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

LİPOPOLİSAKKARİT İLE SEPSİS OLUŞTURULAN RATLARIN KARACİĞER DOKULARINDA SERBEST RADİKAL METABOLİZMASININ İNCELENMESİ; VİTAMİN D'NİN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. MEHMET ZAHİT ÇIRACI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. ORHAN CANBOLAT

ANKARA
TEMMUZ 2013

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

LİPOPOLİSAKKARİT İLE SEPSİS OLUŞTURULAN RATLARIN KARACİĞER DOKULARINDA SERBEST RADİKAL METABOLİZMASININ İNCELENMESİ; VİTAMİN D'NİN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. MEHMET ZAHİT ÇIRACI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. ORHAN CANBOLAT

ANKARA
TEMMUZ 2013

İÇİNDEKİLER

Teşekkür……V

Kısaltmalar…….……VII

Şekil, tablo, grafik ve resim listeleri…….……...…X

1. GİRİŞ……1

2. GENEL BİLGİLER……....3

2.1. Sepsis……..3

2.1.1. Epidemiyoloji……..6

2.1.2. Etyoloji……7

2.1.3. Fizyopatoloji……...8

2.1.4. Sepsisin Organlar Üzerine Etkileri…….13

2.1.4.1. Sepsis ve Karaciğer……...…14

2.1.5. Sepsiste Tedavi……16

2.2. Vitamin D……17

2.2.1. Vitamin D'nin Formları……..17

2.2.2. Vitamin D'nin Metabolizması…….…18

2.2.3. Vitamin D'nin Görevleri……..19

2.2.3.1. Vitamin D'nin Mineral Metabolizmasına Etkisi…….20

2.2.3.2. Vitamin D'nin İmmünolojik Etkileri…….21

2.2.3.2.1. Vitamin D ve Sepsis……..24

2.2.3.3. Vitamin D'nin Kanser Üzerine Etkisi……26

2.2.3.4. Vitamin D'nin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi…….....27

2.2.3.5. Vitamin D'nin Tip 2 Diyabetes Mellitus Üzerine Etkileri……28

2.2.4. Vitamin D'nin Düzeyi…….....30

2.3. Serbest Radikaller……...……31

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri……...……32

2.3.1.1. Süperoksit Radikali……..…32

2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)……33

2.3.1.3. Hidroksil Radikali……33

2.3.1.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$)……34

2.3.1.5. Hipokloröz Asit (HOCl)……...…34

2.3.1.6. Nitrik Oksit (NO)…….35

2.3.2. Serbest Radikallerin Etkileri……..…35

2.3.2.1. Membran lipitlerine etkileri……35

2.3.2.2. Proteinlere etkileri……...…36

2.3.2.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya etkileri……..…36

2.3.2.4. Karbonhidratlara etkileri……36

2.3.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları……..…37

2.4. Antioksidan Sistem…….…38

2.4.1. Hücreiçi Enzimatik Antioksidan Savunma……...…38

2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)……38

2.4.1.2. Glutatyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)……...…39

2.4.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)…….……39

2.4.1.4. Katalaz (CAT)……..…40

2.4.1.5. Glutatyon S-Transferaz (GST)……...…40

2.4.2. Nonenzimatik Antioksidanlar…….…41

2.5. Vitamin D - Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi……42

2.6. Sepsis - Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi……...…43

3. GEREÇ VE YÖNTEM…….45

3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması……..45

3.2. Kullanılan Aletler……46

3.3. Yöntemlerin Uygulanması……..47

3.3.1. Total Protein Tayini…….…47

3.3.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini……...…48

3.3.3. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini……...49

3.3.4. Katalaz Aktivitesinin Tayini……...…50

3.3.5. Glutatyon-S-Transferaz Tayini……..51

3.3.6. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü……52

3.4. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi……52

3.5. İstatistiksel Analiz……...53

4. BULGULAR……...…54

5. TARTIŞMA……66

6. SONUÇ……74

7. KAYNAKLAR……75

8. ÖZET……...……92

9. SUMMARY……94

10. ÖZGEÇMİŞ……96

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bizlere karşı her zaman güler yüzlü ve hoşgörülü olan, bilimsel anlamda bize sorgulamayı öğreten değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Orhan Canbolat'a,

Her konuda olduğu gibi tezimle ilgili de bütün aşamalar da yardımcı olan, bilimsel ve sosyal anlamda tecrübelerini ve tavsiyelerini bizimle paylaşan, bize her zaman vakit ayıran değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Kavutçu'ya,

Daha iyi şartlarda uzmanlık eğitimi alabilmemiz için elinden geleni yapan, taleplerimizi ve önerilerimizi dikkate alan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu'na,

Asistanlık dönemim boyunca, bilgi birikimi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve eğitimimde emeği geçen tüm değerli hocalarıma,

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

Tez çalışmalarıma destek ve katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM) müdürü Prof. Dr. Nurten Türközkan ve tüm GÜDAM çalışanlarına,

Laboratuvarımızda görev yapan ve laboratuvarımız dışında görev yapıp çeşitli vesilelerle tanışma imkanı bulduğum tüm personel arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitimi süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her birini aile bireyi kadar yakın hissettiğim sevgili asistan arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca destekleri ve sevgileri ile hep yanımda olduklarını hissettiğim canım annem, babam, kardeşlerim ve yakınlarıma,

Son olarak hayattaki en kıymetli varlıklarım olan sevgili eşim Dr. Saliha Çıracı ve biricik kızım Rabia Ceren'e,

en içten duygularımla ***TEŞEKKÜR EDERİM…***

KISALTMALAR

ALT: Alanin Aminotransferaz

AMP: Anti Mikrobiyal Peptid

APC: Antijen Sunan Hücre

ARDS: Akut Respiratuar Distres Sendrom

AST: Aspartat Aminotransferaz

CAT: Katalaz

CDNB: 1-Kloro 2,4 Dinitrobenzen

DBP: D vitamini Bağlayıcı Protein

DIC: Dissemine İntravasküler Koagülasyon

DNPG: Dinitrofenilglutatyon

EF: Ejeksiyon Fraksiyonu

GM-CSF: Granülosit Monosit Koloni Stimülan Faktör

GSH: İndirgenmiş Glutatyon

GSH-Px: Glutatyon Peroksidaz

GSSG: Oksitlenmiş Glutatyon

GST: Glutatyon-S-Transferaz

H_2O_2: Hidrojen Peroksit

IFN-γ: İnterferon Gama

IL-1: İnterlökin-1

IL-10: İnterlökin-10

IL-12: İnterlökin-12

IL-1β: İnterlökin-1-Beta

IL-2: İnterlökin-2

IL-4: İnterlökin-4

IL-5: İnterlökin-5

IL-6: İnterlökin-6

IL-8: İnterlökin-8

LPS: Lipopolisakkarit

MDA: Malondialdehit

MPO: Miyeloperoksidaz

NBT: Nitroblue Tetrazolium

NF-κβ: Nükleer Faktör Kappa Beta

NHANES: Ulusal Sağlık ve Beslenmenin İncelenmesi

NO: Nitrik Oksit

NO_2: Azot Dioksit

$O2^{\bullet-}$: Süper Oksit Anyonu

•OH : Hidroksil Radikali

OAB: Ortalama Arter Basıncı

PAF: Trombosit Aktive Eden Faktör

PAMPs: Patojenle İlişkili Moleküler Yapılar

PGI2: Prostaglandin I2

PMNLs: Polimorf Nüveli Lökositler

PRRs: Patern Tanıyan Reseptörler

PTH: Parathormon

RANKL: Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kappa Beta Ligandı

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

RXR: Retinoid X Reseptör

SAB: Sistolik Arter Basıncı

SIRS: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu

SOD: Süperoksit Dismutaz

T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus

TF: Doku Faktörü

TLR: Toll Like Reseptör

TNF-α: Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TSST-1: Toksik Şok Sendromu Toksini -1

TxA2: Tromboksan A2

VDR: Vitamin D Reseptörü

VDRE: Vitamin D Responding Element

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Sepsis, Enfeksiyon ve SIRS ilişkisi

Şekil 2. Sepsisin fizyopatolojisi

Şekil 3. D vitamini metabolizması

Şekil 4. Vitamin D'nin immün sistem üzerine etkileri

Şekil 5. Vitamin D'nin immün sistem üzerine etkileri

Şekil 6. Vitamin D'nin görev aldığı yerler

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hücrelerde serbest radikal kaynakları

Tablo 2. Ratların rektal yolla ölçülen vücut sıcaklıkları

Tablo 3. Serum Karaciğer Fonksiyon Testleri Sonuçları

Tablo 4. Rat Karaciğer Dokularında Enzim Aktiviteleri

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Protein Standart Grafiği

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

Grafik 3. Tüm gruplarda rat karaciğer dokularına ait SOD aktiviteleri

Grafik 4. Tüm gruplarda rat karaciğer dokularına ait CAT aktiviteleri

Grafik 5. Tüm gruplarda rat karaciğer dokularına ait GST aktiviteleri

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

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Kontrol grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti

Resim 2. Kontrol grubu: Sentral ven, hepatik sinüzoidler, hepatositler

Resim 3. Kontrol grubu: Normal görünümde portal aralık

Resim 4. Vitamin D grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti

Resim 5. Vitamin D grubu: Sentral ven, sinüzoidler, hepatositler

Resim 6. Sepsis grubu: Büyük ve küçük büyültmede genel görünüm

Resim 7. Sepsis grubu: Portal aralıkta perivenüler bölge

Resim 8. Sepsis grubu: Büyük ve küçük büyültmede nekrotik alanlar ve nötrofilik infiltrasyon

Resim 9. Sepsis+vitamin D grubuna ait rat karaciğerinin histolojik kesiti

Resim 10. Sepsis+vitamin D grubu: Küçük ve büyük büyültmede nekrotik alanlar

1.GİRİŞ

Sepsis, enfeksiyona karşı organizmanın gösterdiği inflamatuvar bir yanıttır. **S**epsis insidansı , yaşlı popülasyonun giderek artmasına, daha sık invaziv girişimler uygulanmasına ve immünsüpresif tedavilere bağlı olarak artmıştır. Anti mikrobiyal ajanların kullanımına, ileri yaşam desteğindeki ve yoğun bakımdaki gelişmelere rağmen sepsisli hastaların mortalitesi hala % 30-40 dolayındadır.

