±0,08
2.Sepsis	85,06±18,1	0,46±0,05
3.Sepsis+ d vitamini	191,1±75,9	1,3±0,7
4.D vitamini	56,2±15,1	0,43±0,08
İSTATİSTİKSEL ANALİZ		
1-2	P<0,05	P>0,05
1-3	P<0,05	P<0,05
1-4	P>0,05	P>0,05
2-3	P>0,05	P<0,05
2-4	P<0,05	P>0,05
3-4	P<0,05	P<0,05

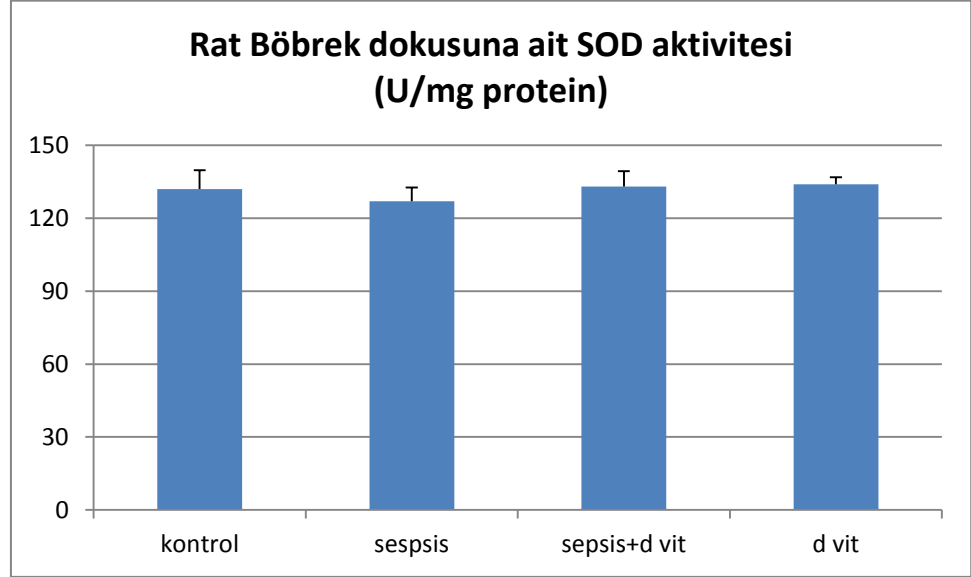
4.3. Rat Böbrek Dokularında Enzim Aktiviteleri

Deney sonrası rat böbrek dokularında enzim aktivitelerine ait ortalama±standart sapma değerleri Tablo 7’de görülmektedir. Enzim aktiviteleri grafiklerde ortalama ± standart hata şeklinde görülmektedir (Grafik 3-6).

Tablo 7. Böbrek Dokusunda Antioksidan Enzim Aktivite Sonuçları

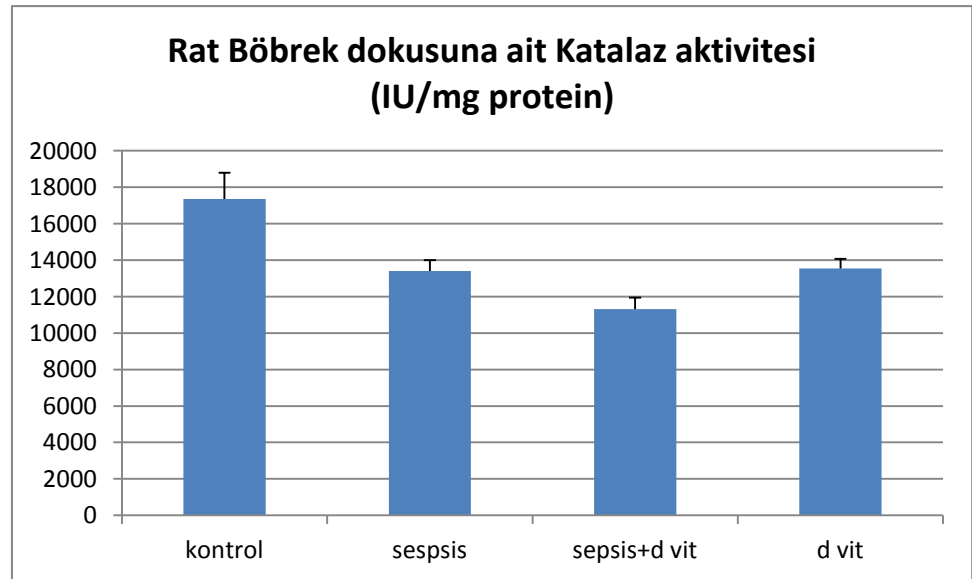
Grup	SOD (U/mg protein)	KATALAZ (IU/mg protein)	GST (IU/mg protein)	GPX (IU/mg protein)
1.Kontrol	132±19,1	17350±3520	11,6±1,3	9,3±2,7
2.Sepsis	127±13,8	13407±1449	9,7±1	7,8±0,47
3.Sepsis+ d vitamini	133±15,5	11313±1541	8,7±0,8	9,1±1,5
4.D vitamini	134±7	13539±1282	12±1,2	9,6±1,5
İSTATİSTİKSEL ANALİZ				
1-2	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05
1-3	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05
1-4	P>0,05	P<0,05	P>0,05	P>0,05
2-3	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
2-4	P>0,05	P>0,05	P<0,05	P>0,05
3-4	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05

4.3.1. Rat Böbrek Dokularının SOD Aktiviteleri



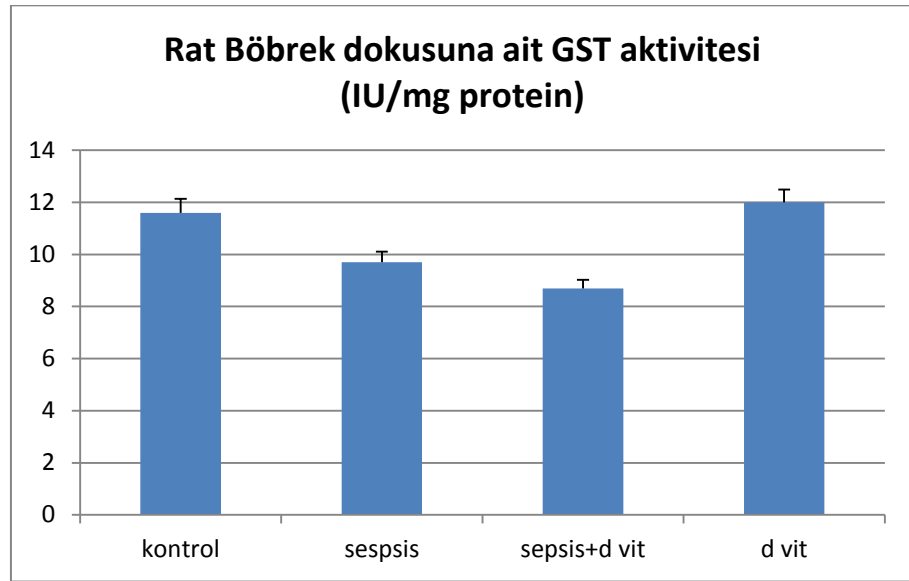
Grafik 3. Tüm gruplarda rat böbrek dokularına ait SOD aktiviteleri

