



**ŞİGA TOKSİNE BAĞLI HEMOLİTİK ÜREMİK
SENDROMLU RATLARDA RUTİN ETKEN
MADDESİNİN; İNTERLÖKİN, TÜMÖR NEKROZ
FAKTÖR VE OKSİDATİF STRES DÜZEYLERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mustafa ÇELİK

Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ

Yüksek Lisans Tezi – 2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞİGA TOKSİNE BAĞLI HEMOLİTİK ÜREMİK
SENDROMLU RATLARDA RUTİN ETKEN
MADDESİNİN; İNTERLÖKİN, TÜMÖR NEKROZ
FAKTÖR VE OKSİDATİF STRES DÜZEYLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mustafa ÇELİK

**Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ**

**ERZURUM
2017**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK FİZYOLOJİ
ANABİLİMDALI

ŞİGA TOKSİNE BAĞLI HEMOLİTİK ÜREMİK SENDROMLU
RATLARDA RUTİN ETKEN MADDESİNİN; İNTERLÖKİN,
TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR VE OKSİDATİF STRES DÜZEYLERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa ÇELİK

Tez Savunma Tarihi :26.09.2017

Tez Danışmanı :Prof.Dr.Fikret ÇELEBİ

Jüri Üyesi :Prof.Dr.D.Ali ÇINAR

Jüri Üyesi :Yrd.Doç.Dr.Volkan GELEN

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM – 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Şiga Toksinler	2
2.1.1. Şiga Toksinin Yapısı	2
2.1.2. Şiga Toksin Reseptörleri	3
2.1.3. Şiga Toksinin Toksisitesi	3
2.1.4. Şiga Toksin-İmmün Yanıt İlişkisi	3
2.1.5. Şiga Toksin-Oksidatif Stres İlişkisi.....	4
2.2. Hemolitik Üremik Sendrom.....	5
2.2.1. Atipik Hemolitik Üremik Sendrom.....	5
2.2.2. Tipik Hemolitik Üremik Sendrom	8
2.3. Rutin.....	8
2.4. Sitokinler.....	10
2.4.1. İnterlökin 1	10
2.4.2. İnterlökin 6	11
2.4.3. İnterlökin 8	11
2.4.4. Tümer Nekroz Faktör- α	11
2.5. Oksidatif Stres.....	12
2.5.1. Malondialdehit (MDA).....	13
2.5.2. Nitrik Oksit (NO)	13

2.5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)	14
2.5.4. Gultasyon (GSH)	14
2.6. Böbrek.....	15
2.6.1. Kandaki Üre Azotu.....	15
2.6.2. Kreatinin	16
2.6.3. Alkalen Fosfataz (ALP).....	16
2.6.4. Elektrolit Denge	16
3. MATERYAL VE METOT.....	17
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları	17
3.2. Kullanılan Etken Madde ve Dozları	17
3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	18
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Yapılan Enjeksiyonlar	19
3.5. Doku ve Organların Toplanması.....	21
3.6. Doku ve Organların Analiz Edilmesi.....	21
3.7. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BUGULAR	42
4.1. Böbrek Biyokimya Bulguları.....	42
4.2. İnterlökinler ve TNF α Bulguları	44
4.3. Oksidatif Stres Bulguları	48
4.4. Böbrek Dokusundan Elde Edilen Histopatolojik Bulgular.....	52
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	71
EKLER	85
EK 1 ÖZGEÇMİŞ.....	85
EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU	86

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ' ye en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ali ÇINAR hocama, çalışmalarım esnasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Emin ŞENGÜL, Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM ve Sayın Yrd. Doç.Dr. Volkan GELEN'e ve yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

Mustafa ÇELİK

ÖZET

Şiga Toksine Bağlı Hemolitik Üremik Sendromlu Ratlarda Rutin Etken Maddesinin; İnterlökin,Tümör Nekroz Faktör ve Oksidatif Stres Düzeyleri Üzerine Etkisinin Araştırılması *.

Amaç: Şiga toksin üreten *Escherichia coli*, *Shigella diseanteria* tip 1 ve *Citrobacter freundii* gibi bakteriler tarafından salgılanan Şiga toksin (Stx), canlı organizmada renal inflamasyonlara neden olarak İnterlökin (IL 1, IL 6, IL 8) ve Tümör Nekroz Faktör (TNF α) düzeylerini artırmaktadır. Şiga toksin ayrıca oksidatif stresi tetikleyerek oksidan ve antioksidan parametreleri olan Malondialdehit ve Nitrik oksit seviyelerinin artmasını, Süperoksit dismutaz ve Glutasyon seviyelerini azaltarak organizmanın antioksidan kapasitesinin düşmesine neden olur. Bu durum özellikle böbrek endotel hücrelerini etkileyerek mikroanjiopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve akut böbrek hasarı gibi belirtiler veren Hemolitik Üremik Sendroma sebep olmaktadır. Rutin etken maddesinin güçlü antioksidan ve yangı giderici özellikleri bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında deneysel olarak oluşturulmuş Şiga toksine bağlı Hemolitik Üremik Sendromlu ratlarda, rutin etken maddesinin inflamasyon ve oksidatif stres üzerine protektif etkisini, interlökinler, tümör nekroz faktör ve oksidatif stres parametreleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışma toplamda 160-250 gr ağırlığında 12 haftalık yetişkin Sprague-Dawley ırkı 40 adet erkek rat üzerinde yapıldı. Çalışmalar ratlarda Şiga toksin 2 (Stx2) (100 ng/kg) ile oluşturulan HÜS modeli üzerinde gerçekleştirildi. Hemolitik Üremik Sendromlu ratlar üzerinde rutin etken maddesinin protektif etkisini iki farklı doz (50 mg/kg , 100 mg/kg) kullanarak, interlökinler , TNF α , oksidatif stres parametreleri, biyokimyasal böbrek parametreleri, histopatolojik bulgular kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Ratlarda Stx2 (100 ng/kg), Stx2 (100 ng/kg)+ Rutin (50 mg/kg) , Stx2 (100 ng/kg)+ Rutin 100(mg/kg), Rutin 100(mg/kg) dozları uygulandıktan sonra IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , MDA, SOD, GSH, NO düzeyleri hesaplandı. Gruplar arasında parametre bazında oluşan farklar one way ANOVA testi ile değerlendirildi.

Sonuç: Stx2'nin böbreklerde inflamasyona ve oksidatif strese sebep olduğu ve uygulanan 2 farklı rutin dozunun inflamasyon ve oksidatif stresin etkilerini belirgin bir şekilde azalttığı kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Şiga toksin, Hemolitik Üremik Sendrom, İnterlökin, TNF α , MDA, SOD, GSH, NO

*Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2016/75 BAP proje numaralı Yüksek Lisans tez projesi olarak desteklenmiştir.

ABSTRACT

Investigation of the Routine Agent; Interleukin, Tumor, Necrosis Factor and Oxidative Stress Level In Rats With Hemolytic Uremic Syndrome Related With Shiga Toxin *

Aim : Shiga toxin (Stx), which is secreted by bacteria such as Shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae type 1* and *Citrobacter freundii*, increases the Interleukin (IL 1, IL 6, IL 8) and Tumor Necrosis Factor (TNF α) levels by causing renal inflammations in living organisms. By triggering oxidative stress, shiga toxin also causes to increase the level of Malondialdehyde and Nitric Oxide which are antioxidant parameters and by reducing Superoxide dismutase and Glutathione levels, it causes to reduce the antioxidant capacity of the organism. This situation, especially by affecting kidney endothelial cells, results in Hemolytic Uremic Syndrome which causes symptoms such as microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure. Strong antioxidant and anti-inflammation properties of the routine active ingredient are known. In the light of this information the aim of the study is to investigate the protective effects of routine active ingredients by using interleukins, tumor necrosis factor and oxidative stress parameters on inflammation and oxidative stress in rats with Hemolytic Uremic Syndrome based on experimentally generated Shiga Toxin.

Material and Method: In total, the study was conducted on 40 grown up male Sprague-Dawley rats weighing 160-250 gr at 12 weeks of age. Studies were performed in rats on HUS model generated with Shiga toxin 2 (Stx2) (100 ng / kg). By using two different doses (50 mg/kg, 100 mg/kg) and Interlocking agents, TNF α , oxidative stress parameters, biochemical renal parameters, histopathological methods protective effect of routine active ingredients on rats with Hemolytic Uremic Syndrome was evaluated.

Results: After Stx2 (100 ng / kg), Stx2 (100 ng / kg) + Routine (50 mg / kg), Stx2 (100 ng / kg) + Routine 100(mg/kg), Routine 100(mg/kg) doses were conducted, the levels of IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , MDA, SOD, GSH, NO were calculated. Differences based on parameters between the groups were evaluated by one way ANOVA test.

Conclusion: It has been concluded that Stx2 caused inflammation and oxidative stress in the kidneys and that the two different routine doses eradicated the effects of inflammation and oxidative stress.

Key Words: Shiga toxin, Hemolytic Uremic Syndrome, Interleukin, TNF α , MDA, SOD, GSH, NO

*This study supported as Master Thesis Project the number of 2016/75 by Scientific Research Project Coordinator of Atatürk University.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abs	: Absorbans
aHÜS	: Atipik hemolitik üremik sendrom
ALP	: Alkalen fosfataz
BUN	: Kandaki Üre Azotu
C₃	: Kompleman-3
C₅	: Kompleman-5
CFB	: Kompleman faktör-B
CFH	: Kompleman faktör-H
CFHR	: Kompleman faktör H ilişkili proteinler
CFI	: Kompleman faktör-I
Cl	: Klor
cNOS	: Yapısal nitrik oksit sentaz
DTNB	: 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoik asit
Gb	: Globotriosil seramid
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Glutatyon disülfat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HRP	: Horseradis peroksidaz
HÜS	: Hemolitik üremik sendrom
IL-1	: İnterlökin 1
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

K	: Potasyum
LR	: Linearize değer
MCP	: Membran kofaktör protein
MDA	: Malondialdehit
Na	: Sodyum
NO	: Nitrik oksit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
STEC	: Şiga toksin üreten <i>Escherichia coli</i>
Stx	: Şiga toksin
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif substans
TCA	: Triklorasetik asit
TMA	: Trombotik mikroanjiopati
TNB	: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
TNF-α	: Tümer nekroz faktör - α
TTP	: Trombotik trombositopenik purpura

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kristal haldeki Stx1'nin A ve B alt birimleri.	2
Şekil 2.2 Atipik hemolitik üremik sendromun patogenezi	6
Şekil 2.3. Rutin'in kimyasal yapısı.....	9
Şekil 4.1. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının IL-1 β düzeyi üzerine protektif etkisi.	44
Şekil 4.2. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının IL-6 düzeyi üzerine protektif etkisi.	45
Şekil 4.3. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının IL-8 düzeyi üzerine protektif etkisi.	46
Şekil 4.4. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının TNF- α düzeyi üzerine protektif etkisi.	47
Şekil 4.5. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının MDA (TBARS) düzeyi üzerine protektif etkisi.....	48
Şekil 4.6. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının SOD düzeyi üzerine protektif etkisi..	49
Şekil 4.7. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının GSH düzeyi üzerine protektif etkisi.	50

Şekil 4.8. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının NO düzeyi üzerine protektif etkisi..	51
Şekil 4.9. Böbreklerin normal histolojik yapısı, (Kontrol grup, H&E, Bar: 20µm.).....	52
Şekil 4.10. Böbrek korteksinde interstisyel nefrit, tubul epitellerinde dejenerasyon ve çok sayıda nekroz, tubul lümeninde hyalin silindirleri, (STX grup,H&E, Bar: 20µm.).	52
Şekil 4.11. Böbrek medullasında interstisyel nefrit, tubul epitellerinde dejenerasyon ve çok sayıda nekroz, tubul lümeninde hyalin silindirleri, şiddetli hiperemi, (STX grup, H&E, Bar: 20µm.).....	53
Şekil 4.12 Böbrek dokuları incelendiğinde hafif intersitisyel nefrit, tubul epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, damarlarda hiperemi, (RU50+STX grup, H&E, Bar: 20µm.)	53
Şekil 4.13 Çok hafif interstisyel nefrit, tubul epitellerinde hidropik dejenerasyon görülürken hiç nekrotik hücreye rastlanmadı, (RU100+STX grup, H&E, Bar: 20µm.)	54
Şekil 4.14. Böbreklerin normal histolojik yapısı. (RU 100 grup,H&E, Bar: 20µm.)...	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Atipik hemolitik üremik sendromun nedenleri.....	7
Tablo 3.1. MDA standart solüsyonları.....	32
Tablo 3.2. Süperoksit Dismutaz standart solüsyonları.....	34
Tablo 3.3. Gulutatyon standart solüsyonları	36
Tablo 3.4. Nitrat standart solüsyonları.....	38
Tablo 3.5. Nitrit standart solüsyonları.....	39
Tablo 4.1. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının böbrek biyokimya parametreleri üzerine protektif etkisi.	42
Tablo 4.2. Böbrek dokusunda histopatolojik değerlendirme (Işık mikroskopunda incelenen kesitler lezyonlara göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++)).	55

1. GİRİŞ

Hemolitik üremik sendrom (HÜS) genelde mikroanjiopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve akut böbrek hasarı ile bilinen patolojik durumdur. HÜS özellikle çocukluk çağında oluşan akut böbrek hasarının en çok görülen nedenidir. HÜS'ün klinik bulgularının sebebi trombotik mikroanjiopatidir. Patolojik bulgular atardamarlarda ve kılcal damar duvarındaki kalınlaşma, endotel şişmesi ve kalınlaşmasıdır. Fibrin ve kan pulcuğunca zengin trombüsler damar lümeninde tıkanıklara neden olur. Çok sayıda dokunun etkilendiği bu durumdan böbrek dokusu en fazla hasar gören dokulardandır.¹ Şiga toksin (Stx) üreten Escherichia coli (STEC) ilişkili hemolitik üremik sendrom tüm olgularının %90'ını oluşturur.²

En ciddi HÜS vakalarında yoğun kortikal nekroz gelişir. Böbrek içerisinde ağırlıklı olarak inflamatuvar hücre, infiltratlar, nötrofiller ve makrofajlar oluşur.^{3, 4} Ayrıca renal kortikal glomerüler ve tübüler hücrelerin apoptozisi belgelenmiştir.^{5, 6}

Sistemik Şiga toksin toksisitesi böbrek, gastrointestinal sistem ve diğer organ ve dokulardaki vasküler endotel hücrelerine hasar vererek HÜS oluşumunun temelini oluşturur. Endotel hasarına sebep olan bir diğer etken ise oksidatif stresin zararlı etkisidir.^{7, 8}

Rutin'in antioksidan, sitoprotektif, vazoprotektif, antikarsinojenik, nöroprotektif ve kardiyoprotektif aktiviteler de dahil olmak üzere bir takım farmakolojik aktiviteler bilinmektedir.⁹

Hemolitik üremik sendrom özellikle çocukluk çağındaki bireylerde akut ve kronik böbrek yetmezliğine hatta ölümlere neden olabilir. Çalışmamızda rutin'in Hemolitik üremik sendrom üzerine koruyucu etkisi araştırılmıştır.

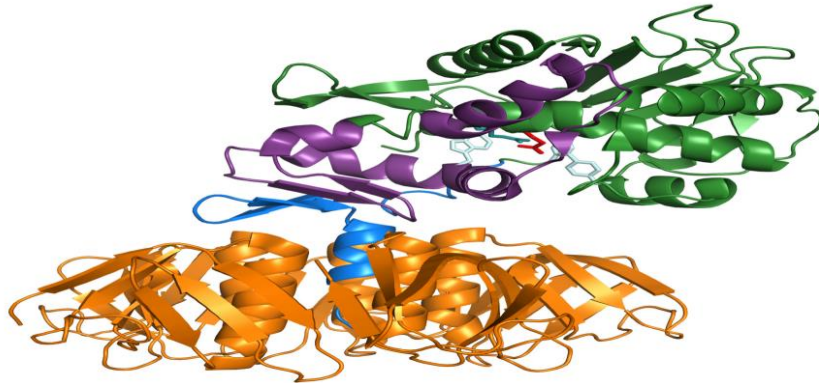
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Şiga Toksinler

Çocuklarda Hemolojik üremik sendromun en sık görülme nedeni olarak Şiga toksin (Stx) üreten bakteriyel enfeksiyonlar gösterilir. Şiga toksin üreten bu bakteriler arasında Şiga Toksin Üreten *Escherichia coli* (STEC), *Shigella dizantheria* tip 1 ve *Citrobacter freundii* bulunur.¹⁰

2.1.1. Şiga Toksinin Yapısı

Escherichia coli tarafından üretilen Şiga toksin yapısal ve fonksiyonel olarak *Shigella dizantheria* Tip 1 tarafından üretilen Şiga toksine benzer. Şiga toksinin Stx1 ve Stx 2 olmak üzere iki ana tipi bulunur. Bu iki tip den Stx1 *Shigella* tarafından üretilen toksinle benzerlik gösterir, Stx2 ise *Shigella* tarafından üretilen toksinle yaklaşık % 56 homolojiye sahip olmasına karşın immünolojik olarak birbirinden farklıdır.¹¹ Şiga toksin, enzimatik olarak aktif 1 tane A (32 kDa) alt birimi ve buna non-kovelent bağla bağlanmış hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmadan sorumlu 5 tane B (her biri 7.7 kDa) (pentamer) alt biriminden oluşur. Şiga toksinin A zinciri A1 (27.5 kDa) ve A2 (4.5 kDa) fragmentlerinden oluşmaktadır. B alt biriminin görevi toksinin ökaryotik hücre yüzeyindeki Gb3 reseptörlerine bağlanmasını sağlamaktadır.¹²⁻¹⁴



Şekil 2.1. Kristal haldeki Stx1'nin A ve B alt birimleri.¹⁵

Yukarıda ki şekilde stx 1'in B pentameri turuncu A₂ mavi ile gösterilmiştir. A₁ in ribozomal etkileşim bölgeleri mor bunun dışındaki bölgeler ise yeşil renk ile gösterilmiştir.

2.1.2. Şiga Toksin Reseptörleri

Globotriosil seramid (Gb3), globotetraosil seramid (Gb4) ve P1 (kırmızı kan hücre membranında bulunan glikolipid antijenini içeren bir kan grubu) olarak bilinen membran glikolipidleri, Stx toksinini tanıyan reseptörler olarak tespit edilmiştir.¹⁶⁻¹⁹

Şiga toksin reseptörlerinin dağılımı hücre çeşidine göre farklılık gösterebilir. Bir dokuda Şiga toksin reseptörlerinin miktarının fazla olması Şiga toksinin aktivitesini artırmaktadır. Şiga toksin reseptörleri özellikle intestinal ve renal epitelyum hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Bu nedenle Şiga toksin en fazla hasarı bu dokulara vermektedir.^{20, 21}

2.1.3. Şiga Toksinin Toksisitesi

Yapısal olarak birbirine benzeyen Stx1 ve Stx2'nin toksik etkileri ve toksisite oluşturma süreçlerinde farklılıklar vardır. Epidemiyolojik çalışmalar, Stx2 üreten STEC suşlarının HÜS sendromu gibi ciddi hastalıklarına neden olduğunu göstermektedir.^{22, 23} İnsan böbrek mikrovasküler endotelial hücrelerin, Stx2'nin sitotoksik etkisine karşı duyarlılığı Stx1'in etkisine göre daha fazladır.²⁴ Yapılan çalışmalar insan intestinal mikrovasküler endotelial hücreleri için Stx2'nin Stx1'e göre daha toksik olduğunu göstermiştir.²¹

2.1.4. Şiga Toksin-İmmün Yanıt İlişkisi

Şiga toksin, endotel hücrelerinde hasara neden olarak tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin 1 β (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6), interlökin 8 (IL-8) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olabilir.^{25, 26} Salınan bu inflamatuvar sitokinler böbrek epitelyum hücreleri ve vasküler endoteryal hücrelerden salınan Gb3 reseptörlerinin konsantrasyonunu artırarak Şiga toksin'in etkisini artırır.^{27, 28} Bu veriler Şiga toksin'e karşı konakta oluşan sitokin yanıtının Hemolitik üremik sendrom patogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir.²⁹

2.1.5. Şiga Toksin-Oksidatif Stres İlişkisi

Oksidatif stres endotel hasarına sebep olur. Aerobik hücre metabolizmasına serbest radikaller ve oksidatif stres fizyolojik düzeyde etki eder. Bu fizyolojik etki endotel hücrelerinin antioksidan kapasitesiyle dengelenip ortadan kaldırılabilir.⁸ Serbest radikal oluşumu antioksidan kapasitesini aşarsa lipitler, proteinler ve DNA okside olabilir. Yapılan çalışmalar sonucunda serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) nötrofillerde NADPH enzim ailesinin aktivasyonu ile oluştuğu tespit edilmiştir. Nötrofil tarafından üretilen ROS'un %50-70'i hücre içi ile sınırlandırılmış olmasına rağmen kalan %50-30'u hücre dışı boşluğa aktararak doku hücrelerinde oksidatif hasara sebep olur. Oksidatif hasar sonucu membran geçirgenliği değişir buna bağlı olarak hücre yapı ve fonksiyonu bozulur.⁷

Lipid peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) gibi reaktif aldehit üreterek hücre bileşenlerine zarar verir. Hücre membranlarında bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu ROS meydana gelir. ROS'un kontrolsüz bir şekilde oluşumu hücre membranında bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserol ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin peroksit ve peroksinitrit (NO vb.), alkol, aldehitler (MDA vb.), hidroksi yağ asitler, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkımına sebep olur ve oksidatif hasar meydana gelir.³⁰

Glutathione (GSH) önemli bir hücre içi antioksidandır. GSH bir indirgenme maddesi olarak hareket eder ve hücrede ROS'u izole ederek antioksidan görevi görür. GSH peroksidaz bir substrattır. Bu nedenle hücrede yaşanan oksidatif stres GSH seviyesini azaltarak hücrenin antioksidan kapasitesini düşürür.^{31, 32}

HÜS hastalarında akut dönem boyunca, kırmızı kan hücrelerindeki lipidperoksidan seviyeleri yüksek seyrederek.³³ Bu yükselme proteinlerde ileri seviye oksidasyon süreci belirtileri görülür ve sağlıklı olunan dönemden daha yüksek bir

GSSG konsantrasyonu oluşur.³⁴ Buna paralel, HÜS hastaları eritrositlerinde SOD aktivitesinde kayda değer bir azalma görülür.³⁵

2.2. Hemolitik Üremik Sendrom

Hemolitik üremik sendrom (HÜS), trombotik mikroanjiopatiye (TMA) bağlı olarak mikroanjiopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve akut böbrek hasarı gibi klinik bulgular gösterilmektedir. HÜS' ün çocuklarda akut böbrek hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Hemolitik üremik sendromun patolojik lezyonu olarak arteriol ve kapiller duvarlarındaki kalınlaşma, endotel şişmesi ve endotel hasarı gösterilmiştir. HÜS vakalarında fibrin ve trombosit açısından zengin trombüsler damar lümeninde tıkanıklıklara yol açarak böbrek başta olmak üzere çok sayıda doku ve organa zarar verir.¹

Hemolitik üremik sendromun oluşumunda bilinen en önemli etken Şiga toksin (Stx) üreten *Escherichia coli*'dir (STEC-HÜS). STEC-HÜS dışında kalan HÜS olgularının büyük çoğunluğunu kompleman ilişkili HÜS'ler oluşturur.³⁶