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

D vitamini, çocuklarda riketsin ve osteomalazinin, yetişkinlerde ise osteoporozun önlenmesinde son derece önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, vitamin D'nin kemik ve kalsiyum metabolizmasındaki etkilerinin yanısıra birçok dokuda önemli görevlerinin olduğunu göstermektedir. Bu etkiler D vitamini reseptörlerinin birçok dokuda yaygın olarak bulunmasına bağlıdır. Vitamin D immünregülatuar sistemde özellikle immünsüpresif rol oynamaktadır. Vitamin D'nin immün sistemde monosit ve lenfositlerden sitokin salınımını etkileyerek anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. (2)

D vitamini ve sepsis ile ilgili yapılan çalışmalarda, vitamin D'nin özellikle koagülasyonu inhibe ettiği, dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) oluşumunu geciktirdiği bulunmuştur. (3)

Son yıllarda vitamin D'nin oksidatif stresi inhibe edici etkileri üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Diyabetik ratlarda vitamin D'nin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PX) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığı tespit edilmiştir. (4)

Sepsiste proinflamatuvar sitokinlerden interlökin-1-beta (IL-1-β), tömör nekrozis faktör alfa (TNF-α), interlökin-6 (IL-6), lipopolisakkarit (LPS) ile uyarım sonucu artmaktadır ve organizma buna yanıt olarak ise antiinflamatuvar sitokinlerden interlökin-4 (IL-4), ve interlökin-10 (IL-10) salınımına neden olmaktadır. (5, 6) Salınan proinflamatuvar mediyatörler serbest radikal oluşumunu tetiklemektedir. Oluşan serbest radikaller oksidatif strese neden olmakta ve oksidatif stresle gelişen endotoksik şok tablosu ise ciddi mortaliteye neden olmaktadır.

Bu çalışmada deneysel sepsis oluşturulmuş ratlarda serbest radikal metabolizmasında rol alan enzimlerin aktivitelerini ve bu metabolizma üzerine vitamin D'nin etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

1991 yılına kadar sepsis ve ilişkili durumlar bakteriyemi, sepsis sendromu, septisemi, ciddi sepsis gibi tanımlamalarla ifade edilmiş, bu terimler birbirlerinin yerine kullanılmıştır. Bu da sepsis ve ilişkili durumların yeterince anlaşılamamasına ve özellikle klinik çalışmaların yorumlanmasında karmaşaya neden olmuştur. Sepsis ve sonuçlarının tanımlarındaki bu karmaşa ve yetersizlikler sebebiyle 1991'de Amerikan Göğüs Hastalıkları Uzmanları Derneği [*American College of Chest Physicians* (ACCP)] ve Yoğun Bakım Dernekleri [*Society of Critical Care Medicine* (SCCM)] tarafından bir uzlaşı konferansı düzenlenmiştir. Bu toplantı sonrası sepsis ve ilişkili durumlar aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır. (7)

Enfeksiyon: Patojen mikroorganizmalar tarafından indüklenen inflamatuvar cevap veya normalde steril olan dokuların mikrobiyal patojenler ile invazyonu.

Bakteriyemi: Dolaşımda canlı bakteri varlığı.

Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu [*Systemic Inflammatory Response Syndrome* SIRS)]**:** Şu kriterlerden iki veya daha fazlasının varlığı; vücut ısısı: ≤36ºC veya ≥38ºC, taşikardi: >90 atım/dk, takipne: solunum sayısı >20/dk veya PaCO2 ≤mmHg, lökosit sayısı ≥12000/mm3 veya <4000/mm3 ya da ≥%10 immatür bant formu varlığı

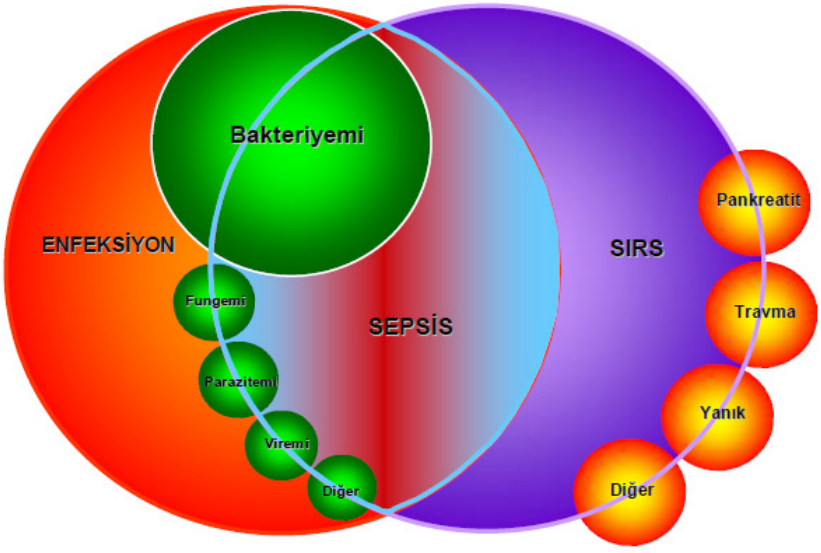
Sepsis: Enfeksiyonun tetiklediği sistemik inflamatuvar yanıt (Enfeksiyona bağlı SIRS)

Ciddi Sepsis: Organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonun eşlik ettiği sepsis

Septik Şok: Yeterli sıvı resüsitasyonuna yanıt vermeyen, vazopressör ya da inotroplara dirençli, doku perfüzyon bozukluğunun eşlik ettiği sepsis kaynaklı hipotansiyon

Sepsise Bağlı Hipotansiyon: Sistolik arter basıncı (SAB) < 90 mmHg olması ya da hipotansiyona yol açacak başka neden yokken SAB' nın bazal değerinden 40 mmHg' dan fazla düşüş göstermesi

Çoğul Organ Yetersizliği Sendromu: Akut kritik hastada organ işlev bozukluğu ve homeostazın müdahale (mekanik ventilasyon, hemodiyaliz gibi) olmadan sağlanamaması



Şekil 1. Sepsis, Enfeksiyon ve SIRS ilişkisi

Sepsis fizyopatolojisinde güncellenen bilgiler sebebiyle, klinisyenler arasında bu tanımlamaları yeniden düzenleme ihtiyacı doğmuştur. Bu sebeple

2001 yılında yapılan uluslararası sepsis tanımlamaları toplantısı sonuçlarına göre sepsis 'Kanıtlanmış ya da şüphe edilen enfeksiyon (bir mikroorganizma tarafından oluşturulan patolojik süreç) varlığı ile beraber aşağıdaki kriterlerden birkaçının bulunması' şeklinde tanımlanmıştır.(8)

A. Genel değişkenler

· Ateş (ısı > 38,3 ^{o}C)

· Hipotermi (ısı < 36 ^{o}C)

· Kalp atım sayısı > 90/dk ya da yaşa göre normal değerlerinden standart sapma > 2

· Takipne > 30/dk

· Mental durum değişikliği

· Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte > 20mL/kg)

· Diyabet yokluğunda hiperglisemi (plazma glukoz > 7,7 mmol/L ya da >110mg/dL)

B. İnflamatuvar değişkenler

· Lökositoz (> 12000/mm3) ya da lökopeni (< 4000/mm3)

· Beyaz küre sayısı normal olsa da immatür formları > % 10

· Plazma C-reaktif protein düzeyi, normal değerlerden standart sapma > 2

· Plazma prokalsitonin düzeyi, normal değerlerden standart sapma > 2

C.Hemodinamik değişkenler

· Arteriyel hipotansiyon: Sistolik arter basıncı (SAB) < 90 mmHg, ortalama arter basıncı (OAB) < 70 mmHg ya da SAB' nın, diğer hipotansiyon nedenleri yok iken, hastanın normal değerlerine göre > 40 mmHg düşmesi

· Mikst venöz oksijen satürasyonu (S02) > % 70

· Kardiyak indeks > 3,5 L/dk/m2

D.Organ disfonksiyon değişkenleri

· Arteriyel hipoksemi (PaO2/FİO2 < 300)

· Akut oligüri (saatlik idrar çıkışı < 0.5 mL/kg veya en az iki saat 45 mL/saat)

· Kreatin artışı (> 0.5mg/dL)

· Koagülasyon anormallikleri (INR >1,5 veya aPTT > 60 saniye)

· İleus (bağırsak seslerinin yokluğu)

· Trombositopeni (trombosit sayısı < 100.000/mm3)

· Hiperbilurubinemi (plazma total bilurubin > 4 mg/dL veya 70 mmol/L)

E.Doku perfüzyon değişkenleri

· Hiperlaktatemi (> 3 mmol/L)