4.3.2. Rat Böbrek Dokularının CAT Aktiviteleri



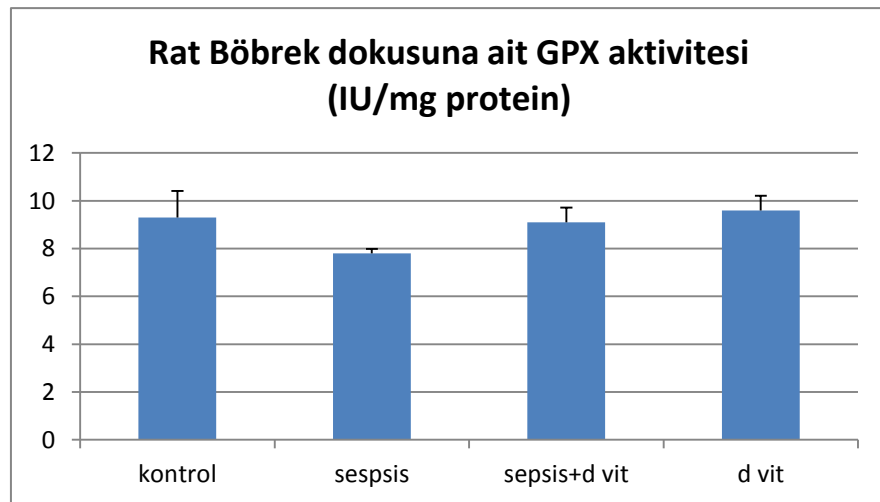
Grafik 4. Tüm gruplarda rat böbrek dokularına ait CAT aktiviteleri

4.3.3. Rat Böbrek Dokularının GST Aktiviteleri



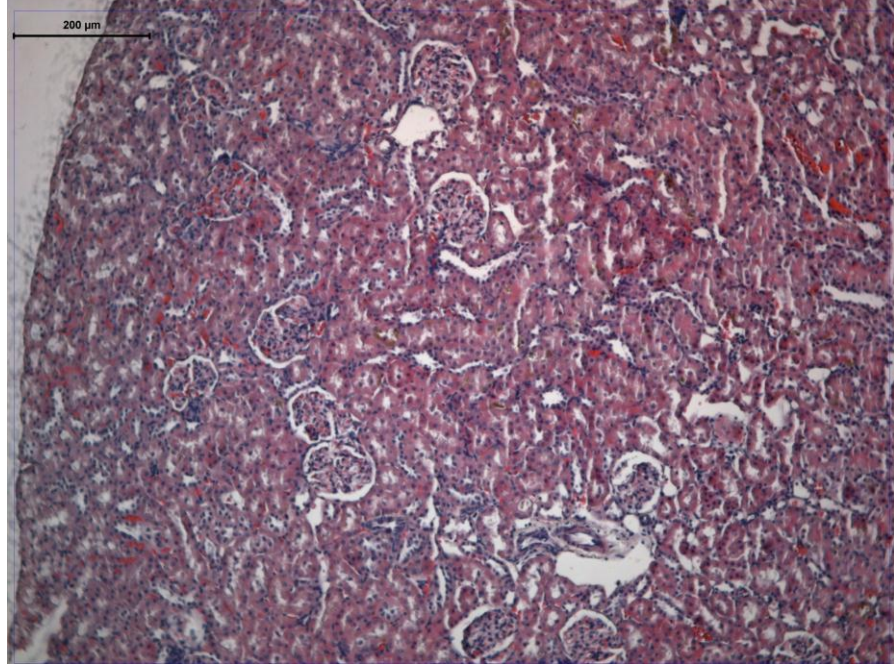
Grafik 5. Tüm gruplarda rat böbrek dokularına ait GST aktiviteleri