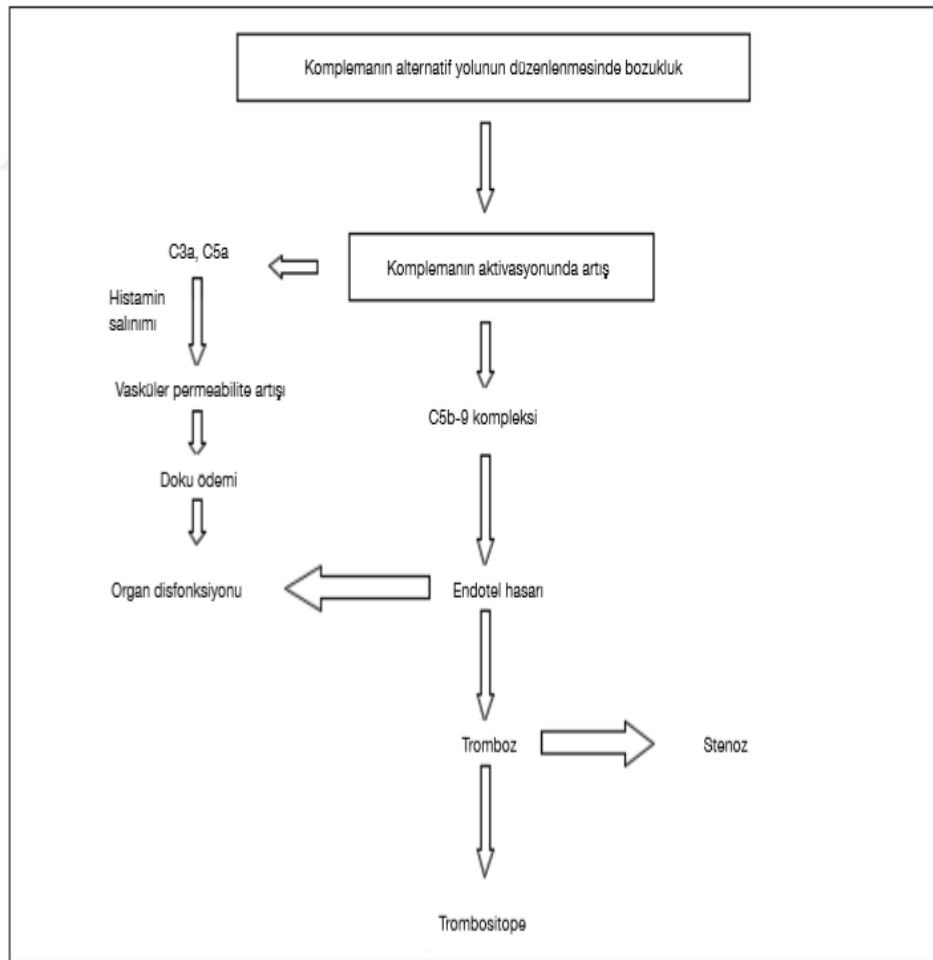
Hemolitik üremik sendromun literatürde farklı etiyolojik sınıflamaları vardır. Bu sınıflamaların bir kısmı TMA sınıflamaları ile örtüşmektedir. Klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan sınıflandırma yöntemi tipik ve atipik HÜS (aHÜS) sınıflamasıdır. Tipik HÜS, STEC'e bağlı HÜS için kullanılmaktadır. Atipik HÜS tanımı ile ilgili literatürde bazı çelişkiler bulunmaktadır. Yakın zamana kadar aHÜS tanımı STEC bağlı HÜS dışında kalan tüm HÜS olguları için kullanılırken, son yıllarda bazı yazarlar tarafından yalnızca kompleman ilişkili HÜS için kullanılmaya başlanmıştır.³⁷

2.2.1. Atipik Hemolitik Üremik Sendrom

Enfeksiyon ilişkisi saptanmamış HÜS'ler genel olarak aHÜS olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda görülen HÜS'te özgeçmiş ve aile öyküsü önem taşımaktadır. Hastada HÜS tablosunun yinelemesi, aile öyküsünde HÜS ya da TTP olması, hastanın

yaşının 6 aydan küçük olması, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria* ya da *Shigalla pneumonia* enfeksiyonu ile ilişkisinin saptanmamış olması ayrıntılı inceleme gerektirir.³⁸

Atipik HÜS'lü olguların yaklaşık %50-70'inde kompleman düzenleyicileri (Kompleman Faktör H(CFH), Kompleman Faktör I(CFI), kompleman faktör H ilişkili proteinler(CFHR), Membran Kofaktör Protein(MCP) ve kompleman aktivatörlerini kompleman faktör B(CFB) ve C3) kodlayan genlerde mutasyon saptanabilmektedir.³⁹ Kompleman genlerinde meydana gelen mutasyonlar komplemanın alternatif yolunun aşırı aktivasyonuna sebep olur. Bu olay C₃ ve C₅ ' in aşırı salınımını ve C₅b-9 kompleksinin oluşumunu tetikler. Bu olaylar plateletlerin aktivasyonu, endotel hasarı, inflamasyon ve sistemik mikroanjiopatik lezyonlara sebep olur.⁴⁰



Şekil 2.2. Atipik hemolitik üremik sendromun patogenezi

Tablo 2.1. Atipik Hemolitik Üremik Sendromun Nedenleri.³⁹

Kompleman sisteminin düzenlenmesi ile ilgili bozukluklar (komplemanı düzenleyen ve aktive eden proteinlerde mutasyon)
Bozuk ADAMSTS13 aktivitesi
Trombomodülin'in genetik yokluğu
Bozuk kobalamin metabolizması
Stx üretmeyen ishal etkenleri (Norovirüs, Campylobacter upsaliensis, Clostridium difficile)
Solunum yolu enfeksiyonları (Bordetella pertussis, Streptococcus pneumonia, Haemophilus influenzae)
Viral enfeksiyon etkenleri (Varicella, Cytomegalovirus, Influenza, Hepatit A, Hepatit C, HIV, Coxsackie B virus, EBV, HPV B19)
Gebelik
Maligniteler
Otoimmün hastalıklar (sistemik lupus eritematozus, antifosfolipid sendromu, C3 nefropati)
İlaç kullanımı (kinin, kalsinörin inhibitörleri, sisplatin, gemsitabin, mitomisin, klopidoğrel, interferon α ve β , siklosporin, oral kontraseptifler, kokain, eroin, vb.)
Metilmalonik asidüri ve homosistinüri birlikteliği

2.2.2. Tipik Hemolitik Üremik Sendrom

HÜS tipik olarak Şiga toksin üreten *Escherichia coli*'nin (STEC) neden olduğu kanlı ishal sonrası gelişen bir hastalıktır. Çocukluk çağında görülen hastaların yaklaşık %90'ının STEC ilişkili HÜS olduğu bilinmektedir ve tipik HÜS olarak adlandırılmaktadır.⁴

Enfeksiyona bağlı HÜS çocuklarda akut böbrek yetmezliğinin en sık nedeni olup enfeksiyon etkenlerinin en sık görüneni STEC'dir.⁴¹ *Escherichia coli*'nin O157:H7 serotipi HÜS'e neden olan vakalarda en sık rastlanan serotiptir. Bunun yanında *Escherichia coli*'nin O26:H11, O145:NM, O103:H121, O111:H-, O104:H4 serotipleri, *Shigella dysenteriae* tip 1 ve *Citrobacter freundii* de HÜS'e neden olmaktadır.⁴²

Tipik HÜS sıklıkla sporadik görülmesine karşın büyük salgınlar da bildirilmiştir. Coğrafik ve mevsimsel değişiklik göstermekle birlikte, yıllık insidansı 100000 de 0.07-8 vaka oranında bildirilmiştir. Sıklıkla yaz sonunda ve sonbaharda görülmektedir. Soğuk iklime sahip bölgelerde HÜS'ün insidansı daha yüksek olmaktadır.³⁸

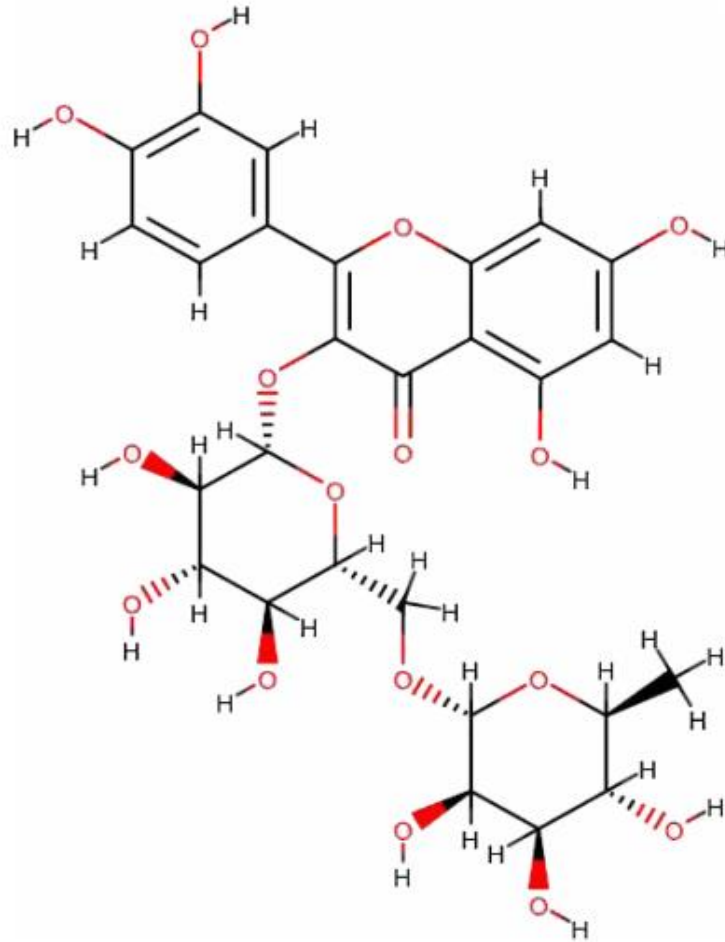
STEC enfeksiyonu sonrası %5-15 oranında HÜS gelişmektedir. Beş yaş altında bu oran %12.9 olarak belirlenmiştir. STEC enfeksiyonu sırasında lökositöz saptanması ve antimitotik ilaç kullanımı HÜS riskini artırdığı bildirilmiştir. Bir çalışmada STEC enfeksiyonu sırasında antibiyotik kullanımı HÜS riskini artırdığı bildirilmişse de takip eden çalışmalar bunu desteklememiştir.^{38, 43, 44}

2.3. Rutin

Rutin ismi içerisinde rutin etken maddesi bulunduran *Ruta graveolens* bitkisinden gelmektedir. Kimyasal olarak disakarit rutinoz ile birlikte flavonolik aglycone ve quercetin içeren bir glikozit yapıdadır.⁹ Rutin quercetin'den oluşan bir flavanol glikozittir ve disakarit rutinoz içerir.⁴⁵ Siyah çay, elma kabuğu, karabuğday başta olmak üzere birçok bitkide bulunur.⁴⁶

Rutin, peroksit köklere, süperoksit anyonlara, singlet oksijen ve hidroksil köklere hidrojen atomları vererek Reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizleyicisi olarak çalışır. Ayrıca lipid peroksidasyonunu oksitleyen metal iyonlarının sonlandırıcısı ve bağlayıcısı olarak işlev görür.^{47, 48}

Rutin anti-oksidan, antikarsinogenik, antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiplatelet, sitoprotektif, nöroprotektif, kardiyoprotektif ve vazoprotektif özellikleri saptanmıştır.^{9, 49-51} Rutinin oksidatif stres, inflamasyon, lipogenez ile glukoz ve lipid modülasyonu sayesinde karaciğer ve yağ dokusunda metabolizma üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir.^{52, 53} Aynı zamanda birçok çalışma rutin in iskemi/reperfüzyon böbrek hasarında böbrekleri koruma üzerine önemli etkisi olduğunu göstermiştir.^{54, 55}



Şekil 2.3. Rutin'in kimyasal yapısı⁹

2.4. Sitokinler

Sitokinler organizmada immün sistemin düzenlenmesinde görev alırlar. Sitokinler proinfamatuvar olaylarda rol oynayan, immün sistemin protein yapısındaki habercileridir. Sitokinler immün sistemin hormonları olarak düşünülmüş olsa da hem endokrin bezler tarafından salgılanmaması hem de sadece endokrin sistem hormonlarının aksine lokal etki göstermesi bakımından endokrin sistem hormonlarından ayrılır.^{56, 57} Sitokinler 800-4000 dalton molekül ağırlığındaki yapısal fonksiyonu bulunmayan proteinler olup inflamasyonda ki rollerine göre proinflamatuvar ve antiinflamatuvar olmak üzere ikiye ayrılır. Proinflamatuvar sitokinlere örnek olarak TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 verilirken antiinflamatuvar sitokinlere örnek olarak IL-4, IL-10 verilebilir.⁵⁸ Proinflamatuvar sitokinler immün yanıtlarda patojenlerin hızlı eliminasyonuna yardım ederek immün yanıtın artmasında görev alırlar. Antiinflamatuvar sitokinlerin esas görevi ise T hücrelerden salgılanan sitokinlerin salgılanmasını engellemektir. Antiinflamatuvar sitokinlerin diğer bir görevi de bazı hücre fonksiyonlarının ve diğer sitokinlerin sentezini azaltmaktır.⁵⁹ İnflamatuvar mediatör olan TNF- α ve IL-1 insan endotel hücrelerinde Stx1 reseptörlerini indükleyerek Stx1'in sitotoksik etkisini artırır.²⁸

Yaptığımız çalışmada, ratlarda Şiga toksin 2'nin etkisini gidermek amacıyla kullandığımız rutin etken maddesinin oluşan inflamasyon düzeyleri üzerine etkisini görebilmek için bazı sitokinlerden yararlandık bu sitokinlerin genel özellikleri şu şekildedir;

2.4.1. İnterlökin 1

İnterkökin 1'in dört alt tipi bulunur. Bunlar IL-1 α , IL-1 β , IL-1 γ ve antagonist olan IL-1ra tipleridir. İnterlökinler temelde fagositlerden sentezlenmekle beraber nötrofil, B lenfositler, T lenfositler, Naturel Killer (NK) hücreler, keratinositler, dendrik

hücreler, astrositler, fibroblastlar hücrelerinden sentezlenir. İnterlökin 1'in sitimülasyonu temelde TNF- α tarafından sağlanmasına karşın kendi kendini de sitimüle edebilir.⁶⁰ IL-1 β sitokini TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-6, IL-4, IL-10 gibi sitokinlerin salınmasını sitimüle etmektedir.⁶¹

2.4.2. İnterlökin 6

İnterlökin 6 T-Lenfositler, B-Lenfositler, makrofajlar, endoteryal hücreler, fibroblastlar tarafından üretilir. Akut travma ve stres esnasında IL-6 seviyesinde yükselme meydana gelir bu durum genellikle sistematik inflamatuvar yanıt olarak kullanılır. IL-6'nın salgılanmasındaki en önemli etki IL-1 ve TNF- α seviyeleridir. IL-4, IL-10 ve IL-13 ise IL-6'nın baskılanmasına neden olur.⁶² IL-6 molekülü 20 kd ağırlığındadır ve molekül şekli dörtlü alfa heliks yapıda küçük bir polipeptit şeklindedir. Yapısal stabilizasyonu moleküller arası disülfat bağlarıyla gerçekleşir.⁶³

2.4.3. İnterlökin 8

İnterlökin 8 endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, periferik kan mononükleer hücreleri tarafından sentezlenir. Sentezlenmesinde IL-1 ve TNF- α seviyeleri önemli rol oynar. En önemli görevi inflamasyonlar esnasında inflamasyon bölgesine nötrofillerin çekilmesine aracılık eder.⁶⁴ İnflamasyonlar esnasında nötrofillerin IL-1 ve TNF tarafından aktifleştirilmesi IL-8 ve ilişkili proteinler sayesinde olur.⁶⁵

2.4.4. Tümör Nekroz Faktör- α

Tümör nekroz faktör α 26 kDa molekül ağırlığına sahip bir transmembran proteindir.⁶⁶ TNF- α makrofajlar, T ve B lenfositler, monositler dendrik hücreler ve doğal öldürücü hücreler tarafından sentezlenir.⁶⁷ TNF- α homeostatik, immün ve inflamatuvar sistemler üzerine etkili önemli bir sitokindir. TNF- α 'nın faydalı homeostatik fonksiyonları arasında; patojenlere karşı savunma, inflamasyonun iyileştirilmesi, lenfoid

organın yapısal gelişimi, doku rejenerasyonu, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, tümör büyümesinin inhibisyonu gösterilebilir. TNF- α 'nın patolojik fonksiyonları arasında ise inflamasyonun tetiklenmesi, vasküler endotelin uyarılması, bağışıklık hücrelerinin poliferasyonu ve doku hasarı gösterilebilir.⁶⁸ Dokularda düşük miktarda bulunan TNF- α patojenlere ve mikroorganizmalara karşı hücre içi savunma mekanizmalarını güçlendirirken yüksek miktarda bulunması inflamasyon ve doku hasarına sebep olur.⁶⁹

70

2.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres temel olarak, hücresel metabolizma esnasında oluşan reaktif oksijen türlerini (ROS) detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucunda ortaya çıkan oksidatif denge bozukluğudur. Oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan ROS'lar hücre içerisindeki çift bağ içeren proteinler, yağlar, DNA'daki çift bağ içeren bazlara saldırarak bir Hidrojen atomu koparır ve zincirleme oksidasyon reaksiyonları başlatır. Buna bağlı olarak organizmada hücre zedelenmesi veya ölümü gerçekleşir.⁷¹ Serbest radikaller, hücrede endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki farklı şekilde bulunabilirler. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında kimyasal maddeler, ilaç toksifikasyonları, radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı, alkol ve uyuşturucu maddeler gösterilebilir.⁷² Organizmada serbest oksijen radikallerinin vereceği hasara karşı koruyucu antioksidan mekanizma mevcuttur. Antioksidan mekanizmanın endojen ve ekzojen olmak üzere iki alt türü bulunur. Endojen antioksidan mekanizmaya örnek olarak SOD, GSH, Albumin, Transferrin, Bilirubin, Ürat vb. verilebilir. Ekzojen antioksidan mekanizmaya ise Askorbik asit, β -Karoten, Vitamin E örnek verilebilir.⁷³

Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının en önemli göstergesi hücre zarındaki lipid peroksidasyonudur. Sağlıklı dokularda çok az miktarda gerçekleşen lipid peroksidasyonu oksidatif strese maruz kalmış dokularda belirgin miktarda artış

gösterir. Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) dokudaki olası oksidatif strese karşı bize fikir verme konusunda önemli bir parametredir.⁷⁴ Nitrik oksit'in endotoksemiye bağlı doku hasarı üzerine farklı etkileri olmasına karşın yapılan klinik araştırmalarda indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) inhibitörlerinin doku hasarını önlemede etkili olduğu bildirilmiştir. NO, sepsis ve septik şok da gerek oksidan ve antioksidan olarak gerekse inflamatuvar ve antiinflamatuvar olarak hem yararlı hem de zararlı etkileri bildirilmiştir.⁷⁵

Yaptığımız çalışmada, ratlarda Şiga toksinin etkisini gidermek amacıyla kullandığımız rutin etken maddesinin oksidatif stres düzeyleri üzerine etkisini görebilmek için bazı oksidatif stres parametreleri kullandık. Bu parametrelerin genel özellikleri şu şekildedir;

2.5.1. Malondialdehit (MDA)

Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan linolenik ve araşidonik gibi poliansature yağ asitlerinin peroksidasyonu olayıdır. Bu metabolik olay sonucunda biyolojik olarak aktif olan aldehitler ortaya çıkar. Bu aldehitlerden en önemlisi malondialdehit (MDA) molekülüdür. Bu nedenle MDA lipit peroksidasyonunun iyi bir göstergesidir. MDA membran komplementlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyon yaparak membranın esnekliğini ve iyon transport işlevini bozar. Ayrıca DNA'nın nitrojen bazları ile tepkimeye girebilme özelliği sebebiyle mutajenik, toksik ve karsinojenik özellik de gösterir. MDA suda çözünme özelliği nedeniyle bir kısmı idrarla atılabilir. Fakat yapılan çalışmalar da MDA'nın ne kadarının idrarla atıldığı konusunda net bir bilgi yoktur.⁷⁶⁻⁷⁸

2.5.2. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit otokrin ve parakrin hücresel ajandır. NO hem normal fizyolojik durumlarda hem de patofizyolojik durumlarda homeostazın sürdürülmesinde önemli

etkenlerden biridir. NO'nun oluşumu L-argininden sitrulin oluşumu sırasında L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu sonucu gerçekleşir. NO sentez enzimleri yapısal NO sentaz (cNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere iki gruptan oluşur. cNOS endotelde, nöronlarda ve plateletlerde bulunurken iNOS kardiyomiyositler, hepatositler, nöronlar, mikrogial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve kas hücrelerinde bulunur.⁷⁹ NO suda ve yağda çözünebilme özelliğine sahiptir ve yarılanma ömrü 30 saniyedir. NO, nitrit ve nitrata okside olabilen renksiz bir gazdır.⁸⁰ NO bazı durumlarda bir anti-oksidan gibi davranarak lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterirken süperoksit düzeylerinin artması durumunda süperoksitle reaksiyona girerek bir prooksidan olan peroksinitriti oluşturabilir.⁸¹

2.5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD süperoksit serbest radikallerini hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen endojen kaynaklı antioksidan enzimdir. Organizmada 3 tip SOD bulunur. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn-SOD ve üçüncü olarak da Bakır (Cu) içeren ve plazmadaki süperoksitleri metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dur. Süperoksit anyonu (O_2^-) da hidrojen peroksit H_2O_2 gibi çoğu organik bileşik de reaktif değildir fakat daha reaktif ve toksisiteye sahip oksijen türlerinin oluşumuna neden olurlar.^{81, 82}

2.5.4. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH) hücreleri oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyan önemli bir antioksidan maddedir. Karaciğer tarafından sentezlenir. Öncül maddeleri sistein, glutamat ve glisindir. Sentezi sırasında katalizör olarak γ -glutamil sistein sentaz ve GSH sentaz enzimleri rol oynar. GSH fonksiyonel proteinleri ve enzimleri oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı korur. GSH organizmaya giren yabancı maddelerin detoksifikasyonundaki en önemli antioksidandır.^{83, 84}

2.6. Böbrek

Böbrek vücutta; endojen ve ekzojen kaynaklı atık ürünlerinin temizlenmesi, hacim durumunun kontrolü, elektrolit denge, asit baz dengesinin korunması, endokrin salgı ile ilgili işlevler gibi temel vücut fonksiyonlarında rol alan önemli bir organdır.⁸⁵ Özellikle uygulanan terapötik ve diagnostik ajanların eliminasyonu en önemli işlevidir. Böbrek, özellikle tübül lümen membran üzerindeki organik iyon taşıyıcıları lümen içerisindeki filtrelenmiş toksinlerin geri emilimi nedeniyle daha büyük oranda ve daha yüksek konsantrasyonda toksine maruz kalır. Bu nedenle böbrek tübül epitel hücreleri toksin kaynaklı hasara uğrama ihtimali daha yüksektir.⁸⁶

Yaptığımız çalışmada, ratlarda Şiga toksin 2'nin etkisini gidermek amacıyla kullandığımız rutin etken maddesinin böbrek dokusuna verdiği zararı ölçmek amacıyla bazı böbrek fonksiyon parametrelerinden yararlandık bu parametrelerin genel özellikleri şu şekildedir;