· Kapiller dolmanın azalması veya beneklenme

2.1.1. Epidemiyoloji

Toplumda ileri yaş grubunun artması, kronik hastalığı olan hastaların yaşam sürelerinin uzaması, immünosüpresif ilaçların sık kullanılması, teşhis veya tedavi amacı ile invaziv girişimlerin yaygın kullanılması, sepsis gelişimine zemin hazırlayıcı faktörlerin başında gelmektedir. Yatak kapasitesi fazla olan, yoğun

bakım üniteleri bulunan ve invaziv işlemlerin fazla yapıldığı hastanelerde nazokomiyal sepsis gittikçe daha sık görülmektedir. 2002 yılında 24 Avrupa ülkesinde yapılan, 198 yoğun bakım ünitesini kapsayan bir çalışmada, 2001 uzlaşı konferansı kriterleri kullanılarak sepsis insidansi %37 olarak bulunmuştur. En sık enfeksiyon odağı olarak % 68 akciğerler, % 22 batın, % 20 kan ve % 14 üriner sistem bulunmuştur. Hastane mortalitesinin % 24,1 olarak bulunduğu bu çalışmada, septik şokta mortalite % 54.1 olarak saptanmıştır. (9)

2.1.2. Etyoloji

Etiyolojik açıdan bakıldığında önceki yıllarda gram negatif bakteriler yüksek oranda iken, daha sonraki yıllarda gram pozitif bakterilerin öne çıktığı saptanmıştır. Son 20 yılda mantar enfeksiyonlarında % 207' lik bir artış belirlenmiştir. (10)

Gram pozitif sepsiste etken sıklıkla s.aureus, koagülaz negatif stafilokoklar, enterokoklar ve streptokoklar iken, Gram negatif sepsiste etken sıklıkla E.coli, K.pneumonia ve P.aeruginosadır. Ciddi sepsis ve septik şok vakalarının %5'inde etken mantarlardır. Fungal sepsislerde genellikle kandida türleri etkendir. Bu kandida türleri ABD'de nazokomiyal enfeksiyonlarda en sık görülen 4. patojendir ve tüm patojenler arasında %40 ile en yüksek mortaliteye sahiptir. Fungal sepsisin insidansı 1979-2000 yılları arasında 3 kat artış göstermiştir. (11)

2.1.3. Fizyopatoloji

Vücudun doğal immünitesi tarafından algılanan ve tanınan bakteri ürünlerine, patojenle ilişkili moleküler yapılar [Pathogen-Associated Moleculer Patterns (PAMPs)] denir. Bu yapılar içerisinde en önemlisi LPS'dir. (12)

Gram negatif bakteri hücre duvarında var olan LPS (endotoksin olarak da bilinir) septik sürecin başlamasında ve ilerlemesinde etkin rol oynar. Gram pozitif bakterilerde endotoksin yoktur, ancak hücre duvarında peptidoglikan ve lipoteikoik asit içerir. Bu iki moleküler yapı hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma yeteneğindedir ve inflamasyonu artırıcı (pro-inflamatuvar) özellik gösterir. (13)

Bazı gram pozitif bakteri ekzotoksinlerinin septik şoka neden oldukları bilinmektedir. En iyi bilinen örnekleri toksik şok sendromuna neden olan *Staphylococcus aureus'*un ekzotoksini toksik şok sendromu toksin–1 (TSST–1) ve *Streptococcus pyogenes'*in pirojenik ekzotoksinidir. Bu ekzotoksinler herhangi bir ön uyarı olmadan ortaya çıkar ve yüksek mortaliteye neden olur. Toksik şok sendromu septik şokun en akut ve ağır klinik tablosudur. (14)

Septik soku tetikleyen ilk olay, bakterilerin lizisi sonucu LPS veya diğer toksik hücre duvarı komponentlerinin dolaşıma salıverilmesidir. Parçalanan gram negatif bakterilerden dolaşıma salıverilen LPS ilk olarak özel plazma proteinleri (LPS-Binding Proteinler) tarafından bağlanır. Daha sonra bu kompleksin, monosit ve makrofaj yüzeyindeki CD14 reseptörleri ve endotelyal hücreler gibi diğer bazı konak hücrelerinin yüzey reseptörleri ile etkileşimi söz konusudur. LPS dışındaki diğer toksik hücre duvar komponentlerinin (peptidoglikan fragmanları ve

lipoteikoik asit) başlangıçta hangi proteinlerle etkileşimde bulunduğu bilinmemekle birlikte, muhtemelen LPS ile aynı konak hücreleri ile etkileşip onları aktive etmektedir; çünkü her iki olayda da aynı şok mediyatörleri ortaya çıkmaktadır. (15)

CD14 hücre membranında (mCD14) olduğu gibi dolaşımda (sCD14) da görülebilir. Hücre yüzeyinde CD14 reseptörü olmayan dendritik hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri gibi hücreler sCD14 ile etkileşime girerek LPS ile uyarılır. (16)

CD14'le tutulan PAMPs başta antijen sunan hücreler olmak üzere doğal immün sistem içerisinde yer alan hücrelerin yüzeyinde bulunan, patern tanıyan reseptörler [pattern recognition receptors (PRRs)] olarak adlandırılan reseptörler tarafından tanınır. PRRs yapısal olarak farklı proteinler olup birkaç reseptör ailesini [Toll-like reseptör (TLR)] meydana getirirler. TLR, sitokin ve diğer medyatörlerin sentez ve salınımına öncülük eden sinyal yollarını uyarır. TLR uyarılması NF-kB'nin nükleer translokasyonuna yol açar. Böylece sitokin sentezi için kopyalama başlamış olur. (17, 18)

İnsanda günümüze kadar TLR'lerin 13 tipi tanımlanabilmiştir .TLR4 LPS reseptörüdür, TLR2 Gram-pozitif hücre duvar yapısının (peptidoglikan, lipoteikoik asid) algılanmasından sorumludur, TLR5 flagellin için reseptördür ve TLR9 bakteriyel DNA'da CpG elementlerinin tanınmasından sorumludur.(19)

Antijenik yapı ve toksinler, dolaşımdaki mononükleer fagositleri, endotel hücrelerini ve diğer farklı bir çok hücreyi uyararak güçlü mediyatörlerin salınmasına neden olurlar. Monositlerden TNF-α, interlökin-1 (IL-1), IL-6,

interlökin-8 (IL-8) ve trombositleri aktive eden faktör (PAF) salınır. IL-1 ve IL-6 T hücrelerini aktive ederek interferon gama (IFN-γ), interlökin-2 (IL-2), IL-4, granülosit monosit koloni stimulan faktörlerin (GM-CSF) salgılanmasını sağlarlar. Mediyatörlerin salınmasını takiben koagülasyon sistemi, kompleman sistemi, fibrinolizis ve kinin sistemi aktive olur. (14, 20)

TNF-α, IL-1 gibi mediyatörler araşidonik asit metabolitlerinin açığa çıkmasını ve sentezini aktive eder. Sepsiste araşidonik asit metabolitleri de önemli rol oynar. Siklooksijenaz yolla prostoglandinler ve tromboksan A2, lipoksijenaz yolla ise lökotrienler açığa çıkar. Tromboksan A2 kuvvetli vazokonstrüktör , prostoglandinler ise vazodilatör etkiye sahiptir. Araşidonik asit metabolitleri, ateş, taşikardi, takipne, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu ve laktik asidoz oluşumunda rol alırlar. (21)

TNF-α ve IL–1 inflamatuvar sitokinlerin prototipini oluşturur ve LPS'ye bağlı septik şok tablosunun oluşmasında son derece etkilidir. LPS ortaya çıkmasından 30 ile 90 dk içerisinde salınır ve ikinci sıra sitokinlerin, lipid mediyatörlerin ve reaktif oksijen metabolitlerinin salınımına neden olur. "High Mobility Group B1 (HMGB1)", makrofajlarda üretilen sitokin benzeri bir yapıdır ve TNF ve IL–1'e göre sepsisin daha geç evrelerinde ortaya çıkar. Bu yapının bloke edilmesi ile septik şoklu deneklerde mortalitede azalma gösterilebilmiştir. (22)

TNF-α ve IL-1'in, birçok biyolojik etkileri ortak olup sinerjistik etki gösterirler. Sepsiste, ateş, hipotansiyon şok patogenezinde rol oynayan en önemli sitokinlerdir. IL-10, TNF-α sentezini önler, akut faz reaktanlarının ve

immünglobülinlerin etkisini artırır, T lenfositlerinin ve makrofajların fonksiyonlarını inhibe eder. Bu sitokinler, bu özellikleri ile sepsiste inflamasyonu düzenleyici ve antiinflamatuvar rol oynarlar. (21)