4.3.4. Rat Böbrek Dokularının GSH-PX Aktiviteleri

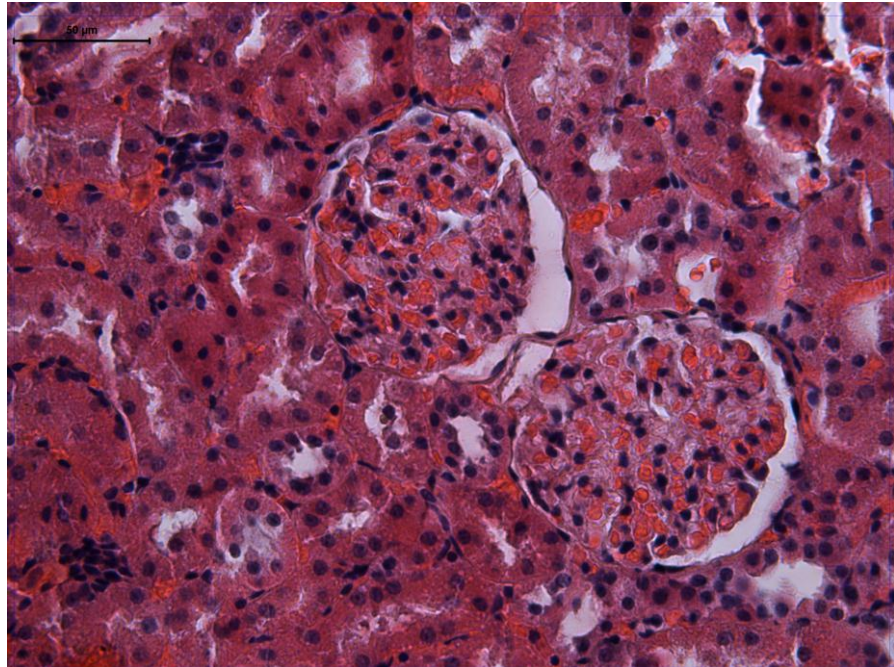


Grafik 6. Tüm gruplarda rat böbrek dokularına ait GSH-PX aktiviteleri

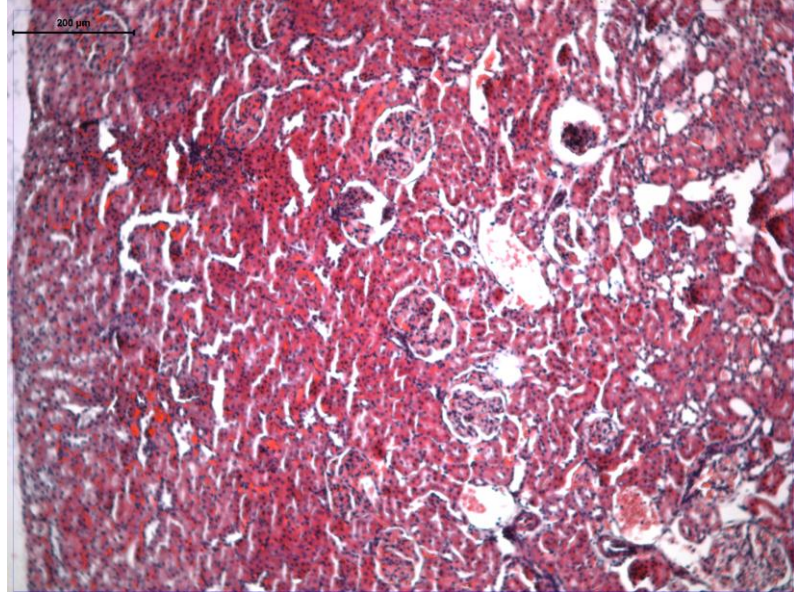
4.4. Histopatolojik Bulgular



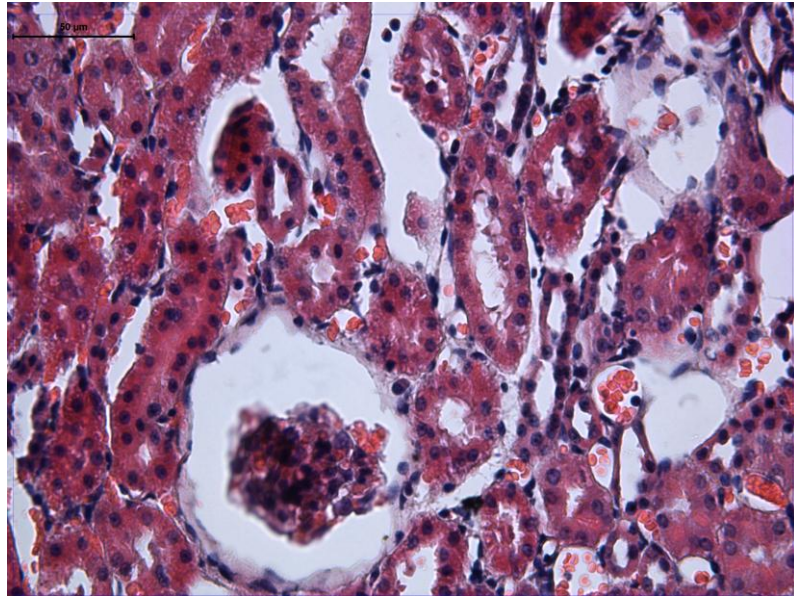
Resim 1. Kontrol grubu: Normal histolojik görünümde böbrek dokusu



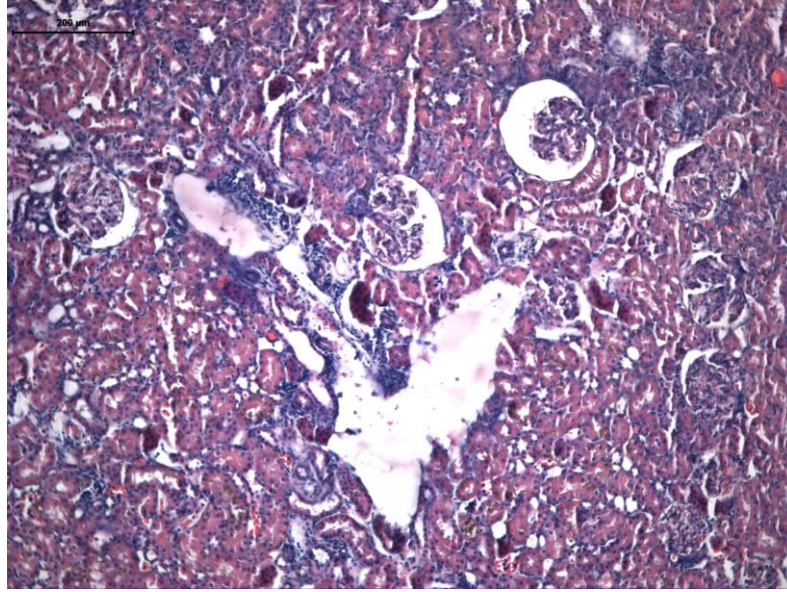
Resim 2.Vitamin D grubu: Kontrol grubu ile eşdeğer normal böbrek dokusu



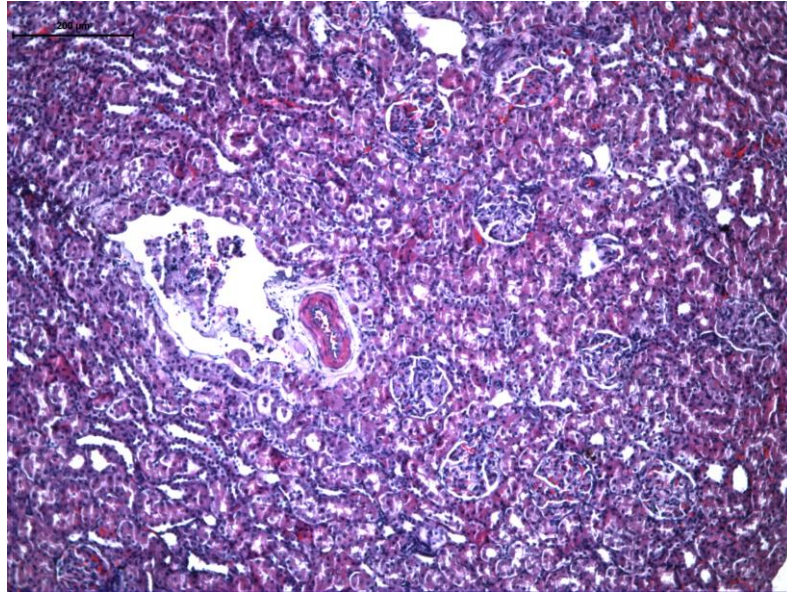
Resim 3. Sepsis grubu: Küçük büyültmede glomerül ve tübül dejenerasyonları



Resim 4. Sepsis grubu: Bowman kapsülünde dilatasyon, glomerüllerde büzülme ve hücre kaybı.



Resim 5. Sepsis grubu. Yaygın inflamasyon ve hücresel debrisler.



Resim 6. Sepsis+ Vitamin D grubu. Yaygın inflamasyon yok. Az sayıda bowman kapsülünde genişleme

Çalışmamızda SOD ve GSH-Px aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ve gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında aralarında anlamlı fark olmadığı görüldü (Tablo 7).

Çalışmada dikkat çeken bulgu CAT aktivitelerinin sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında baskılanmış olmasıdır($p<0,05$). Bu baskılanmanın özellikle sepsis+vitamin D grubunda en yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$) (Tablo 7).

Yine sepsis+vitamin D grubunda GST aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı baskılandığı bulunmuştur($p<0,05$). GST aktivitesinde özellikle sepsis ve sepsis+ d vitamini grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında anlamlı farkın olduğu görülmüştür. En çok baskılanma sepsis+ d vitamini grubundadır (Tablo 7).

Çalışmamızda böbrek fonksiyon testlerinden kreatininin özellikle sepsis+vitamin D gruplarında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). BUN düzeyinin, sepsis ve sepsis+vitamin D grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğunu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ve en çok yükseklik sepsis+ d vitamini grubundadır(Tablo 6).