2.6.1. Kandaki Üre Azotu

Vücutta proteinlerin yıkımı sonucu ortaya çıkan amonyak toksik bir maddedir. Amonyağın toksik etkisinin giderilmesi (detoksifikasyon) sonucu üre meydana gelmektedir. Ürenin suda çözünme özelliği sayesinde böbrekten süzülerek vücuttan uzaklaştırılması kolaydır. Klinik de böbrek fonksiyonlarının tespiti için üreden ziyade Kandaki Üre Azotu (BUN) kullanılır. BUN kandaki ürenin azot kısımlarını ifade eden terimdir. Buda kandaki ürenin yaklaşık %50'sini ifade eder.⁸⁷

Plazmada BUN seviyesinin artması olası böbrek hasarının göstergesidir. Böbrek hasarının tespitinde BUN seviyesindeki artış tek başına anlam ifade edemeyebilir bu nedenle böbrek hasarıyla ilgili değerlendirme yaparken Kreatinin ile birlikte değerlendirmek daha doğru değerlendirme yapmamızı sağlamaktadır.⁸⁸

2.6.2. Kreatinin

Kreatinin, Fosfokreatin'in dehidrasyonu ve halkalaşması ile kreatinarginin ve glisin aminoasitlerinden sentezlenir. Böbrek fonksiyonlarını ölçmede klinik açıdan serum kreatinin seviyesindeki artış önem arz etmektedir. Fakat serum kreatinin seviyesinin artışı böbrek fonksiyonlarındaki belirgin kayıpla ortaya çıktığı için BUN ile birlikte değerlendirilmesi daha sağlıklıdır.^{88, 89}

2.6.3. Alkalen Fosfataz (ALP)

Başlıca ALP kaynakları karaciğerde safra kanalikülülerini örten hücreler, kemik dokusunda osteoblastlar ve gebelerde plasenta olarak bildirilmiştir.⁸⁸

Aynı zamanda yapılan bazı çalışmalar neticesinde ALP'nin nefrotoksisitenin duyarlı indikatörlerinden birisi olarak bildirilmiştir.⁹⁰

2.6.4. Elektrolit Denge

Total vücut sıvısı yaş ve cinsiyete göre değişmekle birlikte vücut ağırlığının yaklaşık %55-65'ı oranındadır. Total vücut sıvısının 3/4'ü intraselüler, 1/4'ü ise ekstraselüler alanda yer alır. Bu iki alan arasında elektrolit içerik bakımından ciddi farklar vardır. Potasyum (K) baskın olarak intraselüler alanda bulunurken Sodyum (Na) ve Klor (Cl) ekstraselüler alanda bulunur.⁹¹

Böbrek fonksiyonlarının bozulmanın tespitinde bir diğer önemli yöntem ise elektrolit dengenin bozulması sonucu ortaya çıkan hiperpotasemi, metabolik asidoz, hipokalsemi ve hiperfosfatemidir. Üremik birikimine bağlı olarak ortaya çıkan elektrolit dengesizlikler, biyokimyasal değişikliklerin derecesine ve hastanın kişisel duyarlılığına bağlı değişken semptomlar gösterebilir. Bu semptomlara örnek olarak; hipokalsemiye bağlı kasılmalar, üremiye bağlı bulantı ve kusma verilebilir. Bunların içerisinde hayati tehlikeye sebep olan en önemlisi hiperpotasemidir. Çoğunlukla asemptomik olan hiperpotasemi bazı durumlarda kas paralizi ve aritmi semptomları verebilir.⁹²

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmanın tüm deneysel içerikli uygulamaları ve işlem basamakları Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 19. 04. 2016 tarih ve 2 sayılı oturumunda belirtilen Etik Kurul Raporunun 36 nolu kararı ile onaylandı (Ek 2).

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma merkezinden temin edilen, 8 haftalık, yaklaşık 200 gr ağırlığında, Sprague-Dawley tipi erişkin 40 adet erkek rat kullanıldı. Tüm hayvanlar, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık deney hayvanları ünitesi ortamında, %55-60 nem oranı ve 22 °C oda sıcaklığında bakım ve standart pelet yem ile beslenmeye tabi tutuldu. Deneyler süresince etik kurallara özen gösterilmiştir.

3.2. Kullanılan Etken Madde ve Dozları

Şiga Toksin 2: Ürün List Biological Laboratories firmasından temin edildi. Ürün hazırlanana kadar -80 °C muhafaza edildi. Ürünün hazırlanması üretici firmanın belirttiği şekilde; 10µg'lık toz halindeki Şiga toksin 2, 100 µl'lik (0.005 M Tris, 0.01 M NaCl, %0.01 Trehalose pH 7,5) proteinli su çözeltisi içerisinde hazırlandı. Ürünü kullanabileceğimiz konsantrasyona indirmek amacıyla yukarda belirttiğimiz proteinli su çözeltisi kullanarak 1 ml proteinli su içerisinde 20 ng Şiga toksin 2 olacak şekilde seyrelttik.

Rutin: Ürün Sigma Chemical Company firmasından temin edildi. Ürünü kullanım amacımıza uygun olarak 50 mg/kg ve 100 mg/kg konsantrasyonları hazırlandı. Çözeltimiz distile suyun içerisinde rutini çözündürme şeklinde hazırlanmıştır.

Çözeltilimizin tam homojenizasyonunu sağlamak amacıyla az bir miktar ısıtma işlemi uygulanmıştır. Enjeksiyon işlemini pratik hale getirebilmek için 50 mg/kg'lık konsantrasyonda rutin hazırlarken 1 ml çözeltide 10 gr rutin olacak şekilde, 100 mg/kg'lık konsantrasyonda ise 1 ml çözeltide 20 gr rutin olacak şekilde ayarlama yapıldı.

Ketamine hydrochloride ve xylazine: Ürünler Sigmadan temin edildi. Ratları anestezi altına almak için 75 mg/kg ketamine hydrochloride ve 15 mg/kg xylazine kullanıldı.

3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Buzdolabı poşeti: Dokuların buzdolabında saklanması için kullanıldı.

Buzdolabı: Kimyasal maddelerin muhafaza edilmesi için kullanıldı.

Derin dondurucu: Kimyasal maddelerin ve ratlardan alınan doku ve kan örneklerinin muhafazası için kullanıldı.

Enjektörler: Kan alımı ve enjeksiyonlarda kullanıldı.

Eppendorf tüpleri: Kan örneklerinden alınan plazmanın muhafazası için kullanıldı.

Erlen: Kimyasal maddelerin hazırlanması için kullanıldı.

Etüv: Cam malzemelerin kurutulması ve steril edilmesi için kullanıldı.

Gavaj iğnesi: Ratara intragastrik enjeksiyon yapmak için kullanıldı.

Hassas terazi: Kimyasal maddeleri tartmak için kullanıldı.

Homojenizatör: Ratlardan alınan böbrek dokusunun homojenizasyonu işleminde kullanıldı.

Isıticılı manyetik karıştırıcı: Rutinin hazırlanması için kullanıldı.

Kan tüpleri: Ratlardan kan örneklerinin alınması, santrifüj edilmesi, saklanması için kullanıldı.

Makas: Diseksiyon için kullanıldı.

Manyetik karıştırıcı: Çözeltilerin hazırlanmasında kullanıldı.

Mikroskop: Ratlardan alınan böbrek dokusunun patolojisini incelemek için kullanıldı.

Otoanalizör: Ratlardan alınan kan örneklerinin çalışılması için kullanıldı.

Otomatik pipetler: Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin hassas bir şekilde hazırlanması için kullanıldı.

Pens: Diseksiyon için kullanıldı.

pH metre: Kimyasal maddelerin hazırlanmasında kullanıldı.

Saf su cihazı: Çözeltilerin hazırlanması için gerekli olan saf suyun temininde kullanıldı.

Santrifuj: Ratlardan alınan doku ve kan örneklerinin serum ve süpernatant örneklerinin ayrılması için kullanıldı.

Soğutmalı Santrifüj: Ratlardan alınan doku örneklerinin uygun sıcaklıkta serum ve süpernatant örneklerinin ayrılması için kullanıldı.

Spektrofotometre: Ratlardan alınan böbrek dokusunda bazı biyokimyasal parametrelerin çalışılması için kullanıldı.

Vorteks: Kimyasal maddelerin karıştırılması için kullanıldı.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Yapılan Enjeksiyonlar

Çalışmamızda toplamda 5 deney gurubu oluşturuldu. Her grupta 8 hayvan kullanıldı. Deney hayvanlarımızda Hemolitik Üremik Sendrom oluşturmak ve rutinin etkisini araştırmak için şu işlemler gerçekleştirildi;

1. Grup (Kontrol) : Bu grup kontrol gurubu olarak düzenlendi. Bu guruba herhangi bir etken madde uygulanmadı. Fakat stres kaynaklı hataları önleyebilmek amacıyla 6 gün boyunca gavaj iğnesi yardımıyla intragastrik 1ml serum fizyolojik

  zeltisi ve 6. günün sonunda intraperitoneal olarak tek doz 1ml serum fizyolojik çözeltisi enjekte edildi. Gruptaki ratların tamamı 8. günün sonunda  tenazi edildi.

2. Grup (STX) : Bu grup  iga toksin 2 deney gurubu olarak düzenlendi. Deneyimizde daha hassas çalışabilmek amacıyla bu gurubun tüm  yeleri deneye başlamadan önce ve enjeksiyon öncesinde tartıldı ve enjeksiyonlarımız ratların ağırlığına göre yapıldı. Bu guruba rutin uygulaması yapılmadı. Fakat stres kaynaklı hataları önlemek amacıyla 6 gün boyunca gavaj iğnesi yardımıyla intragastrik 1ml serum fizyolojik çözeltisi enjekte edildi. 6. günün sonunda bu gurubun tüm üyelerine ağırlığına göre intraperitoneal olarak tek doz 100 ng/kg  iga toksin 2 enjekte edildi. Gruptaki ratların tamamı 8. günün sonunda  tenazi edildi.

3. Grup (RU50 + STX): Bu grup 50 mg/kg rutin uygulanan tedavi gurubu olarak düzenlendi. Deneyimizde daha hassas çalışabilmek amacıyla bu gurubun tüm  yeleri deneye başlamadan önce ve enjeksiyon öncesinde tartıldı ve enjeksiyonlarımız ratların ağırlığına göre yapıldı. Bu guruba 6 gün boyunca, ağırlığına göre 50 mg/kg rutin gavaj iğnesi yardımıyla intragastrik olarak enjekte edildi. 6. günün sonunda bu gurubun tüm üyelerine ağırlığına göre intraperitoneal olarak tek doz 100 ng/kg  iga toksin 2 enjekte edildi. Gruptaki ratların tamamı 8. günün sonunda  tenazi edildi.

4. Grup (RU100 + STX): Bu grup 100 mg/kg rutin uygulanan tedavi gurubu olarak düzenlendi. Deneyimizde daha hassas çalışabilmek amacıyla bu gurubun tüm  yeleri deneye başlamadan önce ve enjeksiyon öncesinde tartıldı ve enjeksiyonlarımız ratların ağırlığına göre yapıldı. Bu guruba 6 gün boyunca, ağırlığına göre 100 mg/kg rutin gavaj iğnesi yardımıyla intragastrik olarak enjekte edildi. 6. günün sonunda bu gurubun tüm üyelerine ağırlığına göre intraperitoneal olarak tek doz 100 ng/kg  iga toksin 2 enjekte edildi. Gruptaki ratların tamamı 8. günün sonunda  tenazi edildi.

5. Grup (RU100): Bu grup 100 mg/kg rutin uygulanan deney gurubu olarak

düzenlendi. Deneyimizde daha hassas çalışabilmek amacıyla bu gurubun tüm üyeleri deneye başlamadan önce ve enjeksiyon öncesinde tartıldı ve enjeksiyonlarımız ratların ağırlığına göre yapıldı. Bu guruba 6 gün boyunca, ağırlığına göre 100 mg/kg rutin gavaj iğnesi yardımıyla intragastrik olarak enjekte edildi. Bu guruba Şiga toksin 2 uygulaması yapılmadı. Fakat stres kaynaklı hataları önleyebilmek amacıyla 6. günün sonunda intraperitoneal olarak tek doz 1ml serum fizyolojik çözeltisi enjekte edildi. Gruptaki ratların tamamı 8. günün sonunda ötenazi edildi.

3.5. Doku ve Organların Toplanması

Deneye başlamadan 24 saat önce ratlar aç bırakıldı ancak su içmelerine müsaade edildi. Ketamine hydrochloride (75mg/kg) ve xylazine (15mg/kg) ile sedasyon sağlandı. Hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edilip, orta hattan abdomen açıldı.

Kan dokusu intrakardiyak olarak alındı ve jelli biyokimya tüplerine dolduruldu. Kan örnekleri serumlarına ayırmak için santrifüjde 3000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Ayrılan serumlar eppendorf tüplerine alınarak böbrek fonksiyon testleri çalışılana kadar derin dondurucuda -80 °C'de saklandı.

Böbrekler çıkarıldı ve böbreğin bir tanesi histopatolojik çalışmalarda kullanılmak üzere %10'luk formalin solüsyonuna konuldu. Diğer böbrek serum fizyolojik ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutulduktan sonra buzdolabı poşetine konularak IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , MDA, SOD, GSH, NO düzeyleri çalışılana kadar derin dondurucuda -80 °C'de saklandı.

3.6. Doku ve Organların Analiz Edilmesi

Biyokimyasal Analizler:

Atatürk Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda, otoanalizör (Beckman Coulter AU5800) kullanılarak serumda; BUN, kreatinin, Na, K, Cl, ALP analizleri yapıldı.

Böbrek Dokusunda Sitokinlerin Çalışılması

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Laboratuvarlarında, ELISA cihazı (Spektramax Plus 384 Mikroplate reader) kullanılarak Böbrek dokusunda; IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF α analizleri yapıldı.

Böbrek Dokusunun Homojenizasyonu:

Böbrek dokuları -80°C'lik derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra buzlarının çözünmesi beklendi. Daha sonra bistüri yardımıyla kesilerek analiz için uygun homejenizasyon yöntemi uygulamak üzere tartıldı ve tüplere konuldu.

İnterlökin-1 Miktar Tayini:

Bu analiz yapılırken Sunlong firmasından temin edilen Rat Interleukin 1 β Elisa test kiti kullanıldı. Yapılan analizler de Sandwich-ELISA yöntemi kullanıldı. Bu analizde IL-1 β 'nin, IL-1 β 'ye özgü olan Horseradish Peroxidase (HRP) antikoru ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan sarı renk 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çözeltiler;

1. Standart Solüsyon 108 pg/ml
2. Standart Diluent
3. HRP-Konjuge Reaktif
4. Sample Diluent
5. Kromojen Solüsyon A
6. Kromojen Solüsyon B
7. Durdurucu Solüsyon
8. Yıkama Solüsyonu
9. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu

Homojenizasyon:

Dokulardan yaklaşık 20 mg tartarak 200 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonuna (PBS) (pH 7.4) eklenerek homejenizatörde homojenize edildi. Numuneler soğutmalı santrifüj yardımıyla 4°C’de ve 3000xg’ de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantı alındı.

Deneyin Yapılışı:

Standartların seyreltilmesi: 10 adet mikroeliza şerit plakası hazırlandı. 1. ve 2. kuyuya 100 µl 2. Standart Solüsyon ve 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 3. ve 4. kuyuya, sırasıyla 1. ve 2. kuyudan 100 µl çözelti eklendi. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 3. ve 4. kuyudan 50 µl solüsyon atıldı. 5. ve 6. kuyuya sırasıyla, 3. ve 4. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 7. ve 8. kuyuya sırasıyla, 5. ve 6. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 9. ve 10. kuyuya sırasıyla, 7. ve 8. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. Seyreltmeden sonra bütün kuyulardaki toplam hacim 50 µl ve kuyuların konsantrasyonu sırasıyla 72 pg/ml, 48 pg/ml , 24 pg/ml, 12pg/ml ve 6pg/ml şeklinde oldu.

Mikroelisa şerit plakalarından 1 tanesi boş bırakılarak diğerlerine 5 numaralı seyreltme tamponundan 40 µl ve 10 µl numune eklendi. Numuneler kuyu duvarının tabanına değecek şekilde yüklendi ve nazikçe karıştırıldı.

İnkübasyon: Numuneler kapatma plakası membranı ile mühürlenerek 37 °C 30 dakika inkübe edildi.

Seyreltme: Konsantre yıkama solüsyonu 96T için 30 kez 48T için 20 kez distirile su ile seyreltildi.

Yıkama: Dikkatli bir şekilde plakanın zarı kapatıldı. Solüsyon aspire edilerek

yıkama solüsyonuyla tekrar dolduruldu 30 saniye bekletildikten sonra yıkama solüsyonu atıldı. Yıkama işlemi için bu işlem 5 kere tekrar edildi.

Kontrol plakası dışındaki her kuyuya 50 µl HRP konjuge reaktif eklendi.

Yukarda anlatıldığı gibi inkübasyon yapıldı.

Yukarıda anlatıldığı gibi yıkama işlemi yapıldı.

Renklendirme: Her kuyuya 50 µl Chromogen Solution A ve 50 ul Chromogen Solution B eklendi. Nazikçe karıştırılarak 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. Renklendirme işlemi esnasında numuneler ışıktan korundu.

Sonlandırma: Reaksiyonu sona erdirmek için her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Bu işlemden sonra kuyudaki renk maviden sarıya döndü.

Boş olarak ayarladığımız kontrol kuyusunun absorbans değeri sıfır olarak ayarlanarak 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Ölçümlerimiz sonlandırma solüsyonunun eklenmesinden itibaren 15 dakika içerisinde tamamlandı.

Sonuçlar pg/ml cinsinden ve 0.01 pg/ml hassasiyetle hesaplandı.

İnterlökin-6 Miktar Tayini:

Bu analiz yapılırken Sunlong firmasından temin edilen Rat Interleukin 6 Elisa test kiti kullanıldı. Yapılan analizlerde Sandwich-ELISA yöntemi kullanıldı. Bu analizde IL-6’nın, IL-6’ya özgü olan Horseradish Peroxidase (HRP) antikoru ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan sarı renk 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çözeltiler;

1. Standart Solüsyon 180 ng/L
2. Standart Diluent
3. HRP-Konjuge Reaktif
4. Sample Diluent

5. Kromojen Solüsyon A
6. Kromojen Solüsyon B
7. Durdurucu Solüsyon
8. Yıkama Solüsyonu
9. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu

Homojenizasyon:

Dokulardan yaklaşık 20 mg tartarak 200 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonuna (PBS) (pH 7.4) eklenerek homejenizatörde homojenize edildi. Numuneler soğutmalı santrifüj yardımıyla 4°C’de ve 3000xg’ de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantı alındı.

Deneyin Yapılışı:

Standartların seyreltilmesi: 10 adet mikroeliza şerit plakası hazırlandı. 1. ve 2. kuyuya 100 µl 2. Standart Solüsyon ve 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 3. ve 4. kuyuya, sırasıyla 1. ve 2. kuyudan 100 µl çözelti eklendi. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 3. ve 4. kuyudan 50 µl solüsyon atıldı. 5. ve 6. kuyuya sırasıyla, 3. ve 4. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 7. ve 8. kuyuya sırasıyla, 5. ve 6. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 9. ve 10. kuyuya sırasıyla, 7. ve 8. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. Seyreltmeden sonra bütün kuyulardaki toplam hacim 50 µl ve kuyuların konsantrasyonu sırasıyla 120 ng/L, 80 ng/L, 40 ng/L, 20 ng/L ve 10 ng/L şeklinde oldu.

Mikroelisa şerit plakalarından 1 tanesi boş bırakılarak diğerlerine 5 numaralı seyreltme tamponundan 40 µl ve 10 µl numune eklendi. Numuneler kuyu duvarının

tabanına değecek şekilde yüklendi ve nazikęe karıştırıldı.

İnkübasyon: Numuneler kapatma plakası membranı ile mühürlenerek 37 °C 30 dakika inkübe edildi.

Seyreltme: Konsantre yıkama solüsyonu 96T için 30 kez 48T için 20 kez distirile su ile seyreltildi.

Yıkama: Dikkatli bir şekilde plakanın zarı kapatıldı. Solüsyon aspire edilerek yıkama solüsyonuyla tekrar dolduruldu 30 saniye bekletildikten sonra yıkama solüsyonu atıldı. Yıkama işlemi için bu işlem 5 kere tekrar edildi.

Kontrol plakası dışındaki her kuyuya 50 µl HRP konjuge reaktif eklendi.

Yukarda anlatıldığı gibi inkübasyon yapıldı.

Yukarıda anlatıldığı gibi yıkama işlemi yapıldı.

Renklendirme: Her kuyuya 50 µl Chromogen Solution A ve 50 ul Chromogen Solution B eklendi. Nazikęe karıştırılarak 37 °C’de 15 dakika inkübe edildi. Renklendirme işlemi esnasında numuneler ışıktan korundu.

Sonlandırma: Reaksiyonu sona erdirmek için her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Bu işlemden sonra kuyudaki renk maviden sarıya döndü.

Boş olarak ayarladığımız kontrol kuyusunun absorbans değeri sıfır olarak ayarlanarak 450 nm dalga boyunda lęm yapıldı. lęmlerimiz sonlandırma solüsyonunun eklenmesinden itibaren 15 dakika içerisinde tamamlandı.

Sonuçlar ng/L cinsinden ve 1.5 ng/L hassasiyetle hesaplandı.

İnterlökin-8 Miktar Tayini:

Bu analiz yapılırken Sunlong firmasından temin edilen Rat Interleukin 8 Elisa test kiti kullanıldı. Yapılan analizlerde Sandwich-ELISA yöntemi kullanıldı. Bu analizde IL-8’in, IL-8’e özgü olan Horseradish Peroxidase (HRP) antikoru ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan sarı renk 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik

olarak ölçüldü.

Çözeltiler;

1. Standart Solüsyon 2250 pg/ml
2. Standart Diluent
3. HRP-Konjuge Reaktif
4. Sample Diluent
5. Kromojen Solüsyon A
6. Kromojen Solüsyon B
7. Durdurucu Solüsyon
8. Yıkama Solüsyonu
9. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu

Homojenizasyon:

Dokulardan yaklaşık 20 mg tartarak 200 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonuna (PBS) (pH 7.4) eklenerek homejenizatörde homojenize edildi. Numuneler soğutmalı santrifüj yardımıyla 4°C’de ve 3000xg’ de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantı alındı.

Deneyin Yapılışı:

Standartların seyreltilmesi: 10 adet mikroeliza şerit plakası hazırlandı. 1. ve 2. kuyuya 100 µl 2. Standart Solüsyon ve 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 3. ve 4. kuyuya, sırasıyla 1. ve 2. kuyudan 100 µl çözelti eklendi. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 3. ve 4. kuyudan 50 µl solüsyon atıldı. 5. ve 6. kuyuya sırasıyla, 3. ve 4. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 7. ve 8. kuyuya sırasıyla, 5. ve 6. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 9. ve 10. kuyuya sırasıyla, 7. ve 8.

kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. Seyreltmeden sonra bütün kuyulardaki toplam hacim 50 µl ve kuyuların konsantrasyonu sırasıyla 1500 pg/ml, 1000 pg/ml , 500 pg/ml, 250 pg/ml ve 125 pg/ml şeklinde oldu.

Mikroelisa şerit plakalarından 1 tanesi boş bırakılarak diğerlerine 5 numaralı seyreltme tamponundan 40 µl ve 10 µl numune eklendi. Numuneler kuyu duvarının tabanına değecek şekilde yüklendi ve nazıkçe karıştırıldı.