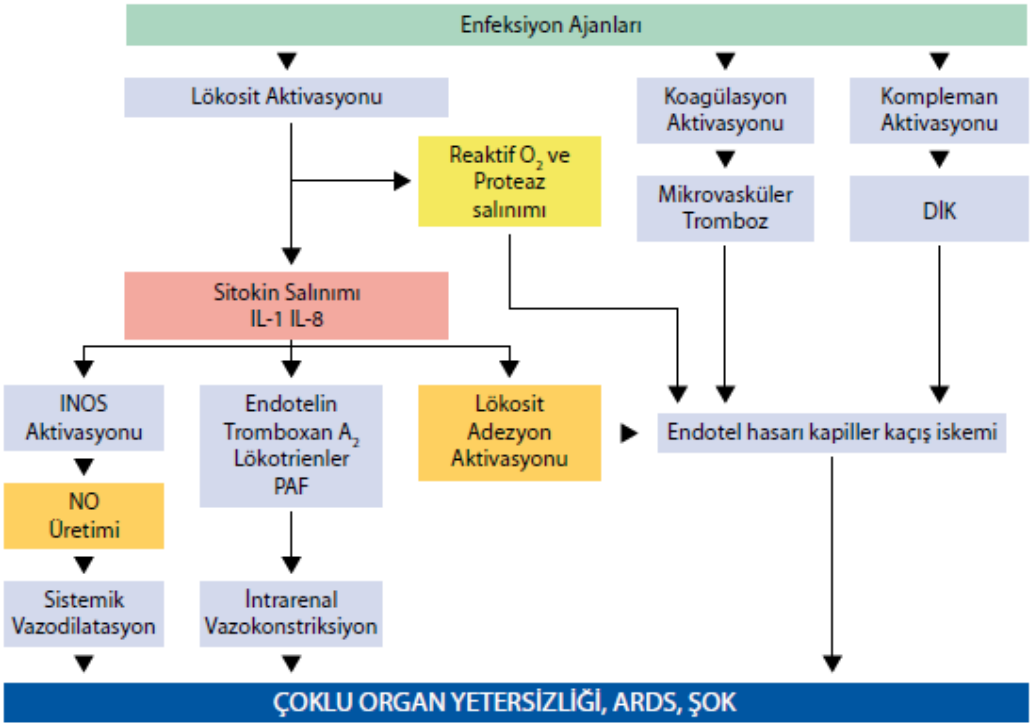
Endotoksin mononükleer fagositleri, endotel hücrelerini ve diğer hücreleri aktive eder. Böylece koagülasyon kaskadı ve kompleman sistemi (özellikle C3a ve C5a) de aktive olur. Sepsiste hedef organ damar endotelidir ve hemen bütün mediyatörler damarlar üzerine etkilidir. Kompleman sisteminin aktivasyonu da endotel hasarı yapar. Komplemanın aktivasyonu, damar permeabilitesini doğrudan veya nötrofilleri aktive etmek suretiyle bozar. Ayrıca degranülasyon esnasında nötrofillerden açığa çıkan toksik oksijen radikalleri ve lizozomal enzimler de endotel permeabilitesini artırır. Damar permeabilitesinin artması ve endotel hasarı, ekstravazasyon ve mikrotrombüslerin oluşumunu kolaylaştırır. Bir anatomik yerde yeterli endotel hasarı oluşunca, orada organ perfüzyonu bozulur ve organ yetmezliği gelişir. Eğer birçok yerde endotel hasarı oluşur ise multiorgan yetmezliği ile sonuçlanır. Hasar kontrol edilemez ise metabolik düzensizlik gelişir. Sepsiste en sık karşılaştığımız organ yetmezliği, akciğer, böbrek, karaciğer ve kalp yetmezliğidir. (21, 23)

TNF-α, IL-1 ve diğer endojen mediyatörler, kontakt system ve doku faktörünü aktive eder. Hegeman faktörünün aktivasyonu (faktör XII), plazminojeni plazmine çevirir ve intrinsek koagülasyonu başlatır. Fibrinojen, fibrine dönüşür. Bunu pıhtılaşma izler. Fibrinolitik aktivite artar. Genellikle şok ile beraber kontrol edilemeyen koagülasyonun aktivasyonu, tromboz, trombositlerin ve pıhtılaşma faktörlerinin (faktör II, V ve VIII) tüketimi ile

sonuçlanan DIC tablosu ortaya çıkar. Klinikte, deri ve mukoza kanamaları ile kendini gösterir. (24)

Sepsiste gelişen en önemli fizyopatolojik olaylardan birisi de septik şoktur. Septik şok en fazla Gram negatif bakteriyel sepsislerde görülür. Benzer klinik sendrom Gram pozitif bakteri, mantar, mikobakteri, riketsia ve protozoa infeksiyonlarında da görülebilir .Sepsiste açığa çıkan mediyatörlerin bir çoğu vazoregulatördür. Bunlar; prostaglandin I2 (PGI2), tromboksan A2 (TxA2), histamin, serotonin ve nitrik oksit (NO)'dir. Vazoaktif mediyatörlerin etkisi ile sistemik damar direnci azalır. Bu da dokulara giden kan akımının azalmasına neden olur. Ayrıca sepsiste miyokardı deprese eden bir madde "myocardial depressant substance" izole edilmiştir. Bu madde, ventriküler dilatasyona, miyokardda depresyona ve sol ventikül ejeksiyon fraksiyonunda (EF) azalmaya neden olur. Diğer mediyatörler de kalbi etkiler. TNF-α miyokardı deprese eder, PAF kalp üzerine negatif inotropik etkilidir ve arteriyel kan basıncını düşürür. Lökotrienler C4, D4 ve E4, koroner ve miyokard kan akımım azaltır. IL-2'de kardiyovasküler fonksiyon bozukluğuna yol açar. Sepsiste salınan bu mediyatörlerin etkisi ile hipotansiyon ve şok gelişir. (25, 26)

Sepsiste parankimal doku düzeyinde apoptozis önemli rol oynamaktadır. Akciğer, karaciğer, böbrek ve intestinal yapılarda apoptozis artışı saptanmıştır. (27)



Şekil 2. Sepsisin fizyopatolojisi (28)

2.1.4. Sepsisin Organlar Üzerine Etkileri

Sepsiste olayı başlatan neden mikroorganizmalar veya toksinleri olsalar da, organizmanın aşırı yanıtı yaygın inflamasyon, çoğul organ disfonksiyonu ve organ yetersizlikleri ile sonuçlanır. Sepsis, hemostatik balans bozukluğu, endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler bozukluklar, intrasellüler hemostazda bozulma ile karakterizedir. Sepsiste organ disfonksiyonları ve ölümden, hücre hipoksisi ve apopitoz sorumludur. (29)

Mikroorganizma ve ürünlerinin direk veya sitokinlerin indirek etkisine maruz kalan endotel hücreleri büyük değişikliğe uğrar. Adezyon molekülleri etkinliği artar, vazoaktif maddeler ve inflamatuvar mediyatörler salınır. Aşırı derecede aktive olan endotel bir süre sonra kendine zarar verir hale gelir. Mikrosirkülasyon bozulur, kapiller geçirgenlik artar. Sepsiste endotele zarar veren

diğer nedenler arasında; toksik oksijen radikallerini (reperfüzyon hasarında), yapışan nötrofillerden salınan süperoksit ve proteazları, endotel hücre apopitozunu sayabiliriz. (29)

Sepsiste inflamasyon, koagülasyon ve fibrinoliz arasındaki ilişkinin anlaşılmasıyla birlikte hemostatik mekanizmadaki dengenin bozulması ve DIC'in organ disfonksiyonu ve yetersizliklerinde anahtar görevi görmesinin ortaya çıkması, hem sepsis patofizyolojisi hem de tedavisinde yeni açılımlar oluşturmuştur. (29)

Sepsis patofizyolojisinde görülen bu olaylar pulmoner, renal, kardiyovasküler, gastrointestinal ve santral sinir sistemlerinde fonksiyon bozukluklarına neden olur. (21)

2.1.4.1. Sepsis ve Karaciğer

Sepsiste karaciğer tutulumu irdelenecek olursa çoklu organ yetmezliği sendromunun başlaması ve ilerlemesi sürecinde karaciğerin önemli yerinin olduğu görülür. Sepsisin indüklediği karaciğer disfonksiyonu primer ve sekonder bozukluk olmak üzere iki grupta incelenebilir. (30)

Primer karaciğer disfonksiyonu; şok ve resüsitasyon sonrası gelişir ve sistemik veya mikrosirkülatuvar bozuklukla ilişkili olarak ortaya çıkar. Hipoperfüzyon ve endotoksemi primer karaciğer hasarına neden olur. Hepatositlerdeki akut hücresel ve mitokondriyal hasar serum aminotransferaz enzimlerinde artışla kendini belli eder. (30)

Sekonder karaciğer fonksiyon bozukluğunun ise bakteri ya da endotoksinin tetiklediği inflamatuvar sitokinlerin aktifleşmesi sonucunda geliştiği düşünülmektedir. Endotoksinler dolaşıma sıklıkla karaciğer dışı primer enfeksiyon bölgesinden geçerler. Hatta bakteriyemi ve sepsis olmadan da makrofajlardan sitokin salınımı yoluyla kolestaz gelişebilir. Kupfer hücreleri, polimorfonükleer hücreler, eozinofiller, trombositler ve eksfoliye olmuş endotel hücrelerinin agregasyonu sinüzoid lümeninin obstrüksiyonuna neden olur. Sinüzoidlerin hipoperfüzyonuna neden olan bu durum, Disse aralığını genişletir. Diğer taraftan kemotaktik faktörlere ek olarak lipopolisakkaritin indüklemesiyle hepatosit ve kupfer hücrelerinden nötrofil kemotaksisine neden olan IL-8 salınımı olur. Bunun sonucunda adezyon moleküllerinde artış yoluyla nötrofil marjinasyonu ve adezyonu gerçekleşir. Bunu takiben serbest oksijen radikallerinde, proteazlarda artış ve hepatosit hasarı ortaya çıkar. Sepsis karaciğerinde histopatolojik olarak en sık saptanan bulgu intrahepatik kolestazdır. Ayrıca Kupfer hücre hiperplazisi, portal mononükleer hücre infiltrasyonları, fokal hepatosit değişiklikleri ve steatoz da görülür. Klinik tabloda böbrek ve karaciğer tutulumu sık olup mortaliteyi olumsuz yönde etkilemektedir. Patogenezdeki kilit noktalara yönelik geliştirilecek yeni tedavi yöntemleriyle mortalite ve morbidite oranlarının azalması hedeflenmektedir.(30)