Çalışmamızın histopatolojik sonuçları değerlendirildiğinde kontrol ve vitamin D gruplarında; tüm deneklerde böbrek parankimi normal histolojik görünüm sergilemekteydi (Resim 1-2).

Sepsis grubunda; küçük büyütmelerde glomerül ve tübül dejenerasyonları belirgindi (Resim 3,4,5). Yine sepsis grubunda subkapsüler ve juxtamedüller glomerüllerde yaygın olarak Bowman kapsülünde dilatasyon glomerülde büzülme hücresel debrisler, parankimde yaygın infalamasyon dikkati çekmekteydi.

Sepsis+vitamin D grubunda; Bulgular kontrol ve yalın vitamin D grubuna benzer özellikler göstermekteydi(Resim 6). Ancak sepsis grubuna göre çok daha az olmak üzere sayıda malphigi cisimciğinde Bowman kapsülünde dilatasyon gözlenmekteydi ve bu grupta yaygın inflamasyon yoktu.

5. TARTIŞMA

Sepsis yıllardır tedavisi zor ve mortalitesi yüksek hastalıklardan biridir. Acil ve erken tanı ve tedavinin çok önemli olduğu sepsiste hala mortalite oranları %30-40 civarlarındadır. Klinik tablo SIRS'la başlayarak sepsis, ağır sepsis, septik şok ve çoklu organ yetmezliğine varan sürekli ve şiddetli bir süreçtir.

Standart sepsis tedavisi, antibiyotik kullanımı, diyaliz, mekanik ventilasyon, vazoaaktif ilaçlar ve inotropik ajanların kullanımı gibi çok yönlü bir yaklaşımı içerir. Ancak bu tedaviler günümüzde mortaliteyi azaltmada sınırlı ve yetersiz kalmaktadır. Bu amaçla farklı tedavi spektrumları geliştirilmeye çalışılmakta özellikle antioksidan ve antiinflamatuvar tedaviler denenmektedir.

Özellikle sepsisli hastalarda vitamin d eksikliği varsa mortalitede artış gösterilmiştir(86) hatta yaz aylarında sepsis mortalitesinin kış aylarına oranla %13 azaldığı gözlenmiştir(87, 88). Bu çalışmalar d vitaminin sepsisteki önemine dikkat çekmiştir(32).

Bizim çalışmamızda ratlara, intraperitoneal bolus E.coli lipopolisakkariti enjeksiyonuyla sepsis oluşturuldu. Ratlarda sepsis oluşumu vücut sıcaklık artışı , takipne ve taşikardi ile gözlendi.

Sepsiste gelişen akut böbrek yetersizliği meydana gelen renal hasara göre mortaliteyi %20'den %50'lere çıkarabilmektedir ve bu sebeple çalışmamızda ratların böbrek dokusu incelenmeye alınmıştır(89).

Wang ve arkadaşları farelerde CLP ile oluşturdıkları sepsis modelinde, böbreklerde peritübüler kapiller mikroçevrede oluşan oksidatif stresin hasara yol açarak dolaşımı bozduğu ve akut böbrek hasarına yol açtığını göstermişlerdir.(90)

Sepsiste gelişen reaktif oksijen radikalleri hücresel hasardan asıl sorumlu mekanizmadır. Serbest radikaller sitokin üretimini de etkileyerek sağkalıma etkiye bulunurlar. Sepsis sürecindeki immünolojik mekanizma karışık olduğundan antimikrobik tedavinin yanısıra antioksidan ajanların kullanımıyla ilgili çalışmalar sürmektedir.

Sepsisle ilgili 1995 yılında Warner ve arkadaşları antioksidan enzim olan SOD ve CAT düzeylerinde artış bulmuşlar ve bu artışı meydana gelen doku hasarından sorumlu tutmuşlardır(91).

Sebai ve ark. LPS ile endotoksemi yaptıkları ratlarda böbrek üzerine resveratrolun etkisinin araştırdıkları çalışmada, endotoksemi gelişen ratlarda SOD, CAT, GPX enziminde düşüklük saptamışlardır(92).

Neeraj ve ark. LPS ile sepsis yaptığı WT farelerde SOD, CAT, GPX aktivitesinin üçünde de düşüş tespit etmişlerdir.(93)

Ancak yapılan bazı çalışmalarda SOD ve CAT enzimleri arasında bir imbalans olduğu ve bu imbalansın yol açtığı hidrojen peroksit birikiminin sepsisin fizyopatolojisinden sorumlu olduğu iddia edilmiştir(19).

Cristiane ve ark. ratlara çekal ligasyonu ile yaptıkları sepsiste ilk olarak SOD/CAT imbalansından bahsetmişler, SOD ne kadar yüksekse prognozun o kadar kötü olduğunu ve bu anlamda sepsiste antioksidan tedavinin önemli olabileceğini vurgulamışlardır(94).

Andrades ve ark. sepsis yaptıkları ratlarda SOD/CAT artışını tespit etmişler ve bu oran ne kadar yüksekse sepsisin o kadar letal olduğunu göstermişlerdir(95). Yine Andrades'in benzer bir çalışmasında CLP ile sepsis yapılan ratların akciğer ve böbrek dokusunda SOD/CAT imbalansı tespit etmişler, antioksidan tedaviyle SOD ve CAT'ın bazal seviyeye tekrar geldiğini bulmuşlar. Aynı zamanda GPX aktivitesinde sepsise rağmen herhangi bir değişiklik olmadığını gözlemlemişler(17).

Bizim çalışmamızda sepsis yapılan ratların ve kontrol grubunun böbrek dokuları karşılaştırıldığında SOD ve GPX arasında fark yokken, katalaz enzimin sepsis grubunda belirgin baskılandığını gördük($p<0,05$). SOD ve GPX enziminde anlamlı fark olmasa da ortalamalara bakıldığında SOD ve GPX enzimlerinin kontrol grubuna göre sepsiste düşmüş olduğunu gördük. SOD/CAT imbalansının bizim septik ratlarımızda oluştuğunu düşünmekteyiz. Katalaz enzimidaki düşüklüğün ise ortamdaki aşırı süperoksit anyonu ve hidrojen peroksitin katalaz enzimini inaktive etmesiyle olduğunu düşünmekteyiz. Böbrek fonksiyon testleri (BUN, kreatinin) ise bu imbalansı destekleyecek şekilde sepsis grubunda kontrol grubuna göre anlamlı daha yüksek tespit edilmiştir.

Sepsiste düşen antioksidan enzim aktiviteleri ve gelişen imbalans nedeniyle antioksidan tedaviyle ilgili yapılan çok çalışma vardır.

Andrades ve ark. sepsis yapılan ratlarda antioksidan tedavinin(N asetil sistein ve deferoksamin) akciğer ve böbrek dokusundaki etkilerini incelemişler ve antioksidan tedavinin özellikle akciğerde etkili olduğunu bulmuşlar(17).

Çadırcı ve ark. sepsis yapılmış ratların böbrek ve akciğer dokusunda sildenafilin antioksidan etkisini incelemişlerdir(96).