İnkübasyon: Numuneler kapatma plakası membranı ile mühürlenerek 37 °C 30 dakika inkübe edildi.

Seyreltme: Konsantre yıkama solüsyonu 96T için 30 kez 48T için 20 kez distirile su ile seyreltildi.

Yıkama: Dikkatli bir şekilde plakanın zarı kapatıldı. Solüsyon aspire edilerek yıkama solüsyonuyla tekrar dolduruldu 30 saniye bekletildikten sonra yıkama solüsyonu atıldı. Yıkama işlemi için bu işlem 5 kere tekrar edildi.

Kontrol plakası dışındaki her kuyuya 50 µl HRP konjuge reaktif eklendi.

Yukarda anlatıldığı gibi inkübasyon yapıldı.

Yukarıda anlatıldığı gibi yıkama işlemi yapıldı.

Renklendirme: Her kuyuya 50 µl Chromogen Solution A ve 50 ul Chromogen Solution B eklendi. Nazıkçe karıştırılarak 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Renklendirme işlemi esnasında numuneler ışıktan korundu.

Sonlandırma: Reaksiyonu sona erdirmek için her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Bu işlemden sonra kuyudaki renk maviden sarıya döndü.

Boş olarak ayarladığımız kontrol kuyusunun absorbans değeri sıfır olarak ayarlanarak 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Ölçümlerimiz sonlandırma solüsyonunun eklenmesinden itibaren 15 dakika içerisinde tamamlandı.

Sonuçlar pg/ml cinsinden ve 15 pg/ml hassasiyetle hesaplandı.

Tümör Nekroz Faktör α (TNF α) Miktar Tayini:

Bu analiz yapılırken Sunlong firmasından temin edilen Rat TNF- α Elisa test kiti kullanıldı. Yapılan analizlerde Sandwich-ELISA yöntemi kullanıldı. Bu analizde TNF α 'nın, TNF α 'ya özgü olan Horseradish Peroxidase (HRP) antikoru ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan sarı renk 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çözeltiler;

1. Standart Solüsyon 360 ng/L
2. Standart Diluent
3. HRP-Konjuge Reaktif
4. Sample Diluent
5. Kromojen Solüsyon A
6. Kromojen Solüsyon B
7. Durdurucu Solüsyon
8. Yıkama Solüsyonu
9. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu

Homojenizasyon:

Dokulardan yaklaşık 20 mg tartarak 200 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonuna (PBS) (pH 7.4) eklenerek homejenizatörde homojenize edildi. Numuneler soğutmalı santrifüj yardımıyla 4°C'de ve 3000xg' de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantı alındı.

Deneyin Yapılışı:

Standartların seyreltilmesi: 10 adet mikroeliza şerit plakası hazırlandı. 1. ve 2. kuyuya 100 μ l 2. Standart Solüsyon ve 50 μ l Standart Diluent tamponu ilave edilerek

iyice karıştırıldı. 3. ve 4. kuyuya, sırasıyla 1. ve 2. kuyudan 100 µl çözelti eklendi. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 3. ve 4. kuyudan 50 µl solüsyon atıldı. 5. ve 6. kuyuya sırasıyla, 3. ve 4. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 7. ve 8. kuyuya sırasıyla, 5. ve 6. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. 9. ve 10. kuyuya sırasıyla, 7. ve 8. kuyudan 50 µl çözelti koyuldu. Daha sonra 50 µl Standart Diluent tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. Seyreltmeden sonra bütün kuyulardaki toplam hacim 50 µl ve kuyuların konsantrasyonu sırasıyla 260 ng/L, 160 ng/L, 80 ng/L, 40 ng/L ve 20 ng/L şeklinde oldu.

Mikroelisa şerit plakalarından 1 tanesi boş bırakılarak diğerlerine 5 numaralı seyreltme tamponundan 40 µl ve 10 µl numune eklendi. Numuneler kuyu duvarının tabanına değecek şekilde yüklendi ve nazıkçe karıştırıldı.

İnkübasyon: Numuneler kapatma plakası membranı ile mühürlenerek 37 °C 30 dakika inkübe edildi.

Seyreltme: Konsantre yıkama solüsyonu 96T için 30 kez 48T için 20 kez distirile su ile seyreltildi.

Yıkama: Dikkatli bir şekilde plakanın zarı kapatıldı. Solüsyon aspire edilerek yıkama solüsyonuyla tekrar dolduruldu 30 saniye bekletildikten sonra yıkama solüsyonu atıldı. Yıkama işlemi için bu işlem 5 kere tekrar edildi.

Kontrol plakası dışındaki her kuyuya 50 µl HRP konjuge reaktif eklendi.

Yukarda anlatıldığı gibi inkübasyon yapıldı.

Yukarıda anlatıldığı gibi yıkama işlemi yapıldı.

Renklendirme: Her kuyuya 50 µl Chromogen Solution A ve 50 ul Chromogen Solution B eklendi. Nazıkçe karıştırılarak 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.

Renklendirme işlemi esnasında numuneler ışıktan korundu.

Sonlandırma: Reaksiyonu sona erdirmek için her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Bu işlemden sonra kuyudaki renk maviden sarıya döndü.

Boş olarak ayarladığımız kontrol kuyusunun absorbans değeri sıfır olarak ayarlanarak 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Ölçümlerimiz sonlandırma solüsyonunun eklenmesinden itibaren 15 dakika içerisinde tamamlandı.

Sonuçlar ng/L cinsinden ve 2.8 ng/L hassasiyetle hesaplandı.

Böbrek Dokusunda Oksidatif Stres Parametrelerinin Çalışılması

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Laboratuvarlarında, ELISA cihazı (Spektramax Plus 384 Mikroplate reader) kullanılarak Böbrek dokusunda; TBARS, SOD, GSH ve NO analizleri yapıldı.

Böbrek Dokusunun Homojenizasyonu:

Böbrek dokuları -80°C'lik derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra buzlarının çözünmesi beklendi. Daha sonra bistüri yardımıyla kesilerek analiz için uygun homejenizasyon yöntemi uygulamak üzere tartıldı ve tüplere konuldu.

Malondialdehit (MDA) Miktar Tayini:

Bu analiz yapılırken Bioassay firmasından temin edilen Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) test kiti kullanılarak klorometrik ölçüm yapıldı. Bu analizde TBARS ile Tiyobarbitürik Asitin (TBA) reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renk 535 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çözeltiler;

1. Standart Solüsyon 6M MDA
2. TBA Reaktifi
3. 10% Trichloroacetic acid (TCA)
4. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu

Örnek Hazırlama ve Homojenizasyon:

Dokulardan yaklaşık 20 mg tartarak 200 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonuna (PBS) (pH 7.4) eklenerek homejenizatörde homojenize edildi. Karışım vorteks yardımıyla homojenize edildi. Karışımdan 100 µl alınarak boş bir eppendorf tüpüne konuldu ve üzerine 200 µl PBS eklenerek vortekslendi. Her örnekten 100 µl alınarak boş bir eppendorf tüpüne konuldu ve üzerine 200 µl 10% TCA eklendi ve 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Numuneler soğutmalı santrifüj yardımıyla 4°C’de ve 14000xg’ de 5 dakika santrifüj edilerek 200 µl süpernatant alınarak boş bir eppendorf tüpüne konuldu. Son duruda seyreltme faktörü 3 olmuştur.

Standartların Hazırlanması:

6 M MDA Standart solüsyonumuz homojen hale getirmek için bir miktar santrifüj edildi. Daha sonra içerisinden 4 µl alınarak 2396 µl distirile su ile karıştırılarak konsantrasyonu 10 mM MDA haline dönüştürüldü. Ardından 10 mM MDA solüsyonundan 3 µl alınarak 997 µl distirile su ile karıştırılarak 30 µM solüsyon hazırlandı. 4 farklı seyreltilmiş konsantrasyonu kullanılmak üzere aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi seyreltildi.

Tablo 3.1. MDA Standart Solüsyonları

No	30 µM MDA+H ₂ O	Toplam Miktar(µl)	MDA(µM)
1	300 µl + 0 µl	300	30
2	180 µl + 120 µl	300	18
3	90 µl + 210 µl	300	9
4	0 µl + 300 µl	300	0

Her solüsyondan 200 µl eppendorf tüplerine dolduruldu. Daha sonra her standart

ve numunenin bulunduğu eppendorf tüplerine 200 µl TBA reaktifi konularak vorteksle iyice karıştırıldı. Tüpler 100 °C 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüpler oda sıcaklığına gelmesi için bir miktar bekletildi ve daha sonra tüpler kısa bir süre vorteksle karıştırıldı. Tüplerden 100 µl alarak Elissa cihazına yüklendi ve 535nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

Sonuçların Hesaplanması

Tüm standart ve numunelerin absorbans değerleri belirlendi ve daha önceden belirlenmiş olan boş küvetin absorbans değeri bu değerlerden çıkarılarak numune ve standartların gerçek absorbans değerleri bulundu. Absorbans değerleri standart değerlere göre değerlendirildi ve standart eğrinin eğimi belirlendi. Aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılarak değerler kaydedildi.

$$[TBARS]=((R_{Numune}-R_{Boş\ Küvet})/(Eğim\ (\mu M^{-1})) \times n\ (\mu M\ MDA\ eşdeğeri)$$

RNumune: Numunenin 535 nm deki absorbans değeri

RBoşKüvet: İçinde su bulunan 535 nm deki absorbans değeri

n: Seyreltme faktörü

Sonuçlar nmol/gr protein cinsinden kaydedildi.

Süperoksit Dismutaz (SOD) Miktar Tayini:

Bu analiz yapılırken Cayman firmasından temin edilen Superoxide Dismutase (SOD) Assay test kiti kullanılarak klorometrik ölçüm yapıldı. Bu analizde tetrazolyum tuzlarından faydalanılarak ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından oluşturulan süperoksit radikallerinin tespiti 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çözeltiler;

1. Deney Tamponu
2. Numune Tamponu

3. Radikal Dedektör
4. SOD Standarttı
5. Ksantin Oksidaz

Örnek Hazırlama ve Homojenizasyon:

Dokulardan yaklaşık 20 mg tartarak 200 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonuna (PBS) (pH 7.4) eklenerek homejenizatörde homojenize edildi. Her gram doku için 70 mM sükroz, 210 mM manitol, 1mM EGTA içeren 5-10 ml soğuk 20mM HEPES tamponu içerisinde homojenize edildi. Soğutmalı santrifüj yardımıyla 4 °C ‘de 5 dakika boyunca 1500xg ‘de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak analize alındı.

Standartların Hazırlanması:

20 µl SOD standarttı, SOD stok çözeltisi elde edebilmek için 1,98 ml numune tamponu ile seyreltildi. 7 adet çam test tüpü alınarak A-G arası numaralar verildi. SOD stoku ve örnek tampon miktarı aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi ayarlandı.

Tablo 3.2. Süperoksit Dismutaz Standart Solüsyonları

Tüp	SOD Stoku (µl)	Örnek Tampon (µl)	Final SOD Aktivitesi (U/µl)
A	0	1000	0
B	20	980	0.0005
C	40	960	0.0010
D	80	920	0.0020
E	120	880	0.0030
F	160	840	0.0040
G	200	800	0.0050

Hazırlanan SOD standart plaklara her bir plaka için 10 µl standart ve 200 µl radikal dedektör eklendi. Numune plaklarına ise 200 µl radikal dedektör ve 10 µl numune eklendi. Kullanılan bütün haznelere 20 µl seyreltilmiş ksantin oksidaz ekleyerek reaksiyon başlatıldı. Plaka kapağı kapatılarak birkaç saniye çalkalandı ve oda

sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plakalar 450 nm dalga boyunda absorbands değerleri ölçülerek kaydedildi.

Sonuçların Hesaplanması:

Her standart ve numunenin ortalama absorbands değeri hesaplandı. Standart A'nın absorbandsını kendisine böldük ve linearize değerini (LR) bulmak için standart A'nın absorbandsını diğer bütün standartlara ve numune absorbandsına böldük. (LR Std A = Abs standart A / Abs standart A; Std B = Abs standart LR A / Abs Std B). Bu veriler kullanılarak doğrusallaştırılmış SOD standart oranı belirlendi. Her numunenin linearize değeri yerine geçen standart eğimin linear regresyonundan elde edilen eşitlik kullanılarak numunenin SOD etkinliği hesaplandı.

$$\text{SOD(U/(\mu l))} = [(\text{SampleLR-ykesiti})/\text{eğim}] * (0.023\text{ml}/0.001\text{ ml}) * \text{Seyreltme Miktarı}$$

Sonuçlar U/mg protein cinsinden kaydedildi.

Gulutatyon (GSH) Miktar Tayini:

Bu analiz yapılırken Cayman firmasından temin edilen Gulutatyon (GSH) Assay test kiti kullanılarak klorometrik ölçüm yapıldı. Bu analizde Gulutatyon redüktaz enziminden faydalanılarak gulutatyonun, DTNB (5,5'-dithio-bis-2-(Nitrobenzoik asit) ile tepkimesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşturuldu. TNB miktarı ile GSH miktarı doğru orantılı olduğundan oluşan son ürün 410 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çözeltiler;

1. GSH MES (2X) Tamponu
2. GSSG Standardı
3. GSH Eş Faktör Karışımı
4. GSH Enzim Karışımı
5. GSH DTNB

Örnek Hazırlama ve Homojenizasyon:

Dokulardan yaklaşık 20 mg tartarak 200 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonuna (PBS) (pH 7.4) eklenerek homejenizatörde homojenize edildi. Her gram doku için 5-10 ml soğuk tampon (50 mM MES ve fosfat, 1 mM EDTA, pH 6-7) içerisinde homojenize edildi. Soğutmalı santrifüj yardımıyla 4 °C ‘de 10 dakika boyunca 10000xg ‘de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak analize alındı.

Standartların Hazırlanması:

7 adet çam test tüpü alınarak A-G arası numaralar verildi. GSSG standardı ve MES tamponu miktarı aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi ayarlandı.

Hazırlanan standartlar plaklara her bir plaka için 50 µl standart olacak şekilde yerleştirildi. Örnek plakalarının her birine 50 µl numene eklendi. Plakaların üzeri plaka kapağı ile kapatıldı. 20 ml şişe içerisinde şu reaktifler kullanılarak deney karışımı

Tablo 3.3. Gulutasyon Standart Solüsyonları

Tüp	GSSG Standardı (µl)	MES Tamponu (µl)	Final Konsantrasyonu (mM GSSG)	Eşdeğer Toplam GSH (µM)
A	0	500	0	0
B	5	495	0.025	0.05
C	10	490	0.05	1.0
D	20	480	1.0	2.0
E	40	460	2.0	4.0
F	80	420	4.0	8.0
G	120	380	6.0	12.0
H	160	340	8.0	16.0

hazırlandı; MES tamponu (11.25 ml), yeniden yapılandırılmış kofaktör karışımı (0.045 ml), yeniden yapılandırılmış enzim karışımı (2.1 ml), su (2.3 ml) ve sulandırılmış

DTNB (0.045 ml). Plaka kapağı kaldırılarak çok uçlu pipet yardımıyla numuneler ve standartları içeren plakaların her birine yeni hazırlanmış deney karışımından 150 µl eklenerek yeni bir plaka kapağı yardımıyla kapatıldı. 25 dakika karanlık bir ortamda çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra 410 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedildi.

Sonuçların Hesaplanması:

Her standart ve numunenin ortalama absorbans değeri hesaplandı. Düzeltilmiş absorbans değerini bulmak için A standardının absorbans değeri hem kendisinden hem de diğer standartların absorbans değerlerinden çıkarıldı. Toplam GSH değerinin düzeltilmiş absorbans değerinin grafiği çizildi. Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplama yapıldı.

$$\text{Toplam GSH} = [(410 \text{ nm absorbans} - \text{ykesiti}) / \text{eğim}] * \text{Seyreltme Miktarı}$$

Sonuçlar µmol/g protein cinsinden kaydedildi.

Nitrik Oksit (NO) Miktar Tayini:

Bu analiz yapılırken Cayman firmasından temin edilen Nitrat/Nitrit Klorometrik Assay test kiti kullanılarak klorometrik ölçüm yapıldı. NO in vivo olarak kesin olarak tespit edilemediğinden organizmadaki nitrit ve nitratın toplamı olarak kabul edilir. Bu analiz iki basamakta gerçekleştirildi. Birinci aşamada nitrat indirgeyici enzim kullanarak nitrat, nitrite dönüştürüldü. İkinci aşamada ise nitriti koyu mor azo bileşiğe dönüştüren Griess reaktifi eklendi. Bu reaksiyon azodan dolayı 540 nm dalga boyunda fotometrik absorbans ölçümüyle nitrit miktarını doğru ölçmemizi sağladı.

Çözeltiler;

1. Nitrat/Nitrit Deney Tamponu
2. Nitrat Redüktaz Enzimi
3. Nitrat Redüktaz Kofaktörü

4. Nitrat Standardı
5. Nitrit Standardı
6. Griess Reaktifleri R1 ve R2

Örnek Hazırlama ve Homojenizasyon:

Dokulardan yaklaşık 20 mg tartarak 200 ml Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonuna (PBS) (pH 7.4) eklenerek homejenizatörde homojenize edildi. Daha sonra 10000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. 30 kDa molekül ağırlığına göre ayarlanmış ultrafiltreler kullanarak süpernatant filtre edildi. Filtreler kullanılmadan önce ultra safsu ile yıkandı. Süzüntü nitratın nitrite dönüşmesi için 3 saat bekletilerek kullanıldı.

Standartların Hazırlanması:

Nitrat Ölçümü

Hazırlanan nitrat eğrisi numune nitrat+nitrit yoğunluk miktarını ölçmek için kullanıldı. Plakalara 0.09 ml deney tamponu konuldu. Üzerine 0.01 ml seyreltilmiş nitrat standardı eklendi ve karıştırıldı. Oluşan standardın yoğunluğu 200 μ M oldu. Bu standart aşağıda belirtildiği gibi nitrat standart hazırlığı için kullanıldı. Nitratın standart eğrisi aşağıdaki gibi plaka haznelerine reaktiflerin eklenmesiyle hazırlandı.

Tablo 3.4. Nitrat Standart Solüsyonları

Tüp	Nitrat Standardı (μl)	Deney Tamponu (μl)	Final Nitrat Konsantrasyonu (μl)
A1,A2	0	80	0
B1,B2	5	75	5
C1,C2	10	70	10
D1,D2	15	65	15
E1,E2	20	60	20
F1,F2	25	55	25
G1,G2	30	50	30
H1,H2	35	45	35

Boş plakalara 200 µl deney tamponu eklendi. Diğer kalıptaki plakalara ise son hacim 80 µl olacak şekilde numune eklendi. Tüm kuyulara 10 µl enzim kofaktörü eklendi. Daha sonra tüm kuyulara 10 µl Nitrat redüktaz eklendi. Plakalar plaka kapağıyla kapatılarak oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra plakalara 50 µl Griess reaktifi R1 ilave edildi. Ardından 50 µl Griess reaktifi 2 ilave edildi. İstenilen rengin oluşması için 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plakalar Elisa cihazında 540 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

Nitrit Ölçümü

Plakalara 0.09 ml deney tamponu konuldu. Üzerine 0.01 ml seyreltilmiş nitrit standardı eklendi ve karıştırıldı. Oluşan standardın yoğunluğu 200 µM oldu. Bu standart aşağıda belirtildiği gibi nitrit standart hazırlığı için kullanıldı. Nitritin standart eğrisi aşağıdaki gibi plaka haznelerine reaktiflerin eklenmesiyle hazırlandı.

Tablo 3.5. Nitrit Standart Solüsyonları

Tüp	Nitrit Standardı (µl)	Deney Tamponu (µl)	Final Nitrit Konsantrasyonu (µl)
A1,A2	0	100	0
B1,B2	5	95	5
C1,C2	10	90	10
D1,D2	15	85	15
E1,E2	20	80	20
F1,F2	25	75	25
G1,G2	30	70	30
H1,H2	35	65	35

Boş plakalara 200 µl deney tamponu eklendi. Diğer kalıptaki plakalara ise son

hacim 100 µl olacak şekilde numune eklendi. Daha sonra plakalara 50 µl Griess reaktifi R1 ilave edildi. Ardından 50 µl Griess reaktifi 2 ilave edildi. İstenilen rengin oluşması için 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plakalar Elisa cihazında 540 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

Sonuçların Hesaplanması:

Boş plakaların absorbans değerlerini ortalaması alınarak diğer tüm plakaların absorbans değerlerinden çıkarıldı. Nitrit ve nitratın 540 nm de absorbans grafiği çizildi. Nitrit standart eğrisi sadece nitrit saptaması için kullanılmışken nitrat standart eğrisi hem nitrit hem de nitrat saptaması için kullanılmıştır. Hesaplama aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Nitrat+Nitrit (NO)}(\mu\text{M}) = (\text{A540-y eksen eğimi}) (20\mu\text{l üzerinde kullanılan örnek hacmi}) \times \text{seyreltme miktarı}$$

Sonuçlar mg/dl cinsinden kaydedildi.

Böbrek Dokusunun Histopatolojisinin Çalışılması

Yapılan nekropsi sonucu histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan dokular %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildikten sonra, akan çeşme suyunda 10 saat yıkandı. Ardından dokular alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra parafinde bloklara gömüldü. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alınıp lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Leica DM 1000, Germany). Işık mikroskopunda incelenen kesitler lezyonlara göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilip resimleri çekildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 17 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde One Way ANOVA ve

Tukey testi uygulandı. Değerler, ortalama $\pm$ SD olarak verildi. $p<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.



4. BUGULAR

Şıga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozuma maruz bırakılarak Hemolitik Üremik Sendrom oluşturduğumuz ratlarda rutin etken maddesinin 100 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarının, BUN, Kreatinin, Alkalen Fosfataz, Na, K, Cl, GSH, MDA, SOD, NO, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 düzeyleri ve böbrek histopatolojisi üzerine protektif etkisi incelendi.

4.1. Böbrek Biyokimya Bulguları

Deney gruplarından elde edilen böbrek biyokimyası ile ilgili parametreler Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Şıga Toksin 2'nin 100 ng/kg Dozu Uygulanan Ratlarda, Rutin Etken Maddesinin 50 mg/kg Ve 100 mg/kg Dozlarının Böbrek Biyokimya Parametreleri Üzerine Protektif Etkisi.