2.1.5. Sepsiste Tedavi

2004 yılında Dellinger ve ark. tarafından yayımlanan ve 2008 yılında güncellenen sepsis ve septik şok yönetimi kılavuzuna göre sepsiste tedavi uygulaması şu şekildedir; (31)

1- İlk resüsitasyon – Amaca yönelik erken tedavi (ilk 6 saat)

2- Tanı

3 -Antibiyoterapi

4- Enfeksiyon kaynağının kontrolü

5- Sıvı tedavisi

6- Vazopressörler

7- İnotrop tedavi

8- Steroidler

9- Rekombinant insan aktive protein C

10- Kan ürünleri

11-Sepsis kaynaklı akut respiratuar distress sendrom (ARDS) ' unda mekanik ventilasyon

12- Sedasyon, analjezi, nöromusküler blokaj

13- Glisemi kontrolü

14- Renal replasman tedavisi

15- Bikarbonat tedavisi

16- Derin ven trombozu profilaksisi

17- Stres ülseri profilaksisi

18- Desteğin sınırlandırılmasının planlanması

2.2. Vitamin D

Vitaminler genelde organizmada sentez edilmeyip dışardan alınması gereken ve enzim reaksiyonlarında bir kofaktör gibi görev yapan bileşiklerdir. Genelin aksine vitamin D'nin esas kaynağını gıda yolu dışardan almak değil güneş ışığına maruziyet sonucu deride sentezlenmesi oluşturur. D vitamini aile üyeleri siklopentanoperhydrofenanthene halkasından derive olurlar ve steroide benzerler. (32)

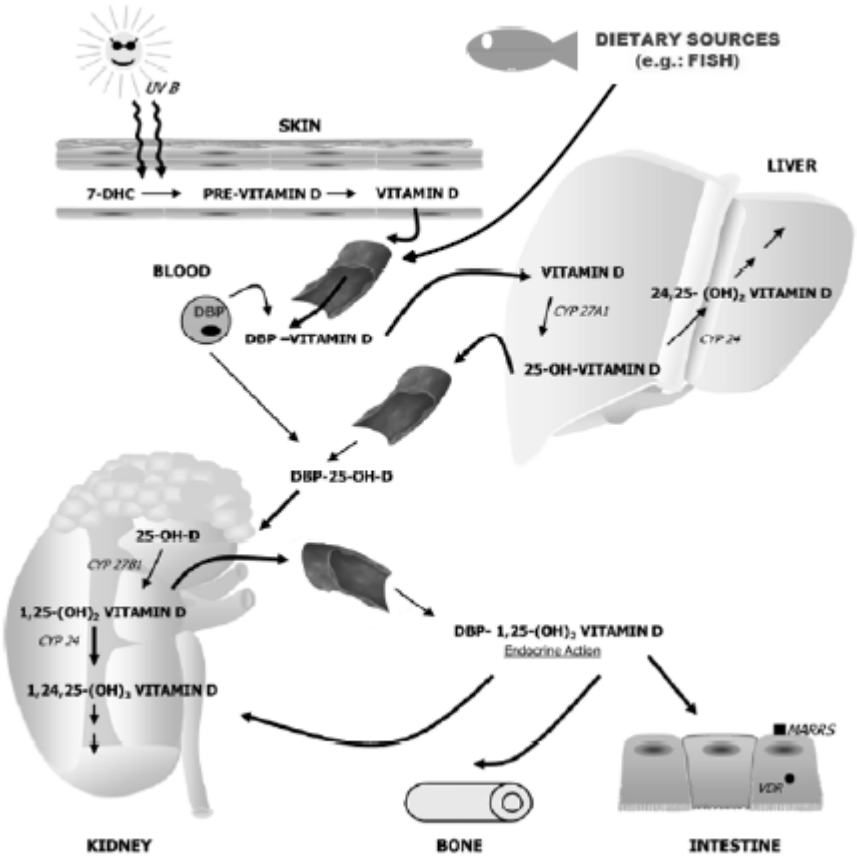
Günlük el ve yüzün ortalama 20 dakika güneşe maruziyeti yeterli olup günlük 200 internasyonal unite (IU) oral alıma eşit olduğu tahmin edilmektedir.(33)

2.2.1. Vitamin D'nin Formları

Vitamin D'nin farklı formları mevcuttur. Bunlar Vitamin D_1 (lumisterol bağlı ergokalsiferol) , Vitamin D_2 (ergokalsiferol) , Vitamin D_3 (kolekalsiferol) , Vitamin D_4 (22-dihidroergokalsiferol), Vitamin D_5 (sitokalsiferol)'dür. Bir ön hormon olan vitamin D'nin insan vücudunda kolekalsiferol ve ergokalsiferol olmak üzere iki kaynağı vardır. Kolekalsiferol 290-310 nm dalga boyundaki ultraviole B ışınlarının etkisiyle deride hayvansal kaynaklı olan 7-dehidrokolesterolden yapılır ve bu endojen üretim vitamin D'nin temel kaynağıdır. Ergokalsiferol ise bitkisel sterol olan ergosterolden sentezlenir. (34)

2.2.2. Vitamin D'nin Metabolizması

UV dalgaları 7-dehidrokolesterolün vitamin D3 (kolekalsiferol)'e dönüşümünü sağlar. Vitamin D ayrıca gıdalar yolu ile de alınabilir. Gıdalar ile vitamin D2 (ergokalsiferol) veya vitamin D3 formlarında alınır. Vitamin D2 mantar steroidi olan ergosterolün radyasyon etkisi altında kalmasıyla türemiştir. Vitamin D'nin her iki formu dolaşımda bulunan D vitamini bağlayan protein (DBP) yardımı ile karaciğere gider. Vitamin D karaciğerde bulunan 25-hidroksilaz enzimi ile 25-hidroksivitamin D (kalsidiol = 25(OH)D) formuna çevrilir. 25(OH)D DBP aracılığı ile böbreklere taşınır ve böbreklerde bulunan 1-α-hidroksilaz enzimi ile aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D (kalsitriol =$1,25(OH)_2D$) formuna dönüştürülür. Aktif formun oluşumunda hedef organ böbreklerdir çünkü meydana gelen olaylar kalsiyum metabolizmasının sinyallerine göre düzenlenir. Eğer $1,25(OH)_2D$ yeterli ise 25(OH)D'nin bir kısmı 24-$25(OH)_2D$ (kalsitroik asit)' e dönüştürülür. Bu daha az aktiftir ve katabolize edilir. (35, 36)



Şekil 3. D vitamini metabolizması (37)

2.2.3. Vitamin D'nin Görevleri

D vitamininin etkilerine nükleer/sitoplazmik vitamin D reseptörü (VDR) aracılık eder. Steroid/tiroid hormon reseptör ailesinin bir üyesi olan olan VDR birçok genin transkripsiyonunu aktive eder. VDR'nin 38' den fazla doku tipinde dağılımı vardır ve buralarda kemik metabolizması, oksidatif stres, kronik hastalıklar ve inlamasyon üzerine etkili olan genleri kontrol eder. (38)

Vitamin D VDR'ye bağlanınca retinoid X reseptör (RXR) ile dimerizasyon olur ve vitamin D responsing element (VDRE) bölgesine bağlanarak etkisini gen düzeyinde gösterir. (39)

2.2.3.1. Vitamin D'nin Mineral Metabolizmasına Etkisi

D vitamini bağırsaktan kalsiyum emilimini artırır. Bağırsak epitelyum hücrelerinde VDR'ye bağlanan D vitamini kalsiyum bağlayan proteinin sentezini arttırarak kalsiyumun aktif transportunu arttırır. Aktif transport yanında kalsiyum bağırsaklarda hücre kenarlarında difuzyon yoluyla da emilir. D vitamini varlığında diyetteki kalsiyumun % 30-40'ı emilirken D vitamini yetersizliğinde kalsiyumun % 10-15'i emilir. D vitamini bağırsaklardan fosfor emilimini de arttırır. D vitamini kemik dokusu üzerine etki ederek kalsiyum mobilizasyonunu arttırır. Bunun için parathormon (PTH) ile birlikte hareket eder. Aktif D vitamini kemik dokusunda osteoblastlardaki VDR'ye bağlanarak osteoblastlarda reseptör aktivatör nükleer faktor-kappa beta (NF-κB) ligandı (RANKL) proteininin sentezini arttırır. Bu etkileşim preosteoklastların olgun osteoklastlara dönüşmesini sağlar. Olgun osteoklastlar çeşitli hidrolitik enzimler salgılayarak kemik matriksinden kalsiyum mobilizasyonunu ve bunun yanında diğer minerallerin de dolaşıma salınmasını sağlarlar. (40)

D vitamini böbreklerden de kalsiyum emilimini arttırır. Distal tübül hücrelerinden filtre edilen kalsiyumun % 1'i emilir. D vitamini PTH ile birlikte distal tübül hücrelerine etki ederek etkisini gösterir. Kalsiyum düşüklüğünde ilk aşamada D vitamini bağırsaklarda kalsiyum ve fosfor emilimini arttırır, eğer bu

yeterli olmaz ise PTH kemik kalsiyumunu mobilize etmek için D vitamini sentezini arttırır. PTH ve hipofosfatemi böbreklerde $1,25(OH)_2D$ vitamini sentezini arttıran önemli faktörlerdir. PTH renal proksimal ve distal tübül hücrelerinde kalsiyum emilimini arttırırken fosfor atılımını arttırır. Hipofosfatemi PTH'dan bağımsız olarak böbreklerde $1,25(OH)_2D$ vitamini sentezini arttırır. (41)