Senoglu ve ark. çekal ligasyonla sepsis yapılmış ratlarda N-asetil sistein ve beta glukanın karaciğer dokusu üzerine olan antioksidan etkisini araştırmışlar ve profilaktik kullanımı önermişlerdir(97).

Rojas ve ark. endotoksemi yaptıkları kobayların kalp dokusunda vitamin c ve vitamin e nin antioksidan enzimler üzerine olan etkilerini incelemişlerdir(98).

Biz çalışmamızda vitamin d'nin sepsis sayesinde böbrekte oluşan oksidatif stresi, antioksidan sistemi kullanarak ne şekilde etkilediğini araştırdık.

Bu çalışmayla vitamin d nin daha önce birçok hastalıkta gösterilen antioksidan etkisinin sepsisle ilişkisi gösterilmiştir. Yapılan literatür taramasında vitamin d nin sepsiste antioksidan etkileriyle ilgili yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Noyan ve ark. diabetik ratlara 30 gün boyunca 1/mg/kg/gün 25(OH)Vitamin D3 vererek SOD, CAT, GPX gibi antioksidan enzimlere etkilerini incelemişler ancak diabet ve diabetle birlikte d vitamini verdikleri grupta enzimler açısından anlamlı bir farklılık bulamamışlardır(4).

Khaled ve ark. ise alloxanla diabet yaptıkları ratlara aktif d vitamini uygulayarak antioksidan enzimlerde artış tespit ettiklerini ve diabet tedavisinde gündeme gelmesi gerektiğini bildirmişlerdir(74).

Wang ve ark. isoproterenol ile kalp dokusunda yaptıkları hasar sonrası kalsitriol uygulamasının SOD ve CAT enzimlerde düşmeye neden olduğunu gözlemlemişlerdir(99).

Wiseman ve ark. vitamin d'nin hücre membranının stabilitesini arttırarak antioksidan etkisini gösterdiğine deyinmişlerdir(100).

Koren ve ark. meme kanserli MCF-7 kültür hücrelerinde yaptıkları çalışmada, vitamin D nin hücre içi GSSG/GSH oranını arttırdığını, GST ve GSH-Px i değıştirmedığını ve dolayısıyla ortamdaki hidrojen peroksit miktarını arttırarak prooksidan olabileceğini vurgulamışlardır(78). Özellikle vitamin D'nin hücre içindeki GSSG ve GSH seviyelerini değıştirmesine rağmen glutatyon bağımlı enzim aktivitelerini etkilememesi SOD baskılanması ve artmış H₂O₂ seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra ortamda artmış süperoksit anyonlarının özellikle NO ile reaksiyona girerek yüksek toksik peroksinitrit molekülüne dönmesi veya ortamda artmış bulunan H₂O₂ konsantrasyonunun fenton tipi reaksiyonlarla oksidatif hasara katkı sağladığı ileri sürülmüştür(101).

Özellikle ortamda bulunan GSSG/GSH oranının artması hücre içi redoks potansiyelini değıştirebilir. Özellikle vitamin D'nin hücre içi redoks potansiyelini değıştirmesi bu molekülün biyolojik etkileri açısından önemlidir(102). Koren ve ark. MCF-7 kültür hücrelerinde yaptıkları bu çalışma D vitaminin GSSG / GSH oranları ve hücre içi redoks potansiyelerini değıştirmesi ve pro-oksidan rolünün olduğunun açıklanması bizim radikal enzimleri , böbrek fonksiyon testleri ve histopatoloji sonuçlarımızı desteklemektedir. Çalışmamızda özellikle sepsis+vitamin D grubunda devam eden histopatolojik sonuçlar ve böbrek fonksiyon testlerinin yüksekliği vitamin D'nin sepsisteki koruyucu etkisinin sınırlı olduğu düşüncesini akla getirmektedir.

Çalışmamızda antioksidan enzimler bakımından anlamlı olan bulgu CAT aktivitesinin sepsis grubunda ve özellikle sepsis+vitamin D grubunda baskılanması ve sepsis+ vitamin D grubunda CAT baskılanmasına eşlik eden GST enzim aktivitesinde ortaya çıkan baskılanmadır.

İlka ve ark. yaptığı bir çalışmada ise 1,25 (OH) Vitamin D metaboliti olan 24,25 (OH) Vitamin D nin intestinal hücrelerde katalaz enzimine bağlandığı, ve inaktive ettiği, ortamdaki hidrojen peroksit miktarını arttırdığını tespit etmişlerdir(77).

Bu bulguların özellikle bahsi geçen gruplarda artmış böbrek fonksiyon testleriyle desteklenmesi çalışmamız açısından anlamlı bir sonuçtur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz radikal metabolizması enzimleri sonuçları , böbrek fonksiyon testleri enzimleri sonuçları ve histopatoloji sonuçları birbiriyle uyumluluk göstermektedir. Çalışmamız açısından histopatolojik sonuçlar ve böbrek fonksiyon testlerine eşlik eden esas bulgu sepsis ve sepsis+D vitamini ve yalın D vitamini gruplarında CAT aktivitelerinde kontrole göre anlamlı bir baskılanmanın ortaya çıkmasıdır. Özellikle CAT aktivitelerinin sepsis+vitamin D gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak en ciddi anlamda baskılanmış olması literatüre yeni bir bilgi olarak girecektir.

Çalışmamızda sepsis+vitamin D grubunda CAT enzim aktivite baskılanmasına eşlik eden GST aktivitesinin baskılanması da vitamin D'nin Koren ve ark. çalışmalarında bahsettiği gibi redoks potansiyelini değiştirdiği düşüncesini akla getirmektedir.

Çalışmamızdaki en önemli bulgu CAT enzim aktivitesinin sepsis, sepsis+vitamin D ve sadece D vitamini gruplarında ciddi anlamda baskılanmış olmasıdır. Bu bulgu özellikle H_2O_2 metabolizması açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda özellikle SOD aktivitesinde herhangi bir değişim olmaması ortamda artmış hidrojen peroksitten ziyade, artmış oksijen bazlı radikallerin H_2O_2 'yi kullanan enzimlerden özellikle katalazın baskılanmasına yol açtığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar, vitamin D'nin özellikle CAT enzimi üzerinden pro-oksidan etkiye yol açtığı veya koruyucu etkisi olamadığı fikrini akla getirmektedir. Sepsis+vitamin D grubunda ortaya çıkan hücresel hasar vitamin D'nin proksidan etkisi özellikle CAT'ın veya GST'nin baskılanmasıyla ilişkili olabilir.

Çalışmamızda özellikle sepsis ve sepsis+vitamin D grubunda ortaya çıkan ve histopatolojiyle desteklenen sonuçlara bakıldığında vitamin D'nin sepsis olgularında koruyuculuğunun yeterli olmadığı görüşlerini desteklemektedir. Özellikle kontrol grubuna göre diğer gruplarda CAT aktivitesinin baskılanmış olması hücre içinde H_2O_2 detoksifiye edilmesini engellemiş olabilir. Artmış H_2O_2 ise Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikale dönüşmüş olabilir(101). Sepsis+vitamin D grubunda histopatolojik olarak halen bowman kapsülünde genişleme ve bazı inflamasyon alanlarının da gözlenmesi bu grupta toksik etkinin devam ettiğini göstermektedir.