Böbrek Biyokimya Parametreleri						
Deney Grupları	Kreatin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	ALP (U/L)
Kontrol	0.018 $\pm$ 0.004 ^a	25.14 $\pm$ 1.17 ^a	140.06 $\pm$ 1.5 ^a	5.1 $\pm$ 0.06 ^a	99.2 $\pm$ 1.6 ^a	416.8 $\pm$ 34.6 ^{ab}
STX	0.029 $\pm$ 0.006 ^b	34.88 $\pm$ 5.07 ^b	146.3 $\pm$ 5.1 ^a	5.4 $\pm$ 0.05 ^a	100.03 $\pm$ 1.8 ^a	476.1 $\pm$ 39.3 ^a
RU50+STX	0.020 $\pm$ 0.005 ^{ab}	30.034 $\pm$ 6.86 ^{ab}	143.3 $\pm$ 4.3 ^a	5.3 $\pm$ 0.04 ^a	100.08 $\pm$ 2.0 ^a	429.5 $\pm$ 27.2 ^{ab}
RU100+STX	0.019 $\pm$ 0.004 ^{ab}	27.75 $\pm$ 4.0 ^{ab}	141.1 $\pm$ 2.1 ^a	5.2 $\pm$ 0.06 ^a	100.04 $\pm$ 2.0 ^a	421.6 $\pm$ 35.9 ^{ab}
RU100	0.020 $\pm$ 0.01 ^a	26.58 $\pm$ 5.5 ^{ab}	140.00 $\pm$ 1.0 ^a	5.1 $\pm$ 0.07 ^a	98.5 $\pm$ 1.5 ^a	395 $\pm$ 25.07 ^b

Tabloda gruplar arasında aynı sütunda farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir n=8 (p<0.05). Şıga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, STX gurubuyla Kontrol gurubunu kreatin seviyelerine göre kıyasladığımızda kreatin düzeyinin STX gurubunda arttığı, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0.05, n=8). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise tedavi gruplarının kreatin seviyesinin azaldığı, bu azalma dikkate değer olsa da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (p>0.05, n=8). Sağlıklı ratlara Rutinin 100 ng/kg

dozunun uygulamasıyla oluşturulan RU100 gurubu ile Kontrol gurubunu karşılaştırdığımızda ise ortaya çıkan sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$, $n=8$).

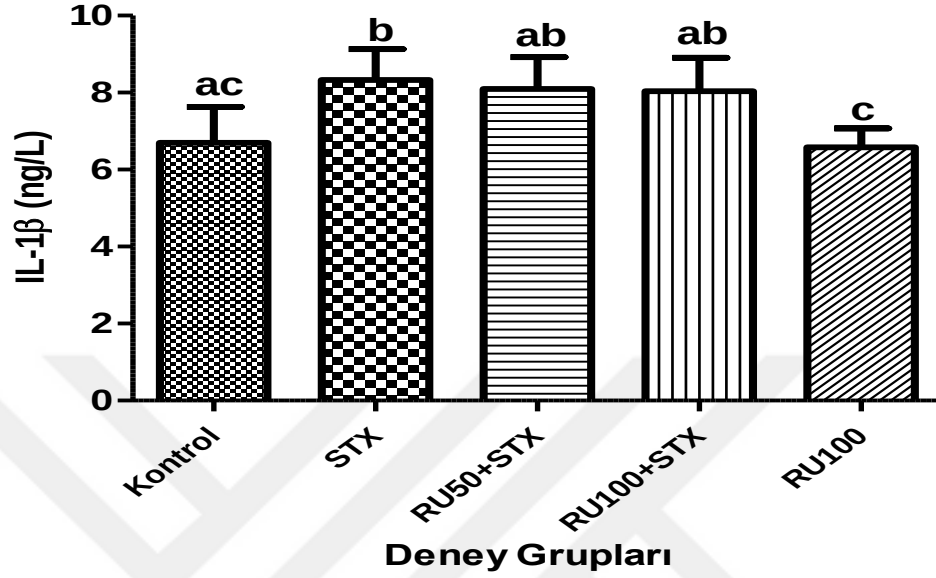
Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, STX gurubu ile Kontrol gurubunu BUN seviyelerine göre kıyasladığımızda STX gurubunda artışın olduğu, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.05$, $n=8$). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise BUN seviyesinin azaldığı, bu azalma dikkate değer olsa da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$, $n=8$). Sağlıklı ratlara Rutinin 100 ng/kg dozunun uygulamasıyla oluşturulan RU100 gurubu ile Kontrol gurubunu BUN seviyelerine göre kıyasladığımızda ise ortaya çıkan sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$, $n=8$).

Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, STX gurubu ile Kontrol gurubunu ALP seviyelerine göre kıyasladığımızda STX gurubunda dikkate değer bir artış olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$, $n=8$). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise ALP seviyesinin azaldığı, bu azalma dikkate değer olsa da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$, $n=8$). Sağlıklı ratlara Rutinin 100 ng/kg dozunun uygulamasıyla oluşturulan RU100 gurubu ile Kontrol gurubunu ALP seviyelerine göre kıyasladığımızda ise RU100 gurubunda azaldığı, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.05$, $n=8$).

Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Na, K ve Cl seviyelerinde deney grupları arasındaki karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanamamıştır ($p>0.05$, $n=8$).

4.2. İnterlökinler ve TNF α Bulguları

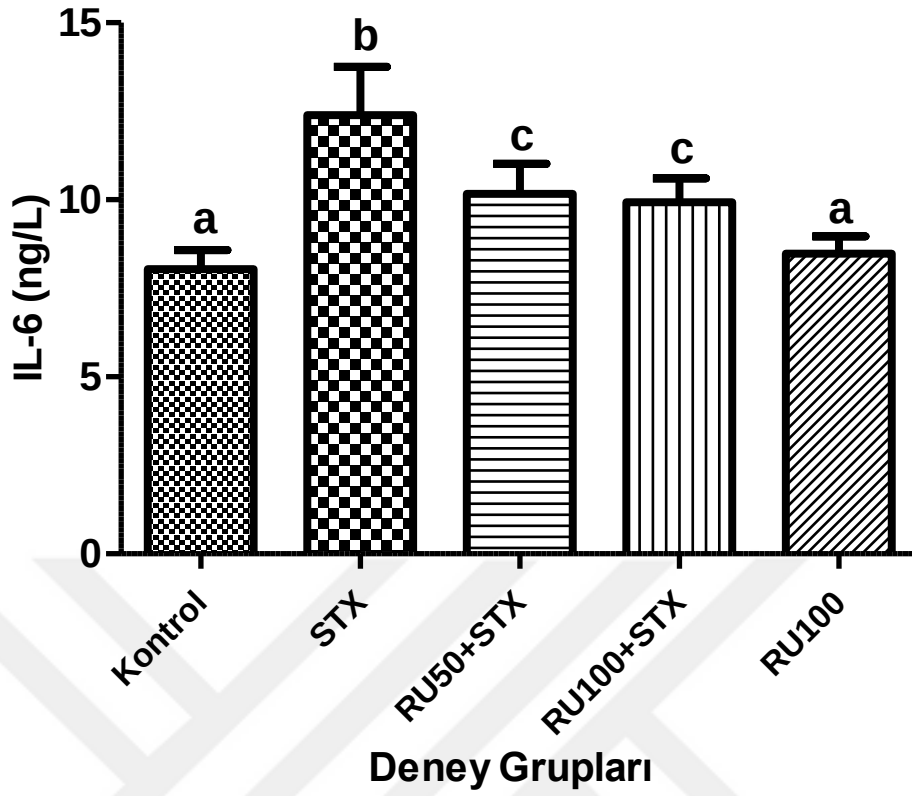
Deney gruplarından elde edilen İnterlökinler ve TNF α ile ilgili parametreler sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Şiga Toksin 2’nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının IL-1 β düzeyi üzerine protektif etkisi.

Şekilde gruplar arasında farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır n=8 (p<0.05).

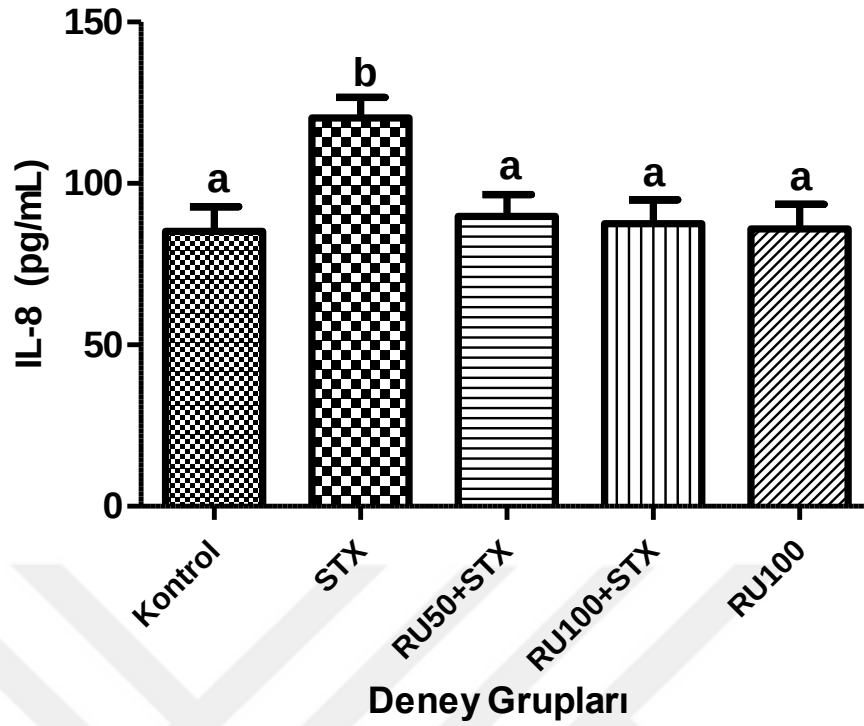
Şiga Toksin 2’nin 100 ng/kg dozu uyguladığımız ratlarda IL-1 β düzeylerini, Kontrol gurubunda 6.7 $\pm$ 0.094 ng/L, STX gurubunda 8.34 $\pm$ 0.081 ng/L, RU50+STX gurubunda 8.1 $\pm$ 0.082 ng/L, RU100+STX gurubunda 8.04 $\pm$ 0.086 ng/L ve RU100 gurubunda 6.58 $\pm$ 0.050 ng/L olarak saptandı. Bu çalışmada IL-1 β düzeyinin, STX gurubunda, Kontrol gurubuna kıyasla arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (p<0.05, n=8). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise, IL-1 β seviyesinde tedavi gruplarında bir azalma saptasak da, bu azalma istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edildi (p>0.05, n=8). RU100 gurubunun IL-1 β seviyesinin Kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05, n=8).



Şekil 4.2. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının IL-6 düzeyi üzerine protektif etkisi.

Şekilde gruplar arasında farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır $n=8$ ($p<0.05$).

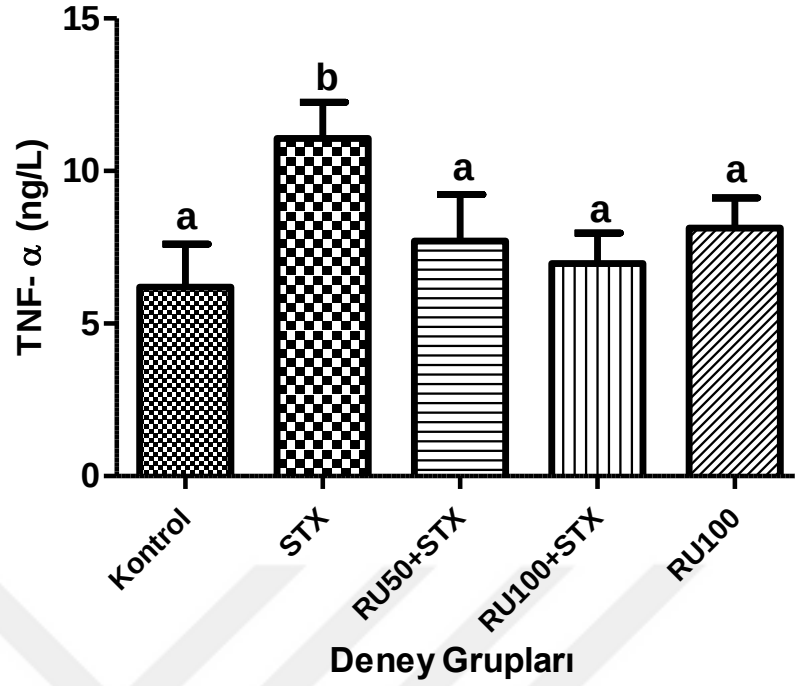
Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uyguladığımız ratlarda IL-6 düzeylerini, Kontrol gurubunda 8.05 ± 0.054 ng/L, STX gurubunda 12.4 ± 1.36 ng/L, RU50+STX gurubunda 10.017 ± 0.085 ng/L, RU100+STX gurubunda 9.93 ± 0.068 ng/L ve RU100 gurubunda 8.48 ± 0.049 ng/L olarak saptandı. Bu çalışmada IL-6 düzeyinin, STX gurubunda, Kontrol gurubuna kıyasla arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $n=8$). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise, IL-6 seviyesinde tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0.05$, $n=8$). RU100 gurubunda ise Kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0.05$, $n=8$).



Şekil 4.3. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının IL-8 düzeyi üzerine protektif etkisi.

Şekilde gruplar arasında farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır $n=8$ ($p<0.05$).

Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uyguladığımız ratlarda IL 8 düzeylerini, Kontrol gurubunda 85.18 ± 7.65 pg/ml, STX gurubunda 120.035 ± 6.36 pg/ml, RU50+STX gurubunda 89.77 ± 6.75 pg/ml, RU100+STX gurubunda 87.5 ± 7.46 pg/ml ve RU100 gurubunda 85.97 ± 7.65 pg/ml olarak saptandı. Bu çalışmada IL-8 düzeyinin, STX gurubunda, Kontrol gurubuna kıyasla arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $n=8$). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise, IL-8 seviyesinin tedavi gruplarında azalarak sağlıklı kontrol gruplarıyla aynı seviyeye düştüğünü ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $n=8$). RU100 gurubunun IL-8 seviyesinde ise Kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0.05$, $n=8$).



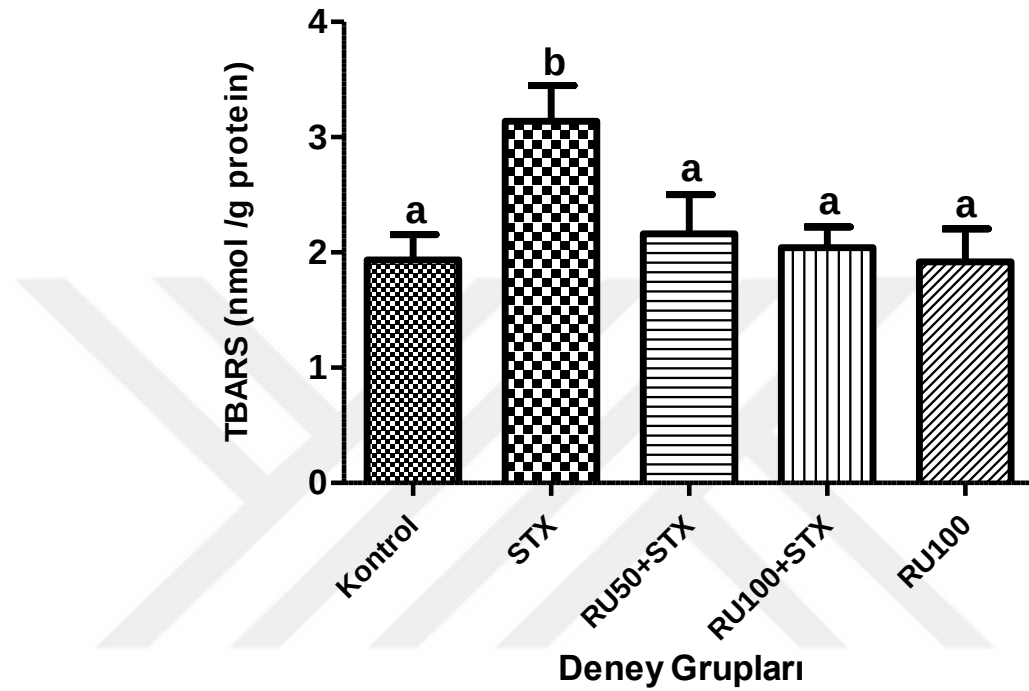
Şekil 4.4. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının TNF- α düzeyi üzerine protektif etkisi.

Şekilde gruplar arasında farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır $n=8$ ($p<0.05$).

Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uyguladığımız ratlarda TNF- α düzeylerini, Kontrol gurubunda 6.20 ± 1.40 ng/L, STX gurubunda 11.07 ± 1.19 ng/L, RU50+STX gurubunda 7.70 ± 1.53 ng/L, RU100+STX gurubunda 6.97 ± 1.00 ng/L ve RU100 gurubunda 8.13 ± 0.099 ng/L olarak tespit edildi. Bu çalışmada TNF- α düzeyinin STX gurubunda Kontrol gurubuna kıyasla arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $n=8$). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise, TNF- α seviyesinin tedavi gruplarında azalarak sağlıklı kontrol gruplarıyla aynı seviyeye düştüğünü ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $n=8$). RU100 gurubunun TNF- α seviyesinde ise Kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0.05$, $n=8$).

4.3. Oksidatif Stres Bulguları

Deney gruplarından elde edilen oksidatif stres ile ilgili parametreler sırasıyla Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8’de verilmiştir.

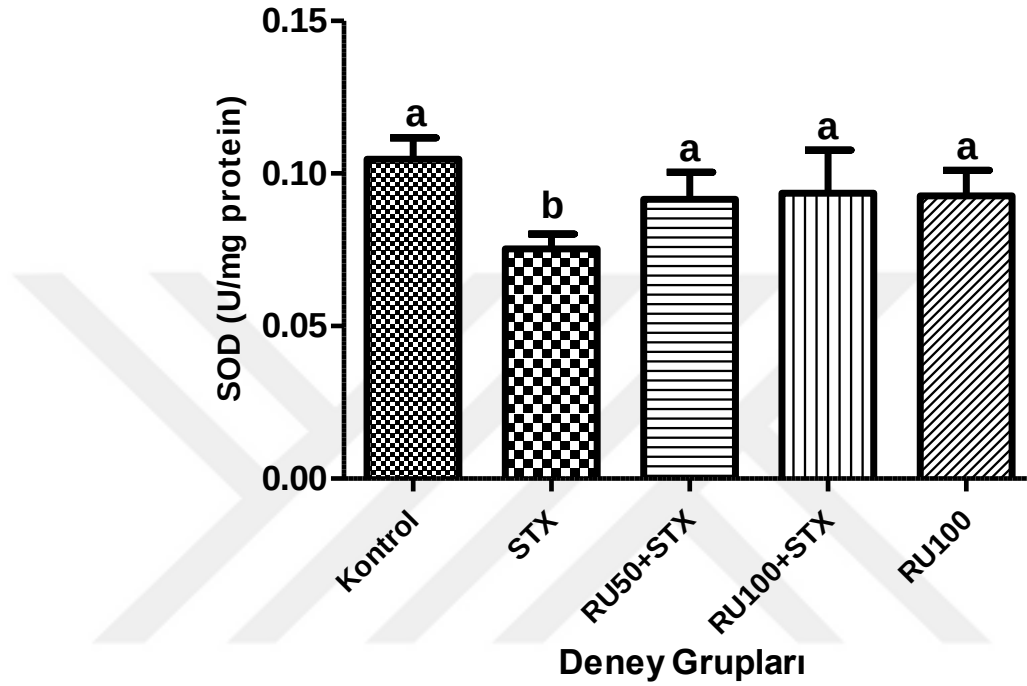


Şekil 4.5. Şiga Toksin 2’nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının MDA (TBARS) düzeyi üzerine protektif etkisi.

Şekilde gruplar arasında farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır n=8 (p<0.05).

Şiga Toksin 2’nin 100 ng/kg dozu uyguladığımız ratlarda MDA (TBARS) düzeylerini, Kontrol gurubunda 1.94 ± 0.022 nmol/g protein, STX gurubunda 3.14 ± 0.031 nmol/g protein, RU50+STX gurubunda 2.16 ± 0.034 nmol/g protein, RU100+STX gurubunda 2.04 ± 0.018 nmol/g protein ve RU100 gurubunda 1.92 ± 0.029 nmol/g protein olarak saptandı. Bu çalışmada MDA (TBARS) düzeyinin STX gurubunda Kontrol gurubuna kıyasla arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (p<0.05, n=8). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve

RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise, MDA (TBARS) seviyesinde tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0.05$, $n=8$). RU100 gurubunda ise Kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanamadı ($p>0.05$, $n=8$).

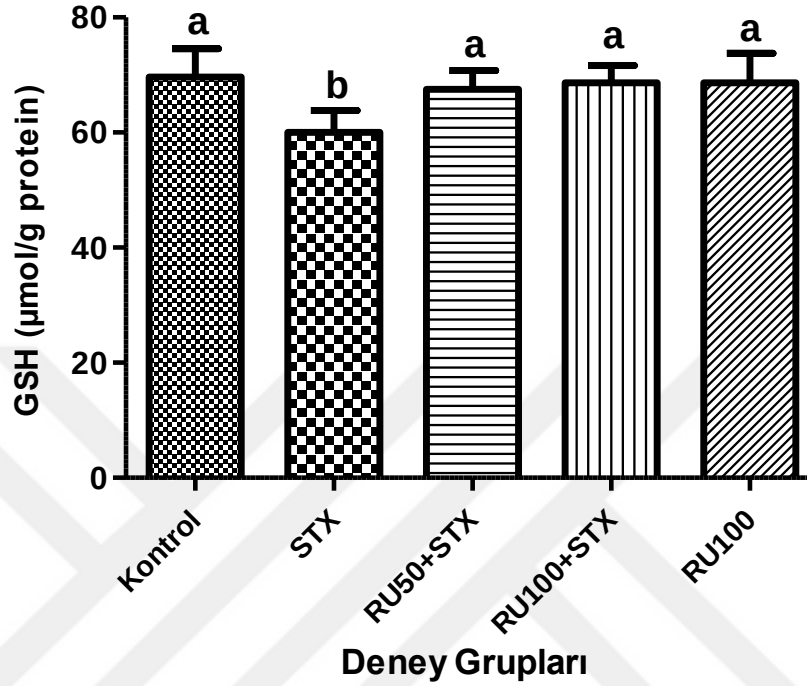


Şekil 4.6. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının SOD düzeyi üzerine protektif etkisi.

Şekilde gruplar arasında farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır $n=8$ ($p<0.05$).

Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uyguladığımız ratlarda SOD düzeylerini, Kontrol gurubunda 0.0105 ± 0.0007 U/mg protein, STX gurubunda 0.0075 ± 0.0005 U/mg protein, RU50+STX gurubunda 0.0091 ± 0.0009 U/mg protein, RU100+STX gurubunda 0.0094 ± 0.0014 U/mg protein ve RU100 gurubunda 0.0093 ± 0.0008 U/mg protein olarak tespit edildi. Bu çalışmada SOD düzeyinin STX gurubunda Kontrol gurubuna kıyasla azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $n=8$). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu

arasında yaptığımızda ise, SOD seviyesinde tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p<0.05$, $n=8$). RU100 gurubunda ise Kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0.05$, $n=8$).

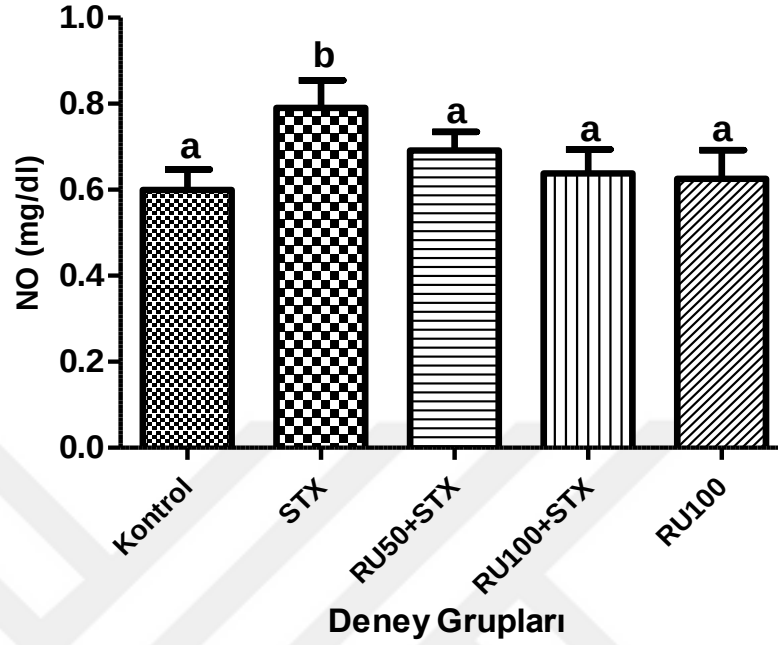


Şekil 4.7. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının GSH düzeyi üzerine protektif etkisi.