2.2.3.2. Vitamin D'nin İmmünolojik Etkileri

Vitamin D'nin immuniteye etkisi hem antimikrobiyal fonksiyonları destekleyerek hem de inflamatuar aktiviteyi baskılayarak olur. Vitamin D'nin immun regülasyondaki önemi giderek artmaktadır. 25(OH)D vitamininin 1α-hidroksilasyonu beyin, meme, kolon, prostat ve inflamasyon bölgesindeki immün sistem hücreleri gibi böbrek dışı bölgelerde de gerçekleşir. Lokal olarak sentezlenen 25(OH)D vitamini parakrin etkiyle immün cevabı düzenler. 25(OH)D vitamini, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve aktive T ve B hücreleri gibi immün sistem hücreleri dahil çoğu hücre tipinde yer alan nükleer VDR'lere bağlanır. (42)

Vitamin D'nin immün sistem üzerinde farklı etkileri vardır. Doğal immün sistem epitel bariyeri ile başlamaktadır. Antimikrobiyal peptidler (AMP) de doğal immün sistemin bir parçasıdır ve antibakteriyel, antiviral ve antifungal rolleri vardır. Vücudumuzda kathelisidinler ve defensinler olmak üzere iki grup AMP vardır. Bu peptidler bakteri hücre membranlarında bulunan porların yapısını etkileyerek bakterisidal etki gösterirler. Sadece insan vücudunda bulunan bir kathelisidin olan hCAP-18 (LL-37) için D vitaminine bağlı bir mekanzima

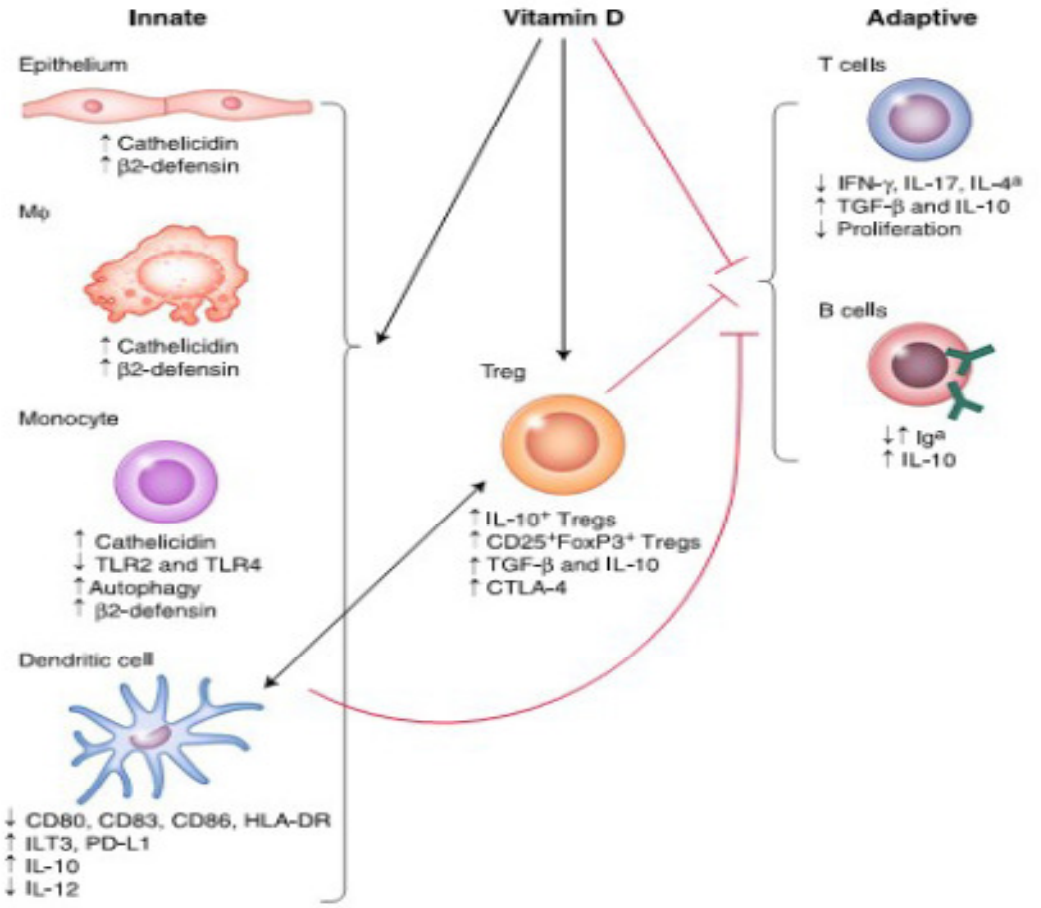
tanımlanmıştır. Makrofajlar tarafından optimal kathelisidin üretilebilmesi için yeterli vitamin D konsantrasyonu olması gerekmektedir. (43)

Makrofajlar ve dendritik hücreler doğal ve adaptif immün sistem arasında bağ oluşturan vitamin D'nin immün sisteme etkisinde önemli rol oynayan hücrelerdir. Antijenlerin tanınmasıyla antijen sunan hücreler (APC) aktive olur bu da adaptif immüniteyi ortaya çıkarır. D vitamini tarafından CD80,CD83, CD86ve MHC class-II antijenlerinin ekspresyonunun azaltılması ile makrofaj/monositlerin antijen sunma özellikleri azalır. Proinflamatuar sitokin olan interlökin-12 (IL-12) üretimleri azalır, anti-inflamatuar sitokin IL-10 yapımları artar. Bunun sonucunda Th1 hücre cevabında zayıflamaya görülürken Treg hücreleri üzerindeki uyarıcı etkisi devam etmektedir. (44)

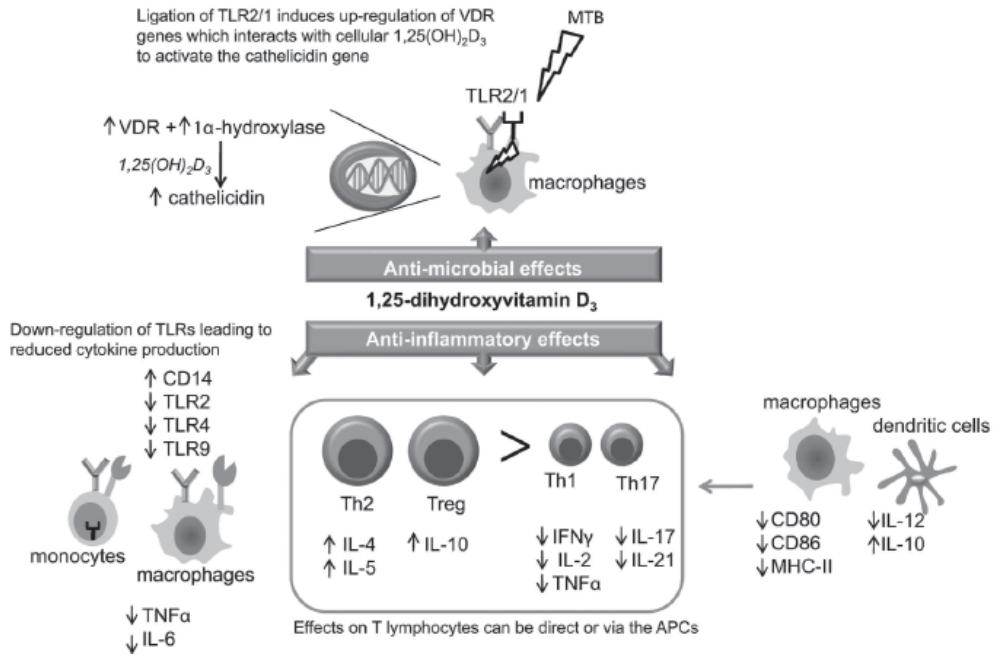
D vitamininin immünite üzeindeki önemli bir rolü de IL-2 üretimini baskılayarak T hücre proliferasyonunu inhibe etmesidir. D vitamininin Th1 ve Th17 proinflamatuar sitokin cevabını baskıladığı gösterilmiştir. D vitamini Th1 cevabını baskılarken IL-4, IL-5, IL-10 üretimini artırarak ve Th2 hücrelerini yöneterek proinflamatuar cevabı kontrol etmektedir. (44)

Treg hücreleri immün cevabın baskılanmasından sorumludur böylece aşırı inflamasyonu sınırlar ve doku hasarını önler. D vitamininin Treg üzerindeki etkisi önceleri sadece APC aracılığıyla olduğu düşünülürken Jeffery ve arkadaşları yaptıkları çalışmada vitamin D'nin CD4+CD25-T hücrelerine direkt etki ederek inflamatuar sitokin üretimini baskıladığını ve immün süpresyon etkisi olan Foxp3+ Treg ve CTLA-4 oluşturduğunu göstermişler. (44)

D vitamini monositlerde TLR'lerden TLR2 ve TLR4'ün ekspresyonunu inhibe eder. TLR erken inflamatuar immün cevabın başlamasında önemlidir. D vitamin ile monositlerdeki TLR ekspresyonunun azalması proinflamatuar sitokinlerden olan TNF-α' nın üretimini azaltır. (45)



Şekil 4. Vitamin D'nin immün sistem üzerine etkileri (46)



Şekil 5. Vitamin D'nin immün sistem üzerine etkileri (44)

2.2.3.2.1. Vitamin D ve Sepsis

Sepsisli hastalarda D vitamini eksikliği prevalansının yüksek olduğu tespit edilmiştir. D vitamini eksikliğinin sepsis için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. (47)

Hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada vitamin D uygulanmasının sepsise bağlı gelişen DIC tablosunda kan koagulasyon parametrelerini düzenlediği görülmüştür. LPS ile sepsis oluşturulan grupta düşmüş olan trombosit, fibrinojen ve antitrombin-3 düzeylerinin, öncesinde vitamin D verilip sonra sepsis oluşturulan grupta anlamlı olarak arttığı görülmüş. (48)

İnvitro ve hayvanlar üzerinde oluşturulan sepsis modelinde vitamin D verilmesinin proinflamatuar sitokin düzenlenmesinde , koagülasyon sistemi üzerine, vasküler endotelin aktivasyonu üzerine etkilerinin sepsis sendromu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. (49)

Vitamin D sepsis patogenezinde ve sepsise bağlı DIC tablosunda sitokin cevabını düzenleyerek rol alabilir.(50) Sepsiste proinflamatuar süreç başlangıçta istenilen bir durumken hiper inflamatuvar sürecin uzamış olması olumsuz sonuçları getirmektedir. Aşırı inflamasyon durdurulamadığında hücre ve organ hasarı gelişmektedir. Vitamin D 'nin antimikrobiyal ve immün düzenleyici kapasitesi sepsisin tedavisinde umut vermektedir. (44)

Sadeghi ve arkadaşları yaptığı çalışmada D vitamininin monositlerde TLR2 and TLR4 ekspresyonunu azalttığını bunun da TNF-α üretiminde bozulma ile sonuçlandığını göstermişler. Sepsiste gram negatif bakterinin LPS'i TLR4 ligandı olarak görev yapar ve TNF-α ve doku faktörü (TF) salınımına neden olur. Bu da tromboza neden olarak donuçta DIC tablosunun gelişmesine neden olur. D vitamini TLR4 üzerindeki etkisi ile doku faktörü salınımını sınırlamaktadır. (44)

Qi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LPS ile oluşturulan sepsiste D vitamini tedavisiyle proinflamatuar sitokin olan IL-12 ve INF-γ'nın azalırken IL-10'un arttığı ve D vitamini uygulanan ratların daha fazla yaşadığı görülmüş. (44)

Bukoski ve Xue tarafından ratlarda yapılan çalışmada ise vitamin D'nin LPS tarafından indüklenen vasküler endotelin aktivasyon ve vazodilatasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş. (44)

Jeng ve arkadaşları vitamin D ile kathelisidin seviyeleri arasında bir ilişki olduğunu göstermişler. Ağır hastalarda sağlıklı kişilere göre serum vitamin D ve DBP konsantrasyonlarının düşük olduğu görülmüş. Ağır hastaların %95'inden fazlasında vitamin D düzeyini eksiklik olarak kabul edilen <30 ng/mL düzeyinde iken sağlıklı bireylerde bu rakamın %60 olduğu görülmüş. (44)

Yapılan çalışmalarla LPS'ye endotelyal cevapta vitamin D'nin rolü olduğu ortaya konmuştur. LPS endotel hücrelerinden transkripsiyon faktör NFkB, proinflamatuar sitokinler (IL-6 ve IL-8) ve CCL5(RANTES) adlı kemokinin üretimini sağlar. Equils ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada insan endotel hücrelerine D vitamini uyguladıktan sonra LPS ile stimüle ederek bu moleküllerin sadece LPS'ye maruz bırakılan gruba göre anlamlı ölçüde inhibe olduğu gösterilmiş. (51)

Horiuchi ve arkadaşları D vitamini ve LPS uygulanan farelerde kontrol grubuna göre inflamatuar molekül olan iTXB2'nin ekspresyonunun azaldığını ve mortalitenin düştüğünü göstermişler. (52)

Asakura ve arkadaşları LPS uygulanan ratların tedavisinde düşük molekül ağırlıklı heparin ile D vitaminini karşılaştırdıklarında D vitamininin organ disfonksiyonunu gösteren işaretçileri ve homeostatik parametreleri düzenlemede eşit yada daha iyi olduğunu bulmuşlar. (48)

2.2.3.3. Vitamin D'nin Kanser Üzerine Etkisi

Ekvatordan uzaklaştıkça, kanser riskinde ve insidansında artış gözlemlenmiştir. (53)

Ayrıca yaz aylarında tanı alan kanserlerin, sağ kalımlarının daha da iyi olduğu gösterilmiştir. (54)

Kanser gelişme riskinin artmasının ve daha yüksek enlemlerde daha kötü prognoza sahip olmasının en olası açıklaması güneşe maruziyetin azalması sonucu oluşan vitamin D eksikliğidir. (55)

Vitamin D'nin kansere karşı koruyucu etkisini, hem anti-proliferatif etkiyle hem de hücrelerin differansiyayonunu düzenleyerek gösterdiği düşünülmektedir. Vitamin D aynı zamanda tümörün yayılımını kolaylaştıran telomeraz ekspresyonunu, apoptozisi ve anjiyogenezi inhibe etmektedir. (56)

Ayrıca vitamin D, DNA'yı tamir eden genlerle, genomun bütünlüğünü sağlayan genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır. (57)

Kolon, meme, over ve prostat kanserleri vitamin D eksikliği ile ilişkili bulunmuştur. Vitamin D alımının artmasıyla hem meme hem de kolon kanseri riskinde % 50, prostat kanseri riskinde % 49 ve over kanseri riskinde ise % 36 azalma tespit edilmiştir. (58)

2.2.3.4. Vitamin D'nin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

Vitamin D eksikliği ile insülin rezistansı, hipertansiyon, vasküler kalsifikasyon, inflamasyon ve sol ventriküler hipertrofi gibi kardiyak riskler ilişkili bulunmuştur. Aynı zamanda vitamin D eksikliği konjestif kalp yetmezliğinin insidansında ve kalp yetmezliği mortalitesindeki artışla ilişki bulunmuştur. (59)

Vitamin D eksikliği sonucu oluşan primer veya sekonder hiperpara-tiroidizm , insülin rezistansı, inflamasyon, artmış karotid intima-media kalınlığı ve kardiyak olaylarla ilişkili bulunmuştur. (60)

Ulusal Sağlık ve Beslenmenin İncelenmesi (NHANES) çalışmasında, vitamin D düzeyi <18ng/mL olması, kardiyak olaylarda % 40 artış ile ilişkilendirilmiştir. (61)

Hipertansiyon ile vitamin D eksikliğinin beraber görüldüğü durumlarda, vitamin D eksikliğinin düzeltilmesiyle kan basıncı düzeylerinde düzelmeler saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, vitamin D düzeylerinin artmasıyla, sistolik kan basıncında ortalama 6 mm Hg düşüş saptanmıştır. (62)

Vitamin D eksikliğinin aynı zamanda kalp yetersizliği ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir. Koroner anjiyografi yapılan 3299 hasta, prospektif olarak yedi yıl süreyle takip edilmiştir. Bakılan ilk vitamin D düzeylerinin düşüklüğü, hem kalp yetersizliği ile hem de ani kardiyak ölüm riskiyle ilişkili saptanmıştır. NHANES çalışmasında, vitamin D düzeyi normal olan kişilere göre, vitamin D yetersizliği saptananlarda kalp yetersizliğinden ölümlerde 2 kat, vitamin D eksikliği olanlarda ise 3,4 kat risk artışı saptanmıştır. (63)

2.2.3.5. Vitamin D'nin Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM) Üzerine Etkileri

Framingham Offspring çalışmasında, vitamin D düzeyi en düşük çeyrekte olan hastalarla karşılaştırıldığında, vitamin D düzeyi en yüksek çeyrekte olan hastalarda T2DM insidansında % 40 azalma tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek seviyede vitamin D değerleri olan hastaların açlık glukoz seviyeleri anlamlı derecede düşük saptanırken daha az oranda insülin rezistansı saptanmıştır. (64)

Büyüme çağındaki obez gençler üzerinde yapılan bir çalışmada, vitamin D düzeyi 15 ng/mL'nin altında olanlarda, oral glukoz testinde insülin seviyesinin artarak insülin duyarlılığının azaldığı gösterilmiştir. (65)