Bu bulgularımız Koren ve ark. çalışmalarında bahsettikleri H_2O_2 artışı ve bu artışa bağlı vitamin D toksisitesini ortaya çıkaran hipotezle uyum halindedir.

Buna karşılık D vitamini grubunda baskılanmış CAT aktivitesine rağmen bu grupta histopatolojik olarak tüm elemanların normal histolojik yapıda olması enzimler içerisinde özellikle GST' nin sepsis ve sepsis+vitamin D grubunda önemine atıf yapmaktadır. Sonuçlarımız histopatoloji ve böbrek fonksiyon testleriyle beraber değerlendirildiğinde sepsiste vitamin D'nin koruyucu etkisinin araştırılması bakımından GST'nin anlam taşıdığı fikrini akla getirmektedir. Bu bulgu vitamin D'nin GSSG/GSH seviyelerini artırmasıyla ilişkilendirilebilir. Ortamdaki redükte / okside glutatyon seviyelerindeki değişim GSH-Px den ziyade GST ile ilgili gibi görünmektedir. Özellikle bu durum glutatyon bağımlı veya -SH bağımlı enzimler bakımından da önemli olabilir. Sepsis, D vitamini açısından bu ilişkinin daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamız glutatyonu substrat olarak kullanan GST ve GSH-Px; H_2O_2 üretimine yol açan SOD; H_2O_2 'yi substrat olarak kullanan CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin birlikte değerlendirildiği ve çalışmanın böbrek fonksiyon testleri ve histopatolojik sonuçlarla desteklendiği ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Bu alanda daha detaylı yapılacak olan çalışmaların konuyu aydınlatmada faydalı olacağını düşünüyoruz.

6. SONUÇ

Çalışmamız; sepsiste D vitamini kullanılmasının renal hücreleri toksik etkiden koruyucu bir etkisinin olmadığını, buna karşılık özellikle sepsis durumunda kullanıldığında H_2O_2 ve GSH metabolizmasını kullanan anti oksidan enzimler üzerine baskılayıcı etkisinin olduğunu göstermektedir. Konunun özellikle glutatyon ve glutatyon kullanan enzimler açısından daha detaylı değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, Clermont G, Lidicker J, Angus DC. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(5):695-701.
2. Muller K, Diamant M, Bendtzen K. Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Immunology letters*. 1991;28(2):115-20.
3. Moller S, Laigaard F, Olgaard K, Hemmingsen C. Effect of 1,25-dihydroxy-vitamin D3 in experimental sepsis. *International journal of medical sciences*. 2007;4(4):190-5.
4. Noyan T, Balaharoglu R, Komuroglu U. The oxidant and antioxidant effects of 25-hydroxyvitamin D3 in liver, kidney and heart tissues of diabetic rats. *Clinical and experimental medicine*. 2005;5(1):31-6.
5. Coelho FR, Martins JO. Diagnostic methods in sepsis: the need of speed. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(4):498-504.
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical care medicine*. 2003;31(4):1250-6.
7. Baue AE. Sepsis, multi-organ dysfunction syndrome (MODS) and multiple organ failure (MOF). Prevention is better than treatment. *Minerva anesthesiologica*. 1999;65(7-8):477-80; discussion 81.

8. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine*. 2003;348(16):1546-54.
9. Kurt C. Sepsis ile İlişkili Tanımlar, Epidemiyoloji, İnsidans ve Klinik Guncel Bilgiler Işığında Sepsis Sempozyum Dizisi. 2006;no:51:17-26.
10. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Critical care medicine*. 2001;29(7 Suppl):S109-16.
11. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical care medicine*. 2006;34(2):344-53.
12. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine*. 2007;33(4):606-18.
13. Hector R. Wong JEN, Stephen W. Standage,, Oliveira aCFd. Sepsis 2011.
14. Y K. Sepsis Patofizyolojisi. *Yoğun Bakım Dergisi*. YORGANCI;5(2):80-4.
15. Rıdvan KARAALİ FT. Sepsis Patogenezi. *Klinik Gelişim*. 2009;22(3):71-7.
16. von Dessauer B, Bongain J, Molina V, Quilodran J, Castillo R, Rodrigo R. Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. *Journal of critical care*. 2011;26(1):103 e1-7.
17. Andrades M, Ritter C, de Oliveira MR, Streck EL, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *The Journal of surgical research*. 2011;167(2):e307-13.

18. Biolo Gianni, Antonione Raffaella ,Cicco Marcello.Glutathione metabolism in sepsis.Critical Care in Medicine.2007;35(9):591-5.
19. Prauchner CA, Prestes Ade S, da Rocha JB. Effects of diphenyl diselenide on oxidative stress induced by sepsis in rats. Pathology, research and practice. 2011;207(9):554-8.
20. M. Raghavan RV, J. A. Kellum. Sepsis-induced Acute Renal Failure and Recovery: Springer Berlin Heidelberg; 2007.
21. Kikeri D, Pennell JP, Hwang KH, Jacob AI, Richman AV, Bourgoignie JJ. Endotoxemic acute renal failure in awake rats. The American journal of physiology. 1986;250(6 Pt 2):F1098-106.
22. Wang W, Jittikanont S, Falk SA, Li P, Feng L, Gengaro PE, et al. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. American journal of physiology Renal physiology. 2003;284(3):F532-7.
23. REINHARDT RLHATA. Vitamin D Metabolism. Brown University, Department of Chemistry, Providence, Rhode Island.
24. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2011;25(4):531-41.
25. David Feldman PJM, Aruna V. Krishnan, and Eva Balint. Vitamin D: Biology, Action, and Clinical Implications 2008.
26. Kanda S, Mochizuki Y, Miyata Y, Kanetake H, Yamamoto N. Effects of vitamin D(3)-binding protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) on angiogenesis. Journal of the National Cancer Institute. 2002;94(17):1311-9.

27. Leheste JR, Melsen F, Wellner M, Jansen P, Schlichting U, Renner-Muller I, et al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(2):247-9.
28. Behzat Özkan HD. D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2011;54(2):99-119.
29. Wacker M, Holick MF. Vitamin D - effects on skeletal and extraskkeletal health and the need for supplementation. *Nutrients*. 2013;5(1):111-48.
30. Thien R, Baier K, Pietschmann P, Peterlik M, Willheim M. Interactions of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 with IL-12 and IL-4 on cytokine expression of human T lymphocytes. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(3):683-9.
31. Fernandes de Abreu DA, Eyles D, Feron F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34 Suppl 1:S265-77.
32. Watkins RR, Yamshchikov AV, Lemonovich TL, Salata RA. The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *The Journal of infection*. 2011;63(5):321-6.
33. Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *International journal of epidemiology*. 2008;37(1):113-9.
34. Lee P. Vitamin D metabolism and deficiency in critical illness. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2011;25(5):769-81.

35. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. The Journal of clinical investigation. 2006;116(8):2062-72.
36. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Archives of internal medicine. 2009;169(4):384-90.
37. Tümay, S.D Hormonu:Güncel Gelişmeler. Rev Hacettepe Tıp Dergisi. 2011;42(1):14-27
38. Horiuchi H, Nagata I, Takahashi K, Tsuchimoto M, Komoriya K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits thromboxane release from activated macrophages. Research communications in chemical pathology and pharmacology. 1992;78(2):235-43.
39. Asakura H, Aoshima K, Suga Y, Yamazaki M, Morishita E, Saito M, et al. Beneficial effect of the active form of vitamin D3 against LPS-induced DIC but not against tissue-factor-induced DIC in rat models. Thrombosis and haemostasis. 2001;85(2):287-90.
40. Equils O, Naiki Y, Shapiro AM, Michelsen K, Lu D, Adams J, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D inhibits lipopolysaccharide-induced immune activation in human endothelial cells. Clinical and experimental immunology. 2006;143(1):58-64.
41. JOHANNES P. T. M. VL, HUIBERT A. P. POLS. Vitamin D: Elseiver; 2005.

42. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2012;38(1):141-60.
43. Hyponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001;358(9292):1500-3.
44. Tai K, Need AG, Horowitz M, Chapman IM. Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. *Nutrition*. 2008;24(3):279-85.
45. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):820-5.
46. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*. 2004;47(3):451-62.
47. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes care*. 2004;27(12):2813-8.
48. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *International journal of clinical practice*. 2003;57(4):258-61.
49. Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, et al. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(3):1196-9.

50. Kremer R, Campbell PP, Reinhardt T, Gilsanz V. Vitamin D status and its relationship to body fat, final height, and peak bone mass in young women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(1):67-73.
51. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of epidemiology*. 2009;19(2):73-8.
52. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(7):1911-30.
53. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 2006;81(3):353-73.
54. Ankara Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesine Başvuran Hastalarda 25-OH Vitamin D Düzeyleri. Uçar F., Taşlıpınar, M., Soydaş, A. *Eur J Basic Med Sci* 2012;2(1):12-15.
55. Akman AO, Tumer L, Hasanoğlu A, İlhan M, Caycı B. The frequency of vitamin D insufficiency in healthy children between 1 and 16 years of age in Turkey. *Pediatr Int* 2011;53:968-73.
56. Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. Güzin Özelçi Kavas. *Türkiye Klinikleri*. 1989;9(1).
57. Marzatico F, Cafe C. Oxygen radicals and other toxic oxygen metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. *Functional neurology*. 1993;8(1):51-66.

58. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*. 1991;91(3C):14S-22S.
59. Mc Cord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. *AM J Med*. 2000;108:652-659.
60. Benzie IFF. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr*. 2000;39:53-61.
61. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *The American journal of medicine*. 1991;91(3C):23S-30S.
62. Champe P.C, Harvey R.A. Lippincot's illustrated reviews: Biochemistry second edition, J B Lippincot Company, Philadelphia. 1994.
63. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic. Res*. 1996;25:439-54.
64. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American journal of medicine*. 1991;91(3C):2S-13S.
65. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants in nutrition, health and disease. 1st ed. New York. Oxford University Press, 1994.
66. Turrens JF. Superoxide Dismutase and Catalase 2010.
67. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
68. C.Andersson, M. Soderstrom, B. Mannervik. *J. Biochem*. 1988, 249, 819-823.

69. BOYER, T.D. The Glutathione S-transferases: An Update Hepatology, 9 (3), 486-96.
70. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 2002;18(10):872-9.
71. Hamden K, Carreau S, Boujbiha MA, Lajmi S, Aloulou D, Kchaou D, et al. Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: protective effect of 17 beta-estradiol. Steroids. 2008;73(5):495-501.
72. Izquierdo MJ, Cavia M, Muniz P, de Francisco AL, Arias M, Santos J, et al. Paricalcitol reduces oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. BMC nephrology. 2012;13:159.
73. Tukaj S, Trzonkowski P, Tukaj C. Regulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on vascular smooth muscle cells. Acta biochimica Polonica. 2012;59(3):395-400.
74. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1Alpha,25 dihydroxyvitamin D3: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. Journal of nutritional science and vitaminology. 2009;55(3):215-22.
75. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Ayadi F, Garmazi F, Mezgenni N, et al. Inhibitory effects of 1alpha, 25dihydroxyvitamin D3 and Ajuga iva extract on oxidative stress, toxicity and hypo-fertility in diabetic rat testes. Journal of physiology and biochemistry. 2008;64(3):231-9.

76. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague--Dawley rats. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 1996;66(1):39-45.
77. Nemere I, Wilson C, Jensen W, Steinbeck M, Rohe B, Farach-Carson MC. Mechanism of 24,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of rapid, 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced responses: role of reactive oxygen species. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;99(6):1572-81.
78. Koren R, Hadari-Naor I, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. *Cancer research*. 2001;61(4):1439-44.
79. Hur E, Garip A, Camyar A, Ilgun S, Ozisik M, Tuna S, et al. The effects of vitamin d on gentamicin-induced acute kidney injury in experimental rat model. *International journal of endocrinology*. 2013;2013:313528.
80. Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;437(1):7-11.
81. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.

82. Durak I, Canbolat O, Kavutcu M, Ozturk HS, Yurtarslani Z. Activities of total, cytoplasmic, and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*. 1996;10(1):17-20.
83. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967;70(1):158-69.
84. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6.
85. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry*. 1974;249(22):7130-9.
86. McKinney JD, Bailey BA, Garrett LH, Peiris P, Manning T, Peiris AN. Relationship between vitamin D status and ICU outcomes in veterans. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2011;12(3):208-11.
87. Danai PA, Sinha S, Moss M, Haber MJ, Martin GS. Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. *Critical care medicine*. 2007;35(2):410-5.
88. Grant WB. Solar ultraviolet-B irradiance and vitamin D may reduce the risk of septicemia. *Dermato-endocrinology*. 2009;1(1):37-42.
89. Feriozzi S, Muda AO, Massimetti C, Costantini S, Ancarani E. Sepsis-induced acute renal failure: unusual clinical presentation. *Journal of nephrology*. 1998;11(5):261-5.
90. Wang Z, Holthoff JH, Seely KA, Pathak E, Spencer HJ, 3rd, Gokden N, et al. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment

mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury.

The American journal of pathology. 2012;180(2):505-16.

91. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C. Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. Clinical chemistry. 1995;41(6 Pt 1):867-71.

92. Sebai H, Ben-Attia M, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N. Protective effect of resveratrol on acute endotoxemia-induced nephrotoxicity in rat through nitric oxide independent mechanism. Free radical research. 2008;42(11-12):913-20.

93. Singh N, Li L. Reduced oxidative tissue damage during endotoxemia in IRAK-1 deficient mice. Molecular immunology. 2012;50(4):244-52.

94. Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. Intensive care medicine. 2003;29(10):1782-9.

95. Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. The Journal of surgical research. 2005;125(1):68-72.

96. Cadirci E, Halici Z, Odabasoglu F, Albayrak A, Karakus E, Unal D, et al. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. Clinical and experimental immunology. 2011;166(3):374-84.

97. Senoglu N, Yuzbasioglu MF, Aral M, Ezberci M, Kurutas EB, Bulbuloglu E, et al. Protective effects of N-acetylcysteine and beta-glucan pretreatment on

oxidative stress in cecal ligation and puncture model of sepsis. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2008;21(5):237-43.

98. Rojas C, Cadenas S, Herrero A, Mendez J, Barja G. Endotoxin depletes ascorbate in the guinea pig heart. Protective effects of vitamins C and E against oxidative stress. *Life sciences*. 1996;59(8):649-57.

99. Wang X, Zhu Y, Yang Y, Cheng S. Cardioprotective effect of calcitriol on myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2013;18(4):386-91.

100. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS letters*. 1993;326(1-3):285-8.

101. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free radical biology & medicine*. 1998;25(4-5):392-403.

102. Klatt P, Molina EP, De Lacoba MG, Padilla CA, Martinez-Galesteo E, Barcena JA, et al. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(12):1481-90.

8. ÖZET

LİPOPOLİSAKKARİT İLE SEPSİS OLUŞTURULAN RATLARIN BÖBREK DOKULARINDA SERBEST RADİKAL METABOLİZMASININ İNCELENMESİ; VİTAMİN D’NİN ETKİSİ

Çoklu organ yetmezliğine neden olan sepsis, yoğun bakımlarda mortalitenin ve morbiditenin en sık nedenidir. Sepsiste LPS’nin neden olduğu aşırı immün cevap hipovolemi, şok ve çoklu organ yetmezliğine neden olur. Aşırı immün yanıt oksidatif stres oluşturarak organ yetmezliğine neden olmaktadır. Son yıllarda vitamin D’nin immün regülatuar ve antioksidan etkileriyle ilgili yapılan araştırmalarda vitamin D’nin koruyucu rolünün olduğu gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda sepsiste serbest radikal metabolizmasını incelemeyi ve bu metabolizma üzerine vitamin D’nin etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada ağırlıkları yaklaşık 250-350 gr olan 24 adet dişi wistar albino rat kullanıldı. Ratlar kontrol grubu, sepsis grubu, vitamin D grubu, sepsis + vitamin D grubu olmak üzere 4 gruba bölündü. Sepsis 16 mg/kg dozunda LPS E.coli (O111.b4) intraperitoneal yolla uygulanarak oluşturuldu. D vitamini 3 gün boyunca 2 mg/kg 25(OH)Vitamin D3 (ayçiçek yağında çözülerek) gavaj yolula verildi. Ratların vücut sıcaklıkları rektal yoldan ölçüldü. Rat böbrek dokularında serbest radikal enzimleri kinetik olarak, böbrek fonksiyonlarını gösteren belirteçler Roche Cobas Integra 800 cihazında ölçüldü. Dokuların histopatolojik incelemesi yapıldı.

SOD ve GSH-Px aktivitelerinde gruplar arasında fark görülmedi. CAT aktivitelerinde en fazla sepsis+vitamin D grubunda olmak üzere tüm gruplarda

kontrol grubuna göre baskılanma görüldü. GST aktivitelerinin sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında baskılandığı görüldü. BUN ve kreatinin düzeylerinde sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında artış olduğu gözlemlendi. Kontrol ve vitamin D grupları normal histolojik yapı gösterirken, sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında bowman kapsülünde genişleme ve inflamasyon görüldü.

Sonuç olarak sepsiste D vitamini kullanılmasının renal hücreleri toksik etkiden koruyucu bir etkisinin olmadığını, buna karşılık özellikle sepsis durumunda kullanıldığında H_2O_2 ve GSH metabolizmasını kullanan anti oksidan enzimler üzerine baskılayıcı etkisinin olduğunu gördük. Konunun özellikle glutatyon ve glutatyon kullanan enzimler açısından daha detaylı değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: renal toksisite , sepsis , D vitamini , antioksidan enzimler

9. SUMMARY

INVESTIGATION OF FREE RADICAL METABOLISM IN SEPTIC RAT'S RENAL TISSUES TREATED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE ; EFFECT OF VITAMIN D

Sepsis, a multiple organ dysfunction syndrome, is a common cause of morbidity and mortality in the intensive care unit. LPS-induced excessive immune response is associated with hypovolemia, shock and multi-organ damage in sepsis. Excessive immune response causes multi-organ damage by increasing oxidative stress. In last years, studies on the immune regulatory and antioxidant effects of vitamin D demonstrated its protective role. In this study, we aimed to investigate the effects of VitaminD on free radical metabolism in LPS injected rats.

24 female wistar albino rats (weight 250-350 g.) were divided into 4 groups randomly. 1) Control , 2) Sepsis, 3) Sepsis+vitamin D, 4) Vitamin D. Sepsis was induced with single intraperitoneal injection of LPS E.coli (O111-b4) 16 mg/kg. Vitamin D was given 2 mg/kg 25(OH) single dose via gavage (in sunflower oil) for 3 days. Rectal body temperature was measured in rats. Renal function tests (BUN, creatinine) were analysed in serum by Integra 800. Tissue catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione-S-transferase (GST) levels were analysed kinetically. Additionally rat renal tissues were analysed histopathologically.

SOD and GSH-Px activities were not significantly different between the groups. CAT activities were depressed in all groups compared with control group, this inhibition was mainly watched in the sepsis+vitamin D group. GST activities

were depressed in sepsis ve sepsis+vitamin D group. BUN and creatinine levels were elevated in sepsis and sepsis+vitamin D group. While control and vitamin D groups showed normal histological structure, inflammation, expansion in bowman capsule and degeneration in sepsis and sespsis+vitamin D groups.

In conclusion, we found that vitamin D treatment in sepsis has no protective role against renal toxicity effects on liver. However treatment vitamin D in sepsis have inhibitory effect on antioxidant enzymes which use H_2O_2 and GSH metabolism. We think that more detailed assessment of this subject is necessary in terms of glutathione and enzymes using glutathione.

Key words: renal toxicity , sepsis , vitamin D , antioxidant enzymes

10. ÖZGEÇMİŞ

İsim: GÖKÇE ATİKELER
Doğum tarihi ve yeri: 07.05.1984 Gaziantep
Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti
Medeni Durumu: Evli
Ev Adresi: Liparis Sitesi no:32/6 Emek Mah. Çankaya/Ankara

İş Adresi: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya
Ana Bilim Dalı 5. Kat Beşevler/Ankara
Telefon: 0 533 7617461
e – mail: gokcefil@hotmail.com
Görevi / Ünvanı: Tıp Doktoru
Eğitim: 2002-2009 : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
2009-Halen : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyokimya Anabilim Dalında Uzmanlık Eğitimi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Klinik Biyokimya Derneği
Türk Biyokimya Derneği
Türk Toksikoloji Derneği