Şekilde gruplar arasında farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır $n=8$ ($p<0.05$).

Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uyguladığımız ratlarda GSH düzeylerini, Kontrol gurubunda 69.7 ± 4.9 μmol/g protein, STX gurubunda 60 ± 3.9 μmol/g protein, RU50+STX gurubunda 67.5 ± 3.3 μmol/g protein, RU100+STX gurubunda 68.7 ± 2.9 μmol/g protein ve RU100 gurubunda 68.7 ± 5.1 μmol/g U/mg protein olarak tespit edildi. Bu çalışmada GSH düzeyinin STX gurubunda Kontrol gurubuna kıyasla azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $n=8$). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise, GSH seviyesinde tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir

artış saptandı. ($p<0.05$, $n=8$). RU100 gurubunda ise Kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0.05$, $n=8$).



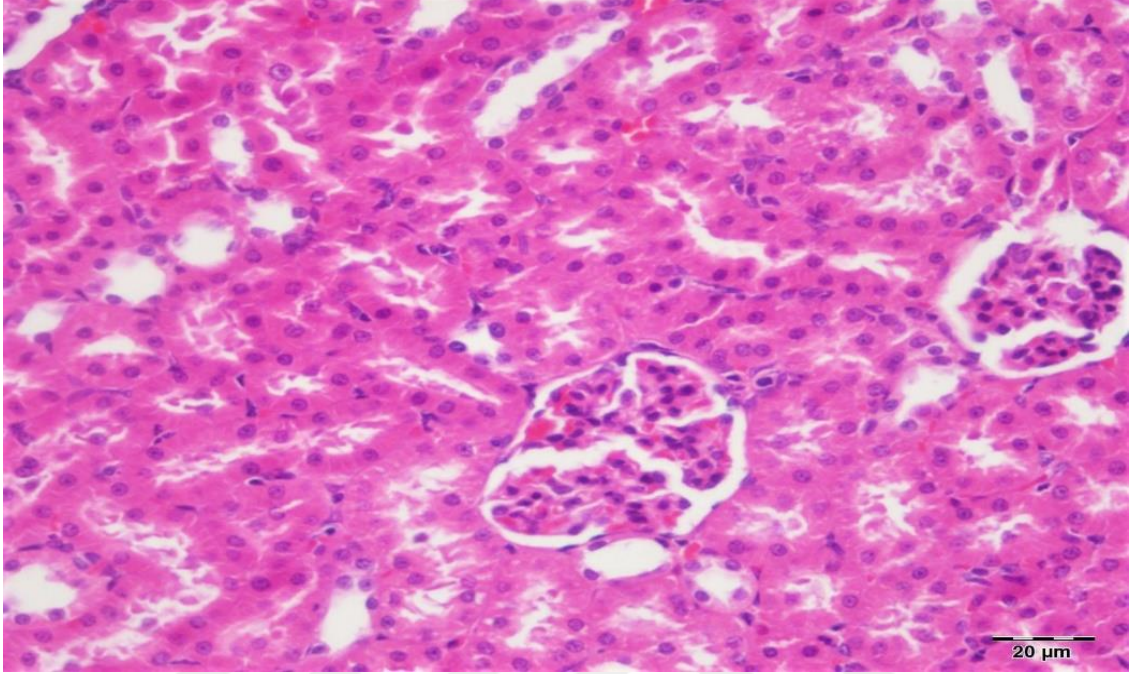
Şekil 4.8. Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan ratlarda, Rutin etken maddesinin 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının NO düzeyi üzerine protektif etkisi.

Şekilde gruplar arasında farklı harflerle belirtilen ortalama değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır $n=8$ ($p<0.05$).

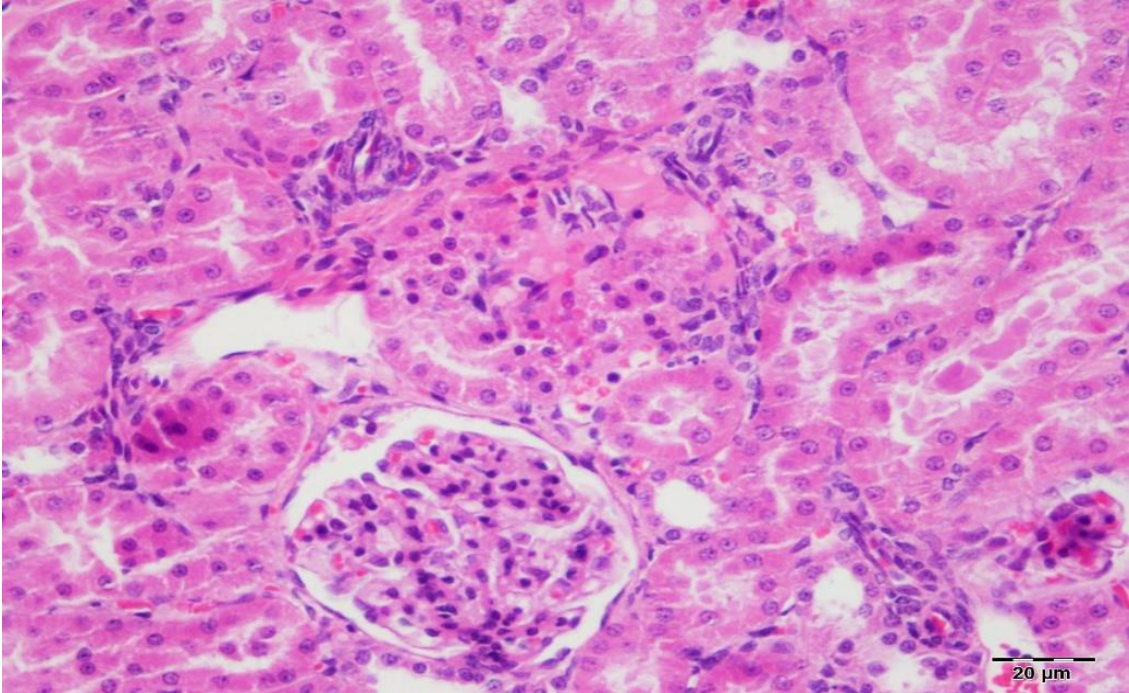
Şiga Toksin 2'nin 100 ng/kg dozu uyguladığımız ratlarda NO düzeylerini, Kontrol gurubunda 0.060 ± 0.005 mg/dl, STX gurubunda 0.079 ± 0.006 mg/dl, RU50+STX gurubunda 0.069 ± 0.004 mg/dl, RU100+STX gurubunda 0.064 ± 0.006 mg/dl ve RU100 gurubunda 0.063 ± 0.007 mg/dl olarak tespit edildi. Bu çalışmada NO düzeyinin STX gurubunda Kontrol gurubuna kıyasla arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $n=8$). Kıyaslamayı tedavi grupları olan RU50+STX ve RU100+STX gruplarıyla STX gurubu arasında yaptığımızda ise, NO seviyesinde tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0.05$, $n=8$). RU100 gurubunda ise Kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0.05$, $n=8$).

4.4. Böbrek Dokusundan Elde Edilen Histopatolojik Bulgular

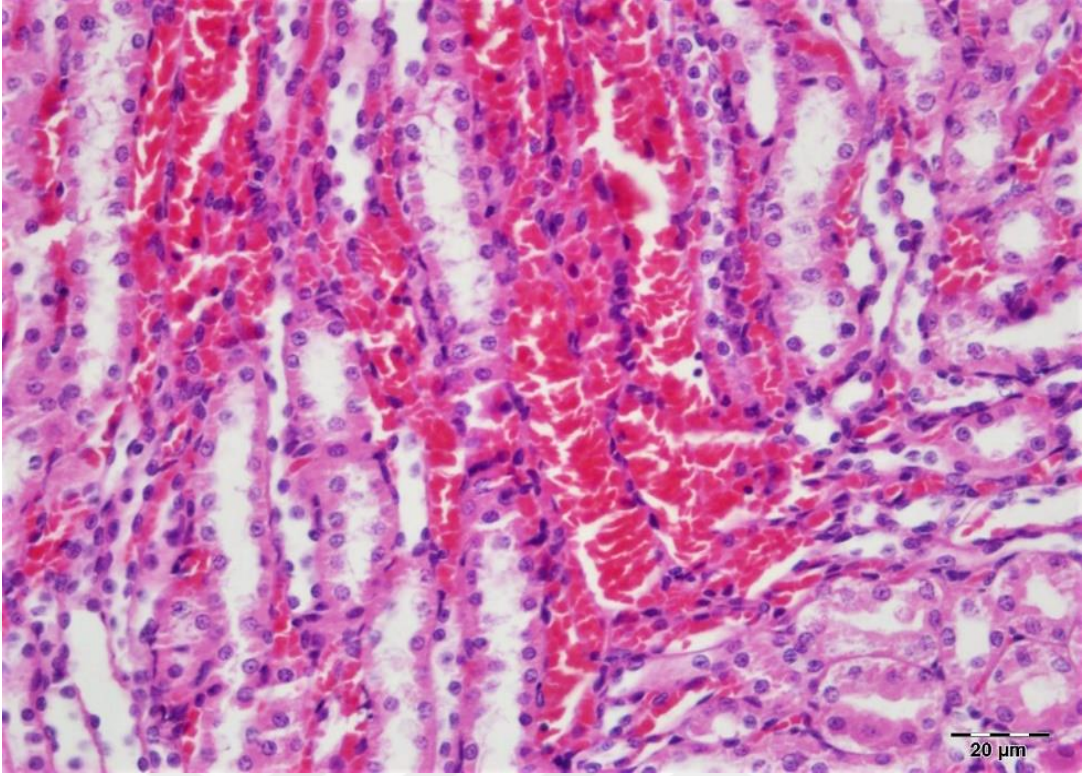
Deney gruplarından elde edilen böbrek dokusu histopatolojik bulguları sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14’de verilmiştir.



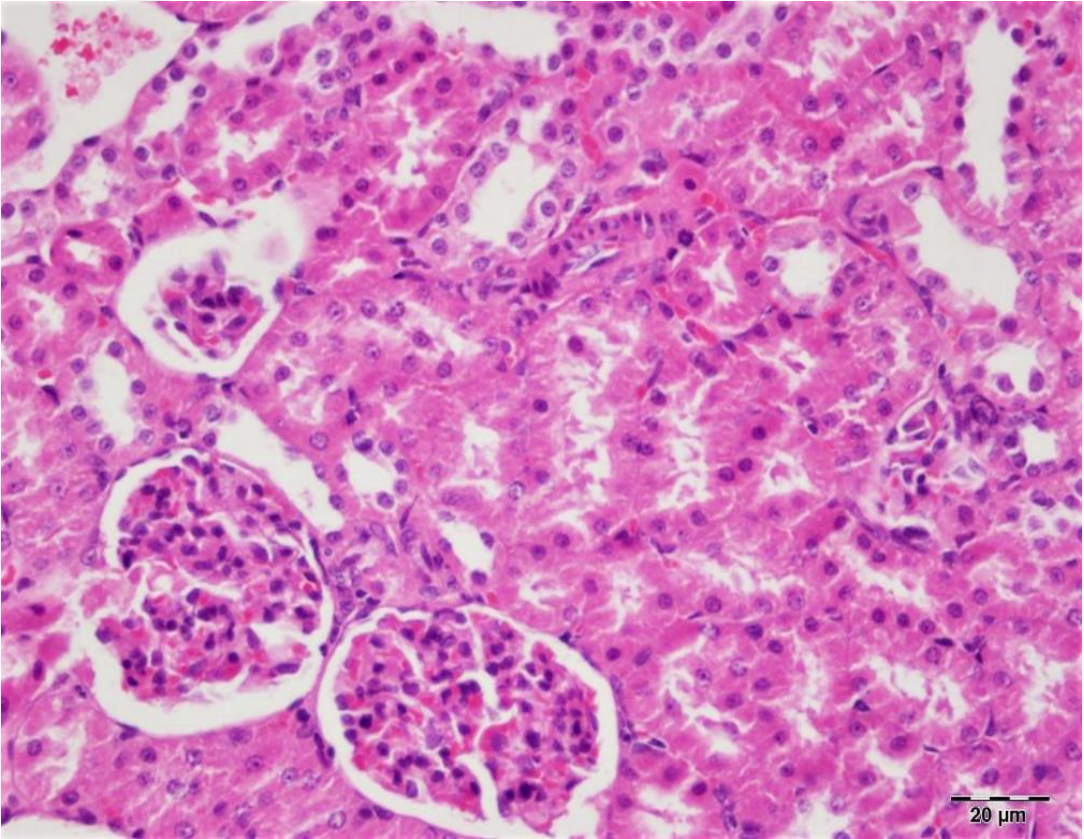
Şekil 4.9. Böbreklerin normal histolojik yapısı, (Kontrol grup, H&E, Bar: 20µm).



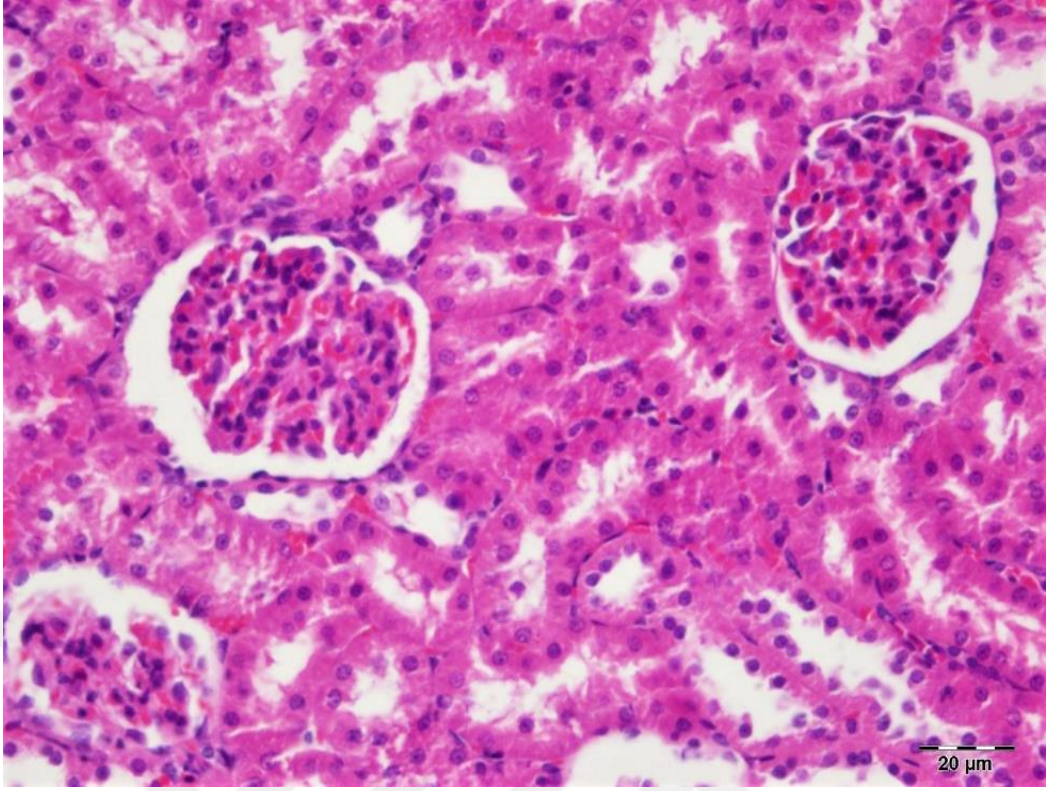
Şekil 4.10. Böbrek korteksinde interstisyel nefrit, (STX grup , H&E, Bar: 20µm).



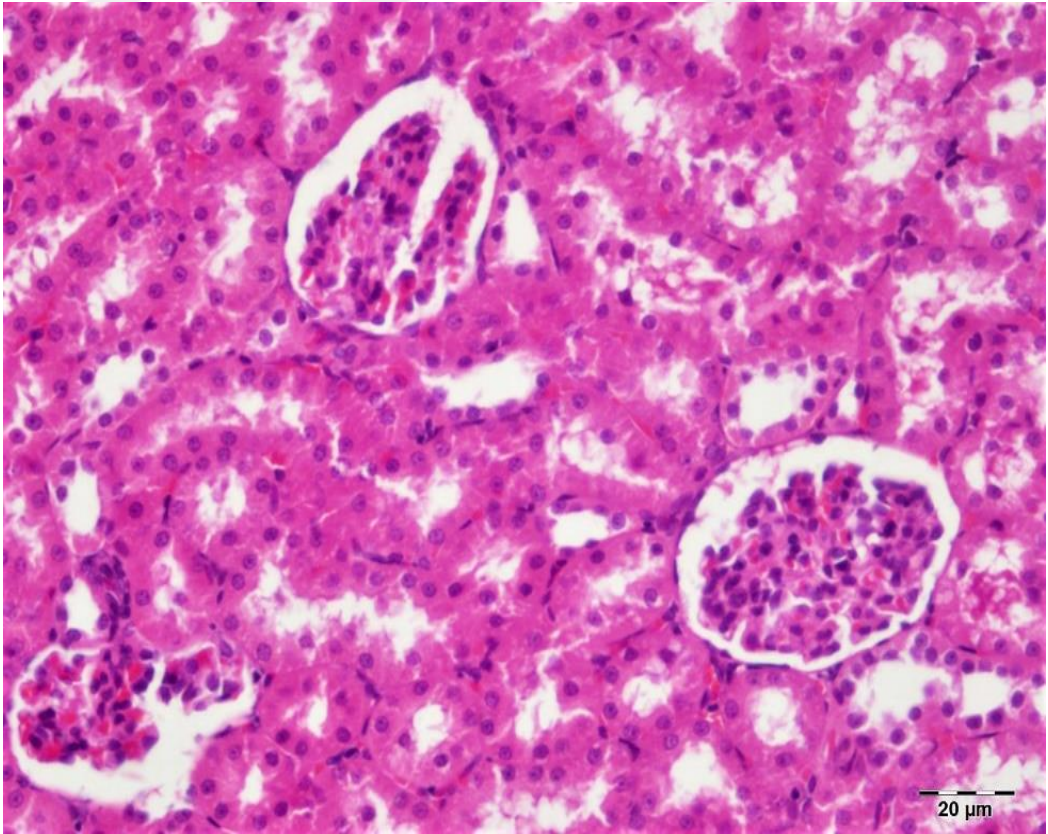
Şekil 4.11. Böbrek medullasında interstisyel nefrit, (STX grup, H&E, Bar: 20µm).



Şekil 4.12. Böbrek dokuları incelendiğinde hafif intersitisyel nefrit, (RU50+STX grup, H&E, Bar: 20µm).



Şekil 4.13. Çok hafif interstisyel nefrit, (RU100+STX grup, H&E, Bar: 20µm).



Şekil 4.14. Böbreklerin normal histolojik yapısı, (RU 100 grup, H&E, Bar: 20µm).

Tablo 4.2. Böbrek Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme. (Işık Mikroskopunda İncelenen Kesitler Lezyonlara Göre Yok (-), Hafif (+), Orta (++) ve Şiddetli (+++).)

Patolojik Lezyonlar	Deney Grupları				
	Kontrol (n=8)	STX (n=8)	RU50+STX (n=8)	RU100+STX (n=8)	RU100 (n=8)
İnterstisyel nefrit	-	+++	++	+	-
Tubul epitellerinde dejenerasyon	-	+++	+++	+	-
Tubul epitellerinde nekroz	-	+++	++	-	-
Hiperemi	-	+++	++	++	-

Kontrol grubundan alınan böbrek dokusu incelendiğinde normal histolojik yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.9). Böbrek medullasında ise benzer bulguların yanı sıra hipereminin ve interstisyel nefritin daha şiddetli olduğu belirlendi (Şekil 4.11). RU50+STX grubundan alınan böbrek dokuları incelendiğinde hafif interstisyel nefrit, tubul epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, damarlarda hiperemi tespit edildi (Şekil 4.12). RU100+STX grubunda çok hafif interstisyel nefrit, tubul epitellerinde hidropik dejenerasyon görülürken hiç nekrotik hücreye rastlanmadı (Şekil 4.13). RU 100 grubunda ise böbrek dokuları incelendiğinde serozasının, korteks ve medullasının normal histolojik yapıya sahip olduğu görüldü (Şekil 4.14). Tablo 4.2’de böbrek dokusunda görülen patolojik lezyonlar düzeyine göre; yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

5. TARTIŞMA

Hemolitik üremik sendrom mikroanjiopatik hemolitik anemi, trombositopeni, akut böbrek hasarı gibi klinik bulgular gösterir. HÜS vakalarının çoğunluğu Şiga toksin üreten *Escherichia coli*’ye (STEC) bağlı olarak gelişir. Özellikle çocukluk çağlarında böbrek kaybı hatta ölüme sebep olan vakalar kaydedilmiştir. HÜS’ün en ağır vakaları Şiga toksin 2’ye bağlı olarak gelişen vakalardır.⁹³ STEC enfeksiyonlarında Şiga toksine bağlı olarak, organizmada oksidatif hasar ve inflamasyonlar meydana geldiği belirtilmiştir.^{7, 94}

Hemolitik üremik sendrom’un fizyolojik ve patolojik etkilerini araştırmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların birçoğu da semptomik bulguların yüksek olması sebebiyle Şiga toksin 2 kullanarak oluşturulan fare modelleri üzerinde yapılmıştır.

Gomez ve ark.⁷ Şiga Toksin 2 Tarafından İn Vivo Olarak İndüklenen Oksidatif Stresin Hemolitik Üremik Sendromun Patojenitesine Etkisi isimli çalışmasında fareler üzerinde Şiga toksin 2’nin 100 ng/kg dozunu kullanarak oluşturduğu HÜS modeli üzerinde çalışmıştır.⁷

Başka bir çalışmada ise Keepers ark.⁹⁴ HÜS’lü Bir Fare Modeli: Lipopolisakkaritli Şiga Toksinin İnsan Böbreklerinde Sebep Olacağı Böbrek Hasarının Fizyolojik Yanıtının Modellenmesi çalışmasında fareler üzerinde Şiga toksin 2’nin 225 ng/kg dozunu kullanarak oluşturduğu HÜS modeli üzerinde çalışmıştır.⁹⁴

Diğer bir çalışmada ise Sauter ve ark.⁹⁵ endotoksinsiz Şiga Toksin 2 ile Oluşturulan Hemolitik Üremik Sendromlu Fare Modelinde Anti-Stx Antikoruyla Ölümcül Etkilerden Korunma isimli çalışmasında fareler üzerinde Şiga toksin 2’nin tek doz 250 ng/kg ve üçer gün arayla üç doz 50 ng/kg dozlarıyla iki ayrı HÜS modeli üzerinde çalışmıştır.⁹⁵

Biz çalışmamızı yaparken Şiga toksinin ölümcül etkilerini azaltıp sonuçlarımızı daha iyi görebilmek amacıyla fareye göre daha dayanıklı olan rat modeli üzerinde çalıştık. Kullandığımız dozu seçerken de yine ölümlerin çalışmamızı etkilemesi maksadıyla ölümcül dozun altında olan 100 ng/kg dozunu tercih ettik.

Böbrek vücuttaki endojen ve ekzojen kaynaklı atık ürünlerin temizlenmesinde rol alan organ olması nedeniyle yüksek miktarda toksik maddeye maruz kalır. Bu nedenle böbrek tübüler epitel hücrelerinin toksin kaynaklı hasara uğrama ihtimali daha yüksektir.^{85, 86} Klinik de böbrek fonksiyonlarının tespiti için kreatin ve BUN önemli iki biyokimyasal parametredir. Bu iki parametre tek başına bir anlam ifade etmese bile ikisi birlikte değerlendirildiğinde böbrek fonksiyonu hakkında bize fikir verebilir.^{88, 89}

Böbrek fonksiyonlarının bozulmanın tespitinde bir diğer önemli yöntem ise elektrolit dengenin bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan hiperpotasemi, metabolik asidoz, hipokalsemi ve hiperfosfatemidir.⁹²

Bu nedenlerle böbrek hasarının tespitinde birçok çalışmada olduğu gibi bizde BUN, kreatinin, Na, K, Cl seviyelerindeki değişimi kullandık.

Yapılan bazı çalışmalarda ALP'nin nefrotoksisiteye duyarlı indikatörlerden birisi olarak bildirilmiştir.⁹⁰ Bu nedenle ALP seviyesinin ölçülmesinin çalışmamıza değer katacağını düşündüğümüzden bu parametreye de çalışmamızda yer verdik.

Sauter ve ark.⁹⁵, endotoksinsiz Şiga toksin 2 ile oluşturulan hemolitik üremik sendromlu fare modelinde Anti-Stx antikoruyla ölümcül etkilerden korunmasına yönelik yaptığı çalışmada deneklerin böbrek fonksiyonlarının çalışıp çalışmadığını BUN ve Kreatin seviyelerine bakarak tespit etmiştir. Bu çalışmayı fareler üzerinde Stx 2'nin tek doz 250 ng/kg ve üçer gün arayla üç doz 50 ng/kg dozlarıyla iki ayrı HÜS modeli üzerinde yapmıştır. Çalışmada 250 ng/kg Stx 2'nin tek doz uygulandığı grup enjeksiyondan 3 gün sonra ötenazi edilip alınan dokularda BUN ve kreatin düzeyleri

alışılmış olup BUN seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$). Kreatin seviyesindeki değişikliğin ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir ($p>0.05$). 50 ng/kg Stx 2'nin  doz uygulandığı gruplar ise 8 gün sonra tenazi edilip alınan dokularda BUN ve kreatin düzeyleri çalışılmış olup BUN seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bildirilmiştir ($p<0.001$). Kreatin seviyelerindeki artış da istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiş istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bildirilmiştir ($p<0.001$).⁹⁵

Keepers ark.⁹⁶ lipopolisakkaritli şiga toksinin insan böbreklerinde sebep olacağı böbrek hasarının fizyolojik yanıtını görmek maksadıyla HS'l fare modeli oluşturulmuştur. Çalışmada bir grup fare üzerinde 225 ng/kg şiga toksin 2 ve 300 g/kg LPS dozları ayrı ayrı ve birlikte farklı gruplara uygulanmış. Bizim çalışmamızla benzerlik gösterdiği için sadece 225 ng/kg şiga toksin 2 uygulanan gurubun enjeksiyondan 72 saat sonra BUN ve kreatin seviyelerini incelediğimizde BUN ve kreatinin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$).⁹⁶

Russo ve ark.⁹⁷ farelerde şiga toksin 2a tarafından oluşturulan ağır toksifikasyonun Anti-Stx2a Monoclonal Antikor (11E10) ile korunmasına yönelik yaptığı çalışmada toksifikasyon gruplarında BUN ve kreatin seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir artışın oluştuğu bildirilmiştir ($p<0.001$). Na, K, Cl seviyelerinde ise değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir($p>0.05$).⁹⁷

Liye Zhu ve ark.⁹⁸ akut toksisiteli sıçan modelinde Okratoksin-A ile oluşturulan böbrek hasarı ile oksidatif stres arasındaki sınırlı bağlantıyı ortaya koymak için çalışma yapmıştır. Bu alışmada Okratoksin-A'nın 1 mg/kg ve 4mg/kg dozları kullanılmış. 1 mg/kg dozu kullanılan grupta kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak sadece BUN seviyesinde belirgin artış olmuşken ($p<0.05$) kreatin ve ALP seviyelerindeki artış istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirtilmiştir ($p>0.05$). Okratoksin-A'nın 4 mg/kg

dozu kullanılan grupta ise kontrol gurubuna kıyasla BUN, kreatin ve ALP seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$).⁹⁸

Apaydın Yıldırım ve ark.⁹⁹ *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *Plicatum*'dan ekstre edilen etanol ekstraktının sıçanlarda gentamisin kaynaklı nefrotoksisite üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada BUN ve kreatinin düzeylerinin kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığını bildirmiştir ($p<0.05$).⁹⁹

Hashish ve ark.¹⁰⁰ Curcumin'in sıçanlarda bakır zehirlenmesine karşı hepatoprotektif ve nefroprotektif etkisi üzerine yaptığı çalışmada bakır zehirlenmesi sonucunda ALP, BUN ve kreatin seviyesinin kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiğini bildirmiştir ($p<0.01$).¹⁰⁰

Eraslan ve ark.¹⁰¹ etçi piliçlerde aflatoksinin böbrek fonksiyonları üzerine etkisini araştırdığı çalışmasında aflatoksin'in BUN ve K düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir artışın meydana geldiğini bildirmiştir ($p<0.05$). Kreatin, Na ve Cl de ise istatistiksel olarak önemli bir düşüş meydana geldiğini bildirmiştir. ($p<0.05$).¹⁰¹

Yapılan çalışmalar toksifikasyona bağlı nefrotoksisite neticesinde canlılarda BUN ve kreatin seviyesinin önemli ölçüde arttığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da Tablo 4.1'de de görüleceği gibi BUN ve kreatin seviyesinde diğer çalışmalarda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Bu sonuçlar bize Stx 2'nin ratlarda böbrek fonksiyonlarının kaybına neden olduğunu göstermiştir. Na, K, Cl seviyelerinde ise kontrol gurubuyla herhangi bir farklığa rastlanmamıştır. Yapılan diğer çalışmalarda ise bu farklılık minimum düzeyde kalmıştır. Yine yaptığımız çalışmada ALP seviyesinde ufak farklılıklar olsa da bu farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür.

Sitokinler proinfamatuvar olaylarda rol oynayarak immün sistemin düzenlenmesinde görev alan protein yapısındaki habercileridir.⁵⁷ Akut inflamasyonlar

esnasında lenfosit ve makrofajlardan salgılanan TNF- α ve IL-1 β özellikle IL-6 ve IL-8 ve diğer sitokinlerin salınmasını sitümlü ederek erken dönemde inflamasyonun şiddetini artırır.^{28, 61, 62, 68} Bu nedenle çalışmamızda akut inflamasyonlar için en önemli sitokinler olan TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 çalışmanın faydalı olacağını düşündük.

Ohara ve ark.¹⁰² Azomiksinin, Şiga Toksin Üreten *Escherichia coli* (STEC) enfeksiyonlu konak üzerinde oluşturduğu inflamatuvar Yanıt Üzerine Etkisini araştırdığı çalışmasına STEC enfeksiyonlu fareler üzerine yaptığı çalışmada IL-1 β , IL-6, TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$)¹⁰².

Moazzezy ve ark.¹⁰³ Şiga toksinin ve alt birimlerinin farklı hücre tiplerinde sitokin indüksiyonu üzerine etkilerini araştırdığı çalışmasında Stx uygulanan farklı hüce gruplarının tamamında, farklı miktarda da olsa IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$)¹⁰³.

Sauter ve ark.⁹⁵ endotoksinsiz Şiga toksin 2 ile oluşturulan hemolitik üremik sendromlu fare modelinde Anti-Stx antikoruyla ölümcül etkilerden korunmasına yönelik yaptığı çalışmada deneklerin Stx 2'nin zararlı etkilerine maruz kalıp kalmadığı IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi sitokin seviyelerine bakarak tespit etmiştir. Bu çalışmayı fareler üzerinde Stx 2'nin tek doz 250 ng/kg ve üçer gün arayla üç doz 50 ng/kg dozlarıyla iki ayrı HÜS modeli üzerinde yapmıştır. Çalışmada 250 ng/kg STX 2'nin tek doz uygulandığı grup enjeksiyondan 3 gün sonra ötenazi edilip alınan böbrek dokularda IL-1 β , IL-6, TNF- α düzeyleri çalışılmış olup IL-1 β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bildirilmiştir ($p<0.01$). IL-6 seviyesinde de bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir ($p<0.001$). Yine TNF- α seviyesinde bir artış meydana gelmiştir ve bu artış istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir ($p<0.01$). 50 ng/kg Stx 2'nin üç doz uygulandığı gruplar ise 8 gün sonra ötenazi edilip alınan böbrek dokularda IL-1 β , IL-6, TNF- α düzeyleri çalışılmış olup IL-

1 β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bildirilmiştir ($p<0.01$). IL-6 seviyesinde de artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir ($p<0.01$). Artışın TNF- α seviyesinde de meydana geldiği ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir ($p<0.01$)⁹⁵.

Burdet ve ark.¹⁰⁴ ratlarda Stx2'nin neden olduğu erken doğumdan sorumlu mekanizmalardaki TNF- α 'nın rolü üzerine yaptığı çalışmasında Stx 2 uygulanan ratlarda TNF- α seviyesinde istatistiksel olarak önemli bir artışın olduğu bildirilmiştir ($p<0.05$).¹⁰⁴

Yapılan çalışmaların tamamı Şiga toksin 2'nin etki ettiği dokularda akut inflamasyona bağlı olarak IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi sitokinlerin seviyesinde artış olacağını bildirmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da Tablo 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te de görüleceği gibi IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyelerinde diğer çalışmalarla benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı artışlar bulunmuştur ($p<0.01$). Bu verilerden de anlaşılacağı gibi Stx 2 uyguladığımız ratların böbrek dokularında akut inflamasyonlar gerçekleşmiştir.

Oksidatif stres temel olarak, hücresel metabolizma esnasında oluşan reaktif oksijen türlerini (ROS) detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucunda ortaya çıkan oksidatif denge bozukluğudur.⁷¹ Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) dokudaki olası oksidatif strese karşı bize fikir verme konusunda önemli bir parametredir.⁷⁴ GSH ve SOD ise birer antioksidan madde olup hücre içerisindeki serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda görevlidir.^{82, 84} Nitrik oksitin endotoksemiye bağlı doku hasarı üzerine farklı etkileri olmasına karşın yapılan klinik araştırmalarda indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) inhibitörlerinin doku hasarını önlemede etkili olduğu bildirilmiştir.⁷⁵

Gomez ve ark.⁷ Şiga Toksin 2 Tarafından İn Vivo Olarak İndüklenen Oksidatif

Stresin Hemolitik Ürmik Sendromun Patojenitesine Etkisi isimli çalışmasında fareler üzerinde Şiga toksin 2'nin 100 ng/kg dozunu kullanarak oluşturduğu HÜS modeli üzerinde çalışmıştır. STX 2'nin 100 ng/kg dozu uygulanan farelerden 72 saat sonra ötenazi altında alınan böbrek dokularında MDA seviyelerine bakılmıştır. MDA seviyelerinin Stx 2 uygulanan grupta kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu bildirilmiştir ($p<0.0001$). GSH seviyeleri kıyaslandığında ise istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu bildirilmiştir ($p<0.0001$).⁷

Zhu ve ark.⁹⁸ sisplatin ile indüklenen nerotoksisite apoptozunun oluşturduğu oksidatif stres ve inflamasyon etkisinin S-Allylmercaptocysteine etkisiyle azaltılması çalışmasında oluşturulan nefrotoksisiteye bağlı olarak toksikasyon gurubunda MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bildirilmiştir ($p<0.01$). GSH ve SOD seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bildirilmiştir ($p<0.05$).⁹⁸

Ekinci-Akdemir ve ark.¹⁰⁵ P-Coumaric asit'in sisplatin tarafından oluşturulan akut karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu etkisi üzerine yaptığı çalışmada MDA seviyesinin toksisiteye maruz kalmış böbrek dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu bildirmiştir ($p<0.05$). Yapılan çalışmada böbrek dokusundaki GSH ve SOD miktarlarında ise anlamlı bir azalma gerçekleştiği bildirilmiştir ($p<0.05$).¹⁰⁵

Burdet ve ark.¹⁰⁶ farelerde ölü fetüslerin erken doğumunu başlatan Şiga toksin 2 üzerine NO'nun etkisi çalışmasında STX 2 nin 70 ng/kg ve 200 ng/kg dozunu uygulayarak NO seviyelerini kontrol etmiş. Yapılan çalışma sonucunda her iki grupta da NO seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmış olup STX 2 dozunun artmasının NO seviyesine daha anlamlı bir sonuç ortaya koyduğunu bildirmiştir ($p<0.001$).¹⁰⁶

Morsy ve ark.¹⁰⁷ nebivololun sıçanlarda sisplatinle oluşan nefrotoksisite üzerine etkisini araştıran çalışmasında sisplatinin MDA ve NO seviyesini istatistiksel olarak

anlamli miktarda artirdigini bildirmiştir (p<0.05). GSH seviyesini ise istatistiksel olarak anlamli miktarda azalttigini bildirmiştir (p<0.05).¹⁰⁷

Yapilan çalışmalarda nefrotoksisiteye bağıli olarak oksidatif stres geliştiğı bu durumunda böbrek dokusunda MDA seviyelerinde artışa sebep olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda da Tablo 4.5 de görüleceğı gibi diğ er çalışmalarla uyum olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan çalışmalarda oksidatif stresin antioksidan kapasiteyi azalttiğı ve bu durumun böbrek dokusunda SOD ve GSH seviyelerinde azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da Tablo 4.6 ve 4.7 de görüleceğı gibi diğ er çalışmalarla uyum olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda NO seviyesinde doku hasarına bağıli olarak arttiğı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da Tablo 4.8 de de görüleceğı gibi diğ er çalışmalarla uyum görülmüştür. Ortaya çıkan tablo neticesinde Stx 2'nin oksidatif strese sebep olduğu ve bu durumun böbrek de doku hasarına sebep olduğu yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür.

Rutin (rutoside, quercetin-3-O-rutinoside and sophorin) quercetin'den oluşan bir flavanol glikoziddir ve disakkarit rutinoz içerir.⁴⁵ Rutinin anti-oksidan, antikarsinojenik, antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiplatelet, sitoprotektif, nöroprotektif, kardiyoprotektif ve vazoprotektif özellikleri saptanmıştır.^{9, 49-51} Aynı zamanda birçok çalışma rutinin iskemi/reperfüzyon böbrek hasarında böbrekleri koruma üzerine önemli etkisi olduğunu göstermiştir.^{54, 55}

Alhoshani ve ark.¹⁰⁸ ratlarda rutin takviyesinin sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisini araştırdığı çalışmada sisplatin uyguladığı ratlarda kontrol gurubuna kıyasla BUN ve kreatin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamli artış olduğunu bildirmiştir (p<0.001). Sisplatin ile birlikte rutinin 30 mg/kg dozu uygulanan grupta ise toksifikasyon gurubuna kıyasla BUN ve kreatin seviyesinde anlamli bir azalma olduğunu bildirmiştir (p<0.001).¹⁰⁸

Khan ve ark.⁴⁸ ratlarda rutin Potasyum Bromat kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkilerini araştırdığı çalışmada Potasyum Bromat ile oluşturulan nefrotoksisitede kontrol gurubuna kıyasla BUN ve kreatin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bildirmiştir ($p<0.01$). Tedavi gruplarında rutin 50 mg/kg ve 70 mg/kg dozları uygulanmış her iki grupta da toksifikasyon gurubuna kıyasla BUN ve Kreatin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bildirilmiştir ($p<0.01$).⁴⁸

Ramalingayya ve ark.¹⁰⁹ Wistar sıçanlarında doksorubisin kaynaklı in vivo hafıza defisitlerinin üzerine rutin etkisi üzerine yaptığı çalışmada doksorubisin kaynaklı toksisitede kontrol gurubuna kıyasla BUN, kreatin ve ALP düzeyleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin olmadığı bildirilmiştir ($p>0.05$). Nefrotoksifikasyon gelişmediği için uygulanan rutin de istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı bildirilmiştir ($p>0.05$).¹⁰⁹

Rajakrishnan ve ark.¹¹⁰ *Plumbago zeylanica* bitkisinin köklerindeki fitokimyasal maddelerin nefroprotektif etkisinin değerlendirilmesi çalışmasında farelerde sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisite gurubunda kontrol gurubuna kıyasla BUN ve kreatin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bildirilmiştir ($p<0.01$). K seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bildirilmiştir ($p<0.05$). Na seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir ($p>0.05$). *Plumbago zeylanica* bitkisinin köklerinden elde edilen özüt uygulanan grupta ise BUN ve kreatin seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği bildirilmiştir ($p<0.01$). K seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği bildirilmiştir ($p<0.05$). Na seviyesinde ise istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik bildirilmemiştir.¹¹⁰

Hashish ve ark.¹⁰⁰ Curcumin'in sıçanlarda bakır zehirlenmesine karşı hepatoprotektif ve nefroprotektif etkisi üzerine yaptığı çalışmada bakır zehirlenmesi

sonucunda ALP, BUN ve kreatin seviyesinin kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiğini bildirmiştir. Bir antiinflamatuvar olan curcumin ile yapılan tedavide ALP, BUN ve kreatin seviyelerinde toksifikasyon gurubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bildirmiştir ($p<0.01$).¹⁰⁰

Yapılan çalışmalar rutinın nefrotoksisiteye bağlı olarak yükselen BUN ve kreatin seviyelerini azaltıcı etkisini kanıtlamaktadır. Bizim çalışmamızda dikkate değer bir azalma görülmesine karşın istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. Nefrotoksisiteye bağlı olarak Na, K, Cl seviyeleri üzerine yapılan çalışmalarda bizim çalışmamızla paralel şekilde dikkate değer farklılıklar saptanamamıştır. Yapılan çalışmada nefrotoksisiteye bağlı olarak ALP seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da dikkate değer artış olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanamamıştır. ALP seviyeleri üzerine direkt rutin kullanılarak yapılan bir çalışma olmamasına karşın diğer antiinflamatuvar maddelerin toksifikasyona bağlı olarak yükselen ALP seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da tedavi gruplarında ALP seviyelerinin de dikkate değer azalma gözlenmiştir fakat bu azalma istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir.

Torres-Rego ve ark.¹¹¹ karaginen kaynaklı peritonit modeli üzerinde, içerisinde rutin içeren *Hancornia speciosa* meyvelerinden elde edilen ekstrenin antiinflamatuvar etkinliğini kontrol etmiştir. Bu çalışma neticesinde Karaginen kaynaklı olarak hücrelerde IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiğini bildirmiştir ($p<0.001$). *Hancornia speciosa* meyvelerinden ekstresindeki rutin ise hücrelerdeki IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana getirdiğini bildirmiştir ($p<0.001$).¹¹¹

Kauss ve ark.¹¹² rutin in insan makrofaj hücreleri kaynaklı inflamatuvar

mediatörlerin ve ratlarda adjuvan kaynaklı oluşturulan artritte üzerine etkisini araştıran çalışma yapmıştır. Bu çalışmada in vivo olarak aktif edilen makrofaj hücrelerinden salınan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ortama rutin eklenmesiyle miktarının istatistiksel olarak azaldığı bildirilmiştir (p<0.02). Ratlarda adjuvan kaynaklı oluşturulan artritte de adjuvanın etkisiyle IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği bildirilmiştir (p<0.02). Ratlara rutin uygulandığında ise IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (p<0.02).¹¹²

Su ve ark.¹¹³ rutin bir metaboliti olan 3,4-Dihidroksitolüenin, lipopolisakkarit ile aktive olan makrofajlarda, NF- κ B sinyalizasyonunun aktivasyonunu azaltarak inflamatuvar yanıtları inhibe edilmesi üzerine yaptığı çalışmada lipopolisakkarit ile aktive olan makrofajlarda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği bildirilmiştir (p<0.01). Bu hücrelere Rutin'in bir metaboliti olan 3,4-Dihidroksitolüen uyguladığında ise IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (p<0.05).¹¹³

Yapılan çalışmalar toksisiteye balı olarak oluşan inflamasyonlarda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı ve rutin uygulamasının IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalttığı bildirilmiştir. Bizim yaptığımız çalışma da Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4'de de görüleceği gibi yapılan diğer çalışmalara paralel şekilde gerçekleşmiştir. IL 8 üzerine rutin etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Ortaya çıkan tablo çalışmamızda inflamatuvar hasarın meydana geldiği ve rutin'in bu hasarı giderdiği görülmüştür.

Khan ve ark.⁴⁸ ratlarda rutin potasyum bromat kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkilerini araştırdığı çalışmada potasyum bromat ile oluşturulan

nefrotoksisitede kontrol gurubuna kıyasla MDA parametresinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bildirilmiştir olup rutin uygulaması MDA seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalttığı bildirilmiştir ($p<0.01$). Toksisite gurubunun SOD ve GSH seviyelerini kontrol gurubuyla kıyasladığımızda ise SOD ve GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu Potasyum Bromat ile beraber uygulanan rutin'in ise SOD ve GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı bildirilmiştir ($p<0.01$).⁴⁸

Gautam ve ark.¹¹⁴ rutin'in, Metotreksat ile indüklenen antioksidatif ve antiinflamatuvar etki ile bağlantılı bağırsak toksisitesi üzerine yaptığı çalışmada MDA seviyesi toksisite gurubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığı Metotreksat ve rutin'in beraber uygulandığı grupta ise MDA seviyesinin istatistiksel olarak azaldığı bildirilmiştir ($p<0.001$). Toksisite gurubunun SOD ve GSH seviyelerini kontrol gurubuyla kıyasladığımızda ise SOD ve GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu Metotreksat ile beraber uygulanan rutin'in ise SOD ve GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı bildirilmiştir ($p<0.001$).¹¹⁴

Erdogan ve ark.¹¹⁵ rutin'in Metotreksat'a bağlı olarak gelişen hepatik hasar üzerine etkisini araştıran çalışmada MDA seviyesinin toksisite gurubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığı Metotreksat ve rutin'in beraber uygulandığı grupta ise MDA seviyesinin istatistiksel olarak azaldığı bildirilmiştir ($p<0.05$). Toksisite gurubunun SOD ve GSH seviyelerini kontrol gurubuyla kıyasladığımızda ise SOD ve GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu Metotreksat ile beraber uygulanan rutin'in ise SOD ve GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı bildirilmiştir ($p<0.05$).¹¹⁵

Wang ve ark.¹¹⁶ *Sonchus asper* özütünün RAW264.7 makrofajlarında

Lipopolisakkarit ile indüklenen oksidatif stresin inhibasyonu ve proinflamatuvar sitokin üretimi üzerine etkisini araştırdığı çalışmada MDA ve NO seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığı Lipopolisakkarit ve *Sonchus asper* özütünün beraber uygulandığı grupta ise MDA ve NO seviyelerinin istatistiksel olarak azaldığını bildirilmiştir ($p<0.05$). Lipopolisakkarit uygulanan grubun SOD ve GSH seviyelerini kontrol grubuyla kıyasladığımızda ise SOD ve GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu Lipopolisakkarit ve *Sonchus asper* özütünün beraber uygulandığı grupta ise SOD ve GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı bildirilmiştir ($p<0.05$).¹¹⁶

Morsy ve ark¹⁰⁷ nebivololun sıçanlarda sisplatinle oluşan nefrotoksisite üzerine etkisini araştıran çalışmasında sisplatinin MDA ve NO seviyesini istatistiksel olarak anlamlı miktarda artırdığını Nebivol ve Sisplatinin beraber uygulandığında ise MDA ve NO seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını bildirmiştir ($p<0.05$). Sisplatinin GSH seviyesini ise istatistiksel olarak anlamlı miktarda azalttığını Nebivol ve Sisplatinin beraber uygulandığında ise GSH seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttığını bildirmiştir ($p<0.05$).¹⁰⁷

Yapılan çalışmalar toksisiteye balı olarak oluşan oksidatif stresin MDA ve NO seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı ve rutin uygulamasının MDA ve NO seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar oksidatif stresin GSH ve SOD seviyelerini istatistiksel anlamlı şekilde azalttığını, rutin uygulamasının ise GSH ve SOD seviyelerini istatistiksel anlamlı şekilde artırdığını göstermektedir. Bizim yaptığımız çalışmada Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8’de de görüleceği gibi yapılan diğer çalışmalara paralel şekilde gerçekleşmiştir. Ortaya çıkan tablo çalışmamızda oksidatif stresin oluştuğu ve rutin’in oksidatif stresi gidermede başarılı olduğu görülmüştür.

Böbrek dokularının histopatolojik incelemelerinde kontrol guruplarına göre STX grubunda gerek korteks gerekse medullar bölgelerde belirgin dejeneratif lezyonların ortaya çıktığı görülmektedir. RU50+STX ve RU100+STX guruplarında belirlenen dejeneratif lezyonların STX gurubuna göre daha hafif olduğu gözlemlendi. RU 100 gurubundan elde edilen veriler kontrol gurubundan elde edilen verilere benzer bulunmuştur. Tablo 4.2’de görüldüğü gibi en bariz dejeneratif bulgular STX gurubunda böbrek medullasında tespit edilmiş bunu böbreğin korteks bölümü izlemiştir. RU50+STX ve RU100+STX gruplarında oluşan lezyonlar rutin etkisiyle doza bağlı olarak daha hafifleyici seyir göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak; Şıga toksinin inflamasyon ve okidatif strese bağılı olarak böbrek dokusunda hasara sebep olduğı bununda HÜS oluşturduğı belirlendi. Rutinin güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan özelliğı sayesinde dokudaki sitokin seviyesini düşürdüğü ve antioksidan kapasiteyi artırarak oluşın HÜS'ün etkilerini azalttığı görüldü.

Elde ettiğimiz bulguların, HÜS tedavisinde rutin ile yapılacak farmakolojik araştırmalara temel oluşturarak literatüre katkıda bulunacağı ve daha ileride yapılacak çalışmalara yön vereceğı düşünölmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçların, araştırmacılara ve konu ile ilgili sektörlere aydınlatıcı bilgi sağlayacak nitelikte bulgular oluşturduğı düşünölmektedir. Bununla beraber Rutinin güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan özelliğı diğır toksik maddelerin etkisinin azaltılmasında faydalı olabileceğı düşünölmektedir. Bununla beraber Rutinin güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan özelliğı diğır toksik maddelerin etkisinin azaltılmasında faydalı olabileceğı düşünölmektedir. Bununla beraber Rutinin güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan özelliğı diğır toksik maddelerin etkisinin azaltılmasında faydalı olabileceğı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

1. Rosove MH. Thrombotic microangiopathies. *Semin Arthritis Rheum*, 2014, 43: 797-805.
2. Ariceta G, Besbas N, Johnson S, Karpman D, Landau D, Licht C, Loirat C, Pecoraro C, Taylor CM, Van de Kar N, Vandewalle J, Zimmerhackl LB, European Paediatric Study Group for HUS. Guideline for the investigation and initial therapy of diarrhea-negative hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24: 687-696.
3. van Setten PA, van Hinsbergh VW, van den Heuvel LP, Preyers F, Dijkman HB, Assmann KJ, van der Velden TJ, Monnens LA. Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res*, 1998, 43: 759-767.
4. Inward CD, Howie AJ, Fitzpatrick MM, Rafaat F, Milford DV, Taylor CM. Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. British Association for Paediatric Nephrology. *Pediatr Nephrol*, 1997, 11: 556-559.
5. Taguchi T, Uchida H, Kiyokawa N, Mori T, Sato N, Horie H, Takeda T, Fujimoto J. Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. *Kidney Int*, 1998, 53: 1681-1688.
6. Karpman D, Hakansson A, Perez MT, Isaksson C, Carlemalm E, Caprioli A, Svanborg C. Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: in vivo and in vitro studies. *Infect Immun*, 1998, 66: 636-644.
7. Gomez SA, Abrey-Recalde MJ, Panek CA, Ferrarotti NF, Repetto MG, Mejias MP, Fernandez GC, Vanzulli S, Isturiz MA, Palermo MS. The oxidative stress induced in vivo by Shiga toxin-2 contributes to the pathogenicity of haemolytic uraemic syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2013, 173: 463-472.

8. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28: s11-16.
9. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J*, 2017, 25: 149-164.
10. Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*, 2008, 23: 1749-1760.
11. Hurley BP, Jacewicz M, Thorpe CM, Lincicome LL, King AJ, Keusch GT, Acheson DW. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 1999, 67: 6670-6677.
12. Neri P, Tokoro S, Sugiyama T, Umeda K, Shimizu T, Tsuji T, Kodama Y, Mori H. Recombinant Shiga toxin B subunit can induce neutralizing immunoglobulin Y antibody. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35: 917-923.
13. Garred O, van Deurs B, Sandvig K. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem*, 1995, 270: 10817-10821.
14. Weinstein DL, Jackson MP, Perera LP, Holmes RK, O'Brien AD. In vivo formation of hybrid toxins comprising Shiga toxin and the Shiga-like toxins and role of the B subunit in localization and cytotoxic activity. *Infect Immun*, 1989, 57: 3743-3750.
15. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*, 2014, 2: EHEC-0024-2013.
16. Bitzan M, Richardson S, Huang C, Boyd B, Petric M, Karmali MA. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infect Immun*, 1994, 62: 3337-3347.

17. Lingwood CA, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton JL, De Grandis S, Karmali M. Glycolipid binding of purified and recombinant Escherichia coli produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem*, 1987, 262: 8834-8839.
18. Lindberg AA, Brown JE, Stromberg N, Westling-Ryd M, Schultz JE, Karlsson KA. Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by Shigella dysenteriae type 1. *J Biol Chem*, 1987, 262: 1779-1785.
19. Jacewicz M, Clausen H, Nudelman E, Donohue-Rolfe A, Keusch GT. Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *J Exp Med*, 1986, 163: 1391-1404.
20. Obrig TG. Escherichia coli Shiga Toxin Mechanisms of Action in Renal Disease. *Toxins (Basel)*, 2010, 2: 2769-2794.
21. Jacewicz MS, Acheson DW, Binion DG, West GA, Lincicome LL, Fiocchi C, Keusch GT. Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis. *Infect Immun*, 1999, 67: 1439-1444.
22. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing Escherichia coli and disease in humans. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 497-503.
23. Kleanthous H, Smith HR, Scotland SM, Gross RJ, Rowe B, Taylor CM, Milford DV. Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985-8: association with verocytotoxin producing Escherichia coli. Part 2: Microbiological aspects. *Arch Dis Child*, 1990, 65: 722-727.

24. Louise CB, Obrig TG. Specific interaction of Escherichia coli O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis*, 1995, 172: 1397-1401.
25. Ayar Y, Ersoy A, Yıldız A, Köseoğlu-Taymur D, Karayel ST, Gömleksiz MR, Güllülü M. Erişkin Hastada Atipik Hemolitik Üremik Sendrom: Olgu Sunumu. *Uludağ Medical Journal*, 2014, 40: 173-176.
26. Ramegowda B, Tesh VL. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect Immun*, 1996, 64: 1173-1180.
27. Eisenhauer PB, Chaturvedi P, Fine RE, Ritchie AJ, Pober JS, Cleary TG, Newburg DS. Tumor necrosis factor alpha increases human cerebral endothelial cell Gb3 and sensitivity to Shiga toxin. *Infect Immun*, 2001, 69: 1889-1894.
28. van de Kar NC, Monnens LA, Karmali MA, van Hinsbergh VW. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 1992, 80: 2755-2764.
29. Thorpe CM, Hurley BP, Lincicome LL, Jacewicz MS, Keusch GT, Acheson DW. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 1999, 67: 5985-5993.
30. Ergönül S, Konaş-Aşkar T. The Investigation of Heat Shock Protein (HSP 27), Malondialdehyde (MDA), Nitric Oxide (NO) and Interleukin (IL-6, IL-10) Levels in Cattle with Anaplasmosis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2009, 15: 575-579.
31. Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 2009, 8: 697-701.

32. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*, 1989, 257: L163-173.
33. Ferraris V, Acquier A, Ferraris JR, Vallejo G, Paz C, Mendez CF. Oxidative stress status during the acute phase of haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26: 858-864.
34. Li Volti S, Di Giacomo C, Garozzo R, Campisi A, Mollica F, Vanella A. Impaired antioxidant defense mechanisms in two children with hemolytic-uremic syndrome. *Ren Fail*, 1993, 15: 523-528.
35. Dubey NK, Yadav P, Dutta AK, Kumar V, Ray GN, Batra S. Free oxygen radicals in acute renal failure. *Indian Pediatr*, 2000, 37: 153-158.
36. Noris M, Remuzzi G. Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 1035-1050.
37. Loirat C, Fakhouri F, Ariceta G, Besbas N, Bitzan M, Bjerre A, Coppo R, Emma F, Johnson S, Karpman D, Landau D, Langman CB, Lapeyraque AL, Licht C, Nester C, Pecoraro C, Riedl M, van de Kar NC, Van de Walle J, Vivarelli M, Fremeaux-Bacchi V, International HUS. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr Nephrol*, 2016, 31: 15-39.
38. Yürük-Yıldırım ZN, Yılmaz A. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Tuberculin Skin Test in Children*, 2014, 14: 108-115.
39. Gülleroğlu K, Gülleroğlu B, Baskin E. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Turkish Journal of Pediatric Disease*, 2015, 4: 286-291.
40. Loirat C, Fremeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 2011, 6: 60.

41. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 1985, 151: 775-782.
42. German E-HUSR. The German 2011 epidemic of Shiga toxin-producing *E. Coli*--the nephrological view. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26: 2723-2726.
43. Rowe PC, Orrbine E, Lior H, Wells GA, Yetisir E, Clulow M, McLaine PN. Risk of hemolytic uremic syndrome after sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: results of a Canadian collaborative study. Investigators of the Canadian Pediatric Kidney Disease Research Center. *J Pediatr*, 1998, 132: 777-782.
44. Bell BP, Griffin PM, Lozano P, Christie DL, Kobayashi JM, Tarr PI. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics*, 1997, 100: E12.
45. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules*, 2003, 4: 1394-1399.
46. Hussain TH, Verma AR, Vijayakumar M, Sharma A, Mathela CS, Rao CV. Rutin, a natural flavonoid, protects against gastric mucosal damage in experimental animals. *Asian J Trop Med.*, 2009, 4: 188–197.
47. Kamel KM, Abd El-Raouf OM, Metwally SA, Abd El-Latif HA, El-sayed ME. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 2014, 28: 312-319.
48. Khan RA, Khan MR, Sahreen S. Protective effects of rutin against potassium bromate induced nephrotoxicity in rats. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 204.
49. Kampkotter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Watjen W, Kahl R. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on

- stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*, 2007, 234: 113-123.
50. Sheu JR, Hsiao G, Chou PH, Shen MY, Chou DS. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 4414-4418.
 51. Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res*, 1992, 52: 2085s-2091s.
 52. Wu CH, Lin MC, Wang HC, Yang MY, Jou MJ, Wang CJ. Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation via reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells. *J Food Sci*, 2011, 76: T65-72.
 53. Choi I, Park Y, Choi H, Lee EH. Anti-adipogenic activity of rutin in 3T3-L1 cells and mice fed with high-fat diet. *Biofactors*, 2006, 26: 273-281.
 54. Korkmaz A, Kolankaya D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Can J Surg*, 2013, 56: 6-14.
 55. Korkmaz A, Kolankaya D. Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. *J Surg Res*, 2010, 164: 309-315.
 56. Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 1-3.
 57. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*, 2000, 157: 683-694.
 58. Yalçın AC, Gürsoy B. Sepsis İmmünopatogenezi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008, 5: 25-29.
 59. Casey LC. Immunologic response to infection and its role in septic shock. *Crit Care Clin*, 2000, 16: 193-213.

60. Woodroffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, Cuzner ML. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol*, 1991, 33: 227-236.
61. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*, 2002, 8: 101-105.
62. Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care*, 2005, 11: 473-480.
63. Dalkılıç E, Gül CB, Alkış N. Interlökin-6: Inflamasyonda Başrol Oyuncularından. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2012, 38: 157-160.
64. Samanta AK, Oppenheim JJ, Matsushima K. Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem*, 1990, 265: 183-189.
65. Sherry B, Cerami A. Small cytokine superfamily. *Curr Opin Immunol*, 1991, 3: 56-60.
66. Bertin E, Nguyen P, Guenounou M, Durlach V, Potron G, Leutenegger M. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) are essentially dependent on visceral fat amount in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*, 2000, 26: 178-182.
67. Caminero A, Comabella M, Montalban X. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: an ongoing story. *J Neuroimmunol*, 2011, 234: 1-6.
68. Kemanetzoglou E, Andreadou E. CNS Demyelination with TNF-alpha Blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2017, 17: 36.

69. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*, 2015, 264: 182-203.
70. Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders HJ. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14: 759-767.
71. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2015, 6: 331-336.
72. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2004, 15: 91-96.
73. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15: 4405-4409.
74. Yarıktaş M, Döner F, Doğru H, Aynalı G, Yönden Z, Delibaş N. Baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003, 10: 65-67.
75. Şahan-Fırat S, Canacankatan N, Korkmaz B, Yıldırım H, Taner L, Sarı AN, Tunçtan B. Endotoksemik Sıçanların Karaciğerinde Artan Oksidatif Stres Üzerinde İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz İnhibisyonunun Etkisi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2008, 1: 28-35.
76. Fentoğlu Ö, Koçak H, Sütçü R, Kırzioğlu FY. Periodontal hastalıklı ve hiperlipidemili bireylerde salya malondialdehit, süperoksit dismutaz, glutatyon ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2010, 1: 69-81.

77. Bayraktar MR, Harputluoğlu M, Bayraktar NM. Kolon Kanseri Hastalarının Serum C-Reaktif Protein ve Malondialdehit Düzeylerinin İncelenmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2007, 27: 13-15.
78. Ögüş E, Yılmaz FM, Yılmaz H, Durunay M, Yücel D. Hemodiyaliz ve Periton Diyalizi Hastalarında Serum Malondialdehit Düzeyleri ve Oksidasyona Yatkınlık. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2004, 24: 316-322.
79. Kuyumcu A, Duzgun AP, Ozmen MM, Besler HT. The role of nitric oxide in trauma and infection. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2004, 10: 149-159.
80. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg*, 1995, 82: 1598-1610.
81. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, 3: 30-39.
82. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 2004, 36: 1-9.
83. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*, 1995, 18: 1-11.
84. Konukoğlu D, Akçay T. Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 1995, 15: 214-218.
85. Inui KI, Masuda S, Saito H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int*, 2000, 58: 944-958.
86. Hosohata K. Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury. *Int J Mol Sci*, 2016, 17.

87. Hosten AO. BUN and Creatinine. İçinde: Walker HK, Hall WD, Hurst JW (editörler). *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, 3rd Baskı. Boston, 1990, 193.
88. Duman C, Erden BF. Birinci Basamak Sağlık Hizmetlerine Yönelik Biyokimyasal Laboratuvar Verilerinin Kısa Yorumu. *Sted*, 2004, 13: 256-262.
89. Ustaalioglu YE, Bal AS, Yılmaztepe-Oral A. Glomerüler Filtrasyon Belirteçleri ve Hesaplama Formülleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2015, 41: 95-102.
90. Maden M, Veysi A. Deneysel Gentamisin Nefrotoksitesinde Üriner Enzim Aktivitelerinin Önemi. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 1999, 23: 29-42.
91. Tareen N, Martins D, Nagami G, Levine B, Norris KC. Sodium disorders in the elderly. *J Natl Med Assoc*, 2005, 97: 217-224.
92. Sever L. Akut Böbrek Yetersizliği ve “Crush” Sendromu. *Pediatric Aciller Sempozyumu*, 2001: 177-185.
93. Amaral MM, Girard MC, Alvarez RS, Paton AW, Paton JC, Repetto HA, Sacerdoti F, Ibarra CA. Ouabain Protects Human Renal Cells against the Cytotoxic Effects of Shiga Toxin Type 2 and Subtilase Cytotoxin. *Toxins (Basel)*, 2017, 9.
94. Berin MC, Darfeuille-Michaud A, Egan LJ, Miyamoto Y, Kagnoff MF. Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell Microbiol*, 2002, 4: 635-648.
95. Sauter KA, Melton-Celsa AR, Larkin K, Troxell ML, O'Brien AD, Magun BE. Mouse model of hemolytic-uremic syndrome caused by endotoxin-free Shiga toxin 2 (Stx2) and protection from lethal outcome by anti-Stx2 antibody. *Infect Immun*, 2008, 76: 4469-4478.

96. Keepers TR, Psotka MA, Gross LK, Obrig TG. A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 3404-3414.
97. Russo LM, Melton-Celsa AR, Smith MA, Smith MJ, O'Brien AD. Oral intoxication of mice with Shiga toxin type 2a (Stx2a) and protection by anti-Stx2a monoclonal antibody 11E10. *Infect Immun*, 2014, 82: 1213-1221.
98. Zhu L, Yu T, Qi X, Gao J, Huang K, He X, Luo H, Xu W. Limited Link between Oxidative Stress and Ochratoxin A-Induced Renal Injury in an Acute Toxicity Rat Model. *Toxins (Basel)*, 2016, 8: 373-388.
99. Apaydin Yildirim B, Kordali S, Terim Kapakin KA, Yildirim F, Aktas Senocak E, Altun S. Effect of *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* ethanol extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2017, 18: 501-511.
100. Hashish EA, Elgaml SA. Hepatoprotective and Nephroprotective Effect of Curcumin Against Copper Toxicity in Rats. *Indian J Clin Biochem*, 2016, 31: 270-277.
101. Eraslan G, Karaöz E, Bilgili A, Akdoğan M, Öncü M, Eşsiz D. Etçi Piliçlerde Aflatoksinin Böbrek Fonksiyonları Üzerine Etkisi. *Türk J Vet Anim Sci*, 2003, 27: 741-749.
102. Ohara T, Kojio S, Taneike I, Nakagawa S, Gondaira F, Tamura Y, Gejyo F, Zhang HM, Yamamoto T. Effects of azithromycin on shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46: 3478-3483.
103. Moazzezy N, Oloomi M, Bouzari S. Effect of shiga toxin and its subunits on cytokine induction in different cell lines. *Int J Mol Cell Med*, 2014, 3: 108-117.

104. Burdet J, Sacerdoti F, Cella M, Franchi AM, Ibarra C. Role of TNF-alpha in the mechanisms responsible for preterm delivery induced by Stx2 in rats. *Br J Pharmacol*, 2013, 168: 946-953.
105. Ekinci Akdemir FN, Albayrak M, Calik M, Bayir Y, Gulcin I. The Protective Effects of p-Coumaric Acid on Acute Liver and Kidney Damages Induced by Cisplatin. *Biomedicines*, 2017, 5: 18-29.
106. Burdet J, Zotta E, Cella M, Franchi AM, Ibarra C. Role of nitric oxide in shiga toxin-2-induced premature delivery of dead fetuses in rats. *PLoS One*, 2010, 5: 115-127.
107. Morsy MA, Heeba GH. Nebivolol Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, 118: 449-455.
108. Alhoshani AR, Hafez MM, Husain S, Al-Sheikh AM, Alotaibi MR, Al Rejaie SS, Alshammari MA, Almutairi MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of rutin supplementation against cisplatin-induced Nephrotoxicity in rats. *BMC Nephrol*, 2017, 18: 194.
109. Ramalingayya GV, Cheruku SP, Nayak PG, Kishore A, Shenoy R, Rao CM, Krishnadas N. Rutin protects against neuronal damage in vitro and ameliorates doxorubicin-induced memory deficits in vivo in Wistar rats. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 1011-1026.
110. Rajakrishnan R, Lekshmi R, Benil PB, Thomas J, AlFarhan AH, Rakesh V, Khalaf S. Phytochemical evaluation of roots of *Plumbago zeylanica* L. and assessment of its potential as a nephroprotective agent. *Saudi J Biol Sci*, 2017, 24: 760-766.
111. Torres-Rego M, Furtado AA, Bitencourt MA, Lima MC, Andrade RC, Azevedo EP, Soares Tda C, Tomaz JC, Lopes NP, da Silva-Junior AA, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa Mde F. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and

- bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 275.
112. Kauss T, Moynet D, Rambert J, Al-Kharrat A, Brajot S, Thiolat D, Enneman R, Fawaz F, Mossalayi MD. Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10: R19.
 113. Su KY, Yu CY, Chen YP, Hua KF, Chen YL. 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF-kappaB signaling. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 21.
 114. Gautam R, Singh M, Gautam S, Rawat JK, Saraf SA, Kaithwas G. Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 99.
 115. Erdogan E, Ilgaz Y, Gurgor PN, Oztas Y, Topal T, Oztas E. Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats. *Acta Cir Bras*, 2015, 30: 778-784.
 116. Wang L, Xu ML, Liu J, Wang Y, Hu JH, Wang MH. *Sonchus asper* extract inhibits LPS-induced oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in RAW264.7 macrophages. *Nutr Res Pract*, 2015, 9: 579-585.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Mustafa ÇELİK Doğum tarihi: 18.12.1989 Doğum yeri: Ardanuç Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Sakarya Halk Sağlığı Laboratuvarı. Korucuk Mah. 1708 Adapazari/SAKARYA Tel: 0537 715 65 06 Faks: 0264 255 23 70 E-mail: biomustafacelik@gmail.com
Eğitim
Lise: Artvin Lisesi Lisans: Fen Fakültesi, Biyoloji Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler
Bilimsel çalışma yapmak, kitap okumak, kültürel faaliyetlere katılmak.

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



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

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1600096117
Konu : HADYЕК Kararı.

20.04.2016

VETERİNER FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 24.02.2016 tarihli ve 36643897-000-E.1600048853 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 19.04.2016 tarih ve 2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 36 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 19.04.2016

Toplantı Sayısı : 2

KARAR NO 36: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Fikret ÇELEBİ'nin yürüttüğü, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığının Fizyoloji ve Biyokimya Anabilim Dallarının Laboratuvarlarında yürütülecek olan “**Şiga Toksine Bağlı Hemolitik Üremik Sendromlu Ratlarda Rutin Etken Maddesinin; İnterlökinler, Tümör Nekroz Faktör ve Oksidatif Stres Düzeyleri Üzerine Etkisinin Araştırılması**” başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Dekanlığının 24.02.2016 tarih ve 36643897-000-E.1600048853 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

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

Prof.Dr. Devriş ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!birim=veteriner-fakultesi>
Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vettak@atauni.edu.tr