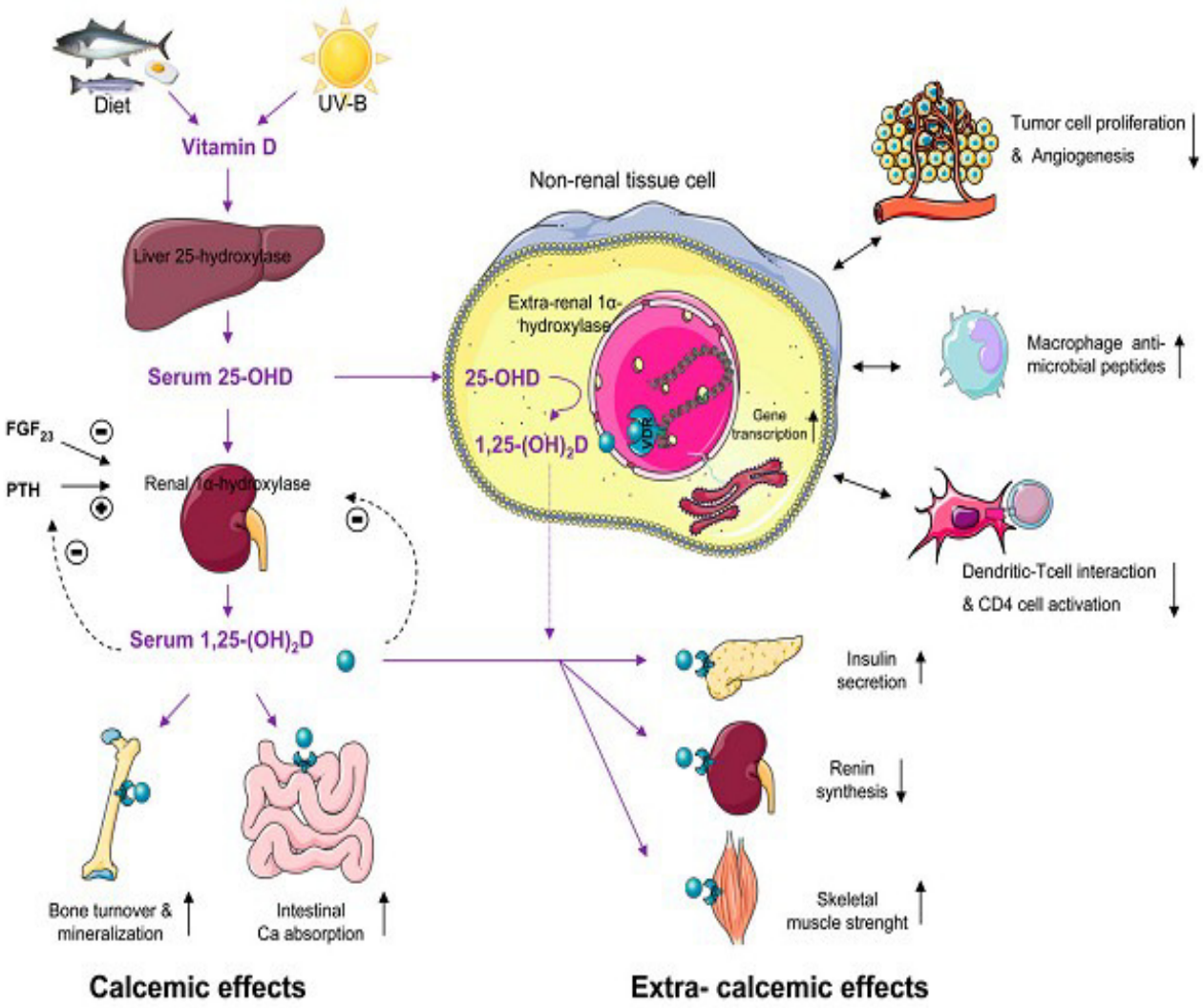
Yapılan prospektif çalışmalarda vitamin D tedavisi ile T2DM insidansının azaldığı gösterilmiştir. Örneğin, Nurse's Health calışmasında, günlük en az 800

IU vitamin D alanların, günlük 200 IU alanlara oranla T2DM insidansının % 33 azaldığı saptanmıştır. (66)

NHANES çalışmasında ise, vitamin D düzeyi ile HbA1c düzeyi arasında ters bir ilişki saptanmıştır. (67)

T2DM'nin kronik mikrovasküler komplikasyonlarının vitamin D eksikliği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. NHANES çalışmasında vitamin D yetersizliği olanlarda % 79, vitamin D eksikliği olanlarda ise % 85 oranında diyabetik nefropatinin arttığı gösterilmiştir. Bu ilişki ırk, cinsiyet, hipertansiyon, kolesterol seviyesi, sigara, renin-anjiyotensin sistemini bloke eden ilaçları kullananlara göre düzenlemeler yapıldıktan sonra da devam etmiştir. (68)

Diyabetik nefropatisi olanlarda vitamin D düzeyi ile diyabetik retinopati arasında ters bir ilişki saptanmış olsa da, diyabetik retinopati ile vitamin D düzeyi arasında bağımsız bir ilişki saptanmamıştır. Yine vitamin D tedavisi ile diyabetik nöropati ağrısının azaldığı saptanmış olsa da, diyabetik nöropati ile vitamin D eksikliği arasında direk bir ilişki saptanmamıştır. (69)



Şekil 6. Vitamin D'nin görev aldığı yerler (70)

2.2.4. Vitamin D'nin Düzeyleri

Biyolojik aktif form $1,25(OH)_2D$ vitamini ideal ölçüm için uygun değildir. Çünkü yarı ömrü 4-15 saat kadar kısa ve sirkulatuar düzeyleri 25(OH)D vitamininden 1000 kat düşüktür. Kişide vitamin D düzeyinin normal, eksik veya fazla olduğunu anlamak için 25(OH)D vitamini düzeyine bakılmalıdır. Çünkü 25(OH)D vitamini yarı ömrü 2-3 hafta olan major sirkulatuar formdur. Hem vitamin D alımını ve hem de endojen yapımını göstermektedir. (71)

Bulunulan enlem, pigmentasyon, mevsim, günün farklı saatleri gibi faktörlerden etkilenmekle birlikte bacakların ve kolların 10-30 dakika arasında haftada 2 gün güneş görmesi ihtiyacımız olan D vitamininin sentezlenmesi için yeterlidir. D vitamini eksikliği gelişmemesi için çocukların ve yetişkinlerin 50 yaşlara kadar günde 200 IU, 51-70 yaşlarında günde 400IU, 70 yaş üstünde ise günlük 600 IU D vitamini alması önerilmektedir.(72)

2004 yılında Mayo klinik tarafından 25-OH vitamin D düzeyi <10 ng/mL ciddi eksiklik, 10-25 ng/mL hafif-orta şiddette eksiklik, 25-80 ng/mL optimum D vitamini düzeyi olarak tanımlanmıştır.(73)

8 hafta boyunca 50.000 IU D vitamini haftada bir alınması, sonrasında her 2-4 haftada bir 50.000 IU D vitamini alınması tedaviyi oluşturmaktadır.(74)

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, organizmada normal aerobik solunum gibi fizyolojik durumlarda oluşabildikleri gibi, hava kirliliği (azot oksitler, ozon, kükürt dioksit, sigara dumanı), çeşitli entoksikasyonlar (karbon monoksit, alkol, insektisidler, çeşitli ilaçlar), hemorajik ve iskemik durumlar, allerji, enfeksiyonlar, radyoaktiviteye maruz kalım, yaşlanma ve stres gibi değişik birçok nedenle de ortaya çıkabilmektedirler. (75)

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron bulunduran moleküller olarak tanımlanırlar. Genellikle kararsız ve çok reaktiftirler. Bu yüzden çevrelerindeki atom ve moleküllere saldırırlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. (76)

Canlı yapılarda yaygın olarak bulunan oksijenin dış yörüngesinde iki adet eşleşmemiş elektron bulunur. Bu nedenle oksijen, bir 'biradikal' olarak da nitelendirilmektedir ve organizmada gerçekleşen kimyasal reaksiyonlarda rol alan elementlerin başında gelmesi nedeniyle bir serbest radikale dönüşmeye her zaman aday görünmektedir. Moleküler oksijen üzerindeki değişiklikler ile meydana gelen 'serbest oksijen radikalleri' veya diğer adıyla 'reaktif oksijen türevleri' (ROT) serbest radikaller içerisinde karşımıza oldukça sık çıkan bir sınıfı oluşturmaktadır. Bu şekilde oluşabilen başlıca ROT'lar, süperoksit anyonu ($O2^{\bullet -}$), hidrojenperoksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalidir (•OH). (77)

2.3.1 Reaktif Oksijen Türleri

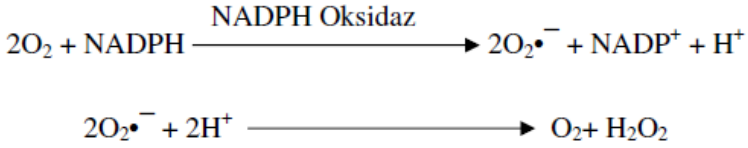
2.3.1.1. Süperoksit Radikali

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle $O2^{\bullet -}$ meydana gelir. Süperoksit, nitrik oksitle reaksiyona girerek azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali (•OH), nitronyumiyonu (NO2+) gibi toksik ürünlere dönüsebilen peroksinitriti (ONOO-) oluşturur. Süperoksit indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyon reaksiyonu ile de oluşabilmektedir. Bu reksiyonlar geri dönüşümlüdür.(75)

$$Fe_2^{+} + O_2 \longleftrightarrow Fe_3^{+} + O_2\bullet^{-}$$

$$Cu^{+} + O_2 \longleftrightarrow Cu_2^{+} + O_2\bullet^{-}$$

Nötrofillerde süperoksit radikali NADPH oksidaz enzimi aracılığı ile yapılır. Önce fagosit uyarılır ve sonra NADPH oksidaz enzimi aktive olur, redükte piridin nükleotidlerinden (NADPH) iki elektron iki molekül oksijene transfer edilir. Böylece iki molekül $O2^{\bullet -}$ oluşur. (75)



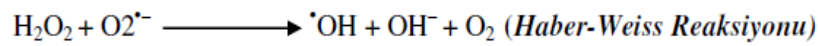
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

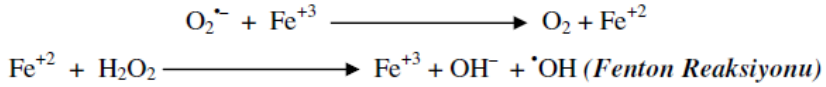
H_2O_2'in üretimi süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile olmaktadır. H_2O_2 radikal değildir. Süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. (78)



2.3.1.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali Haber–Weiss reaksiyonu, Fenton reaksiyonu ya da suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşan son derece reaktif bir oksidandır. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına sebep olur. (75)





2.3.1.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$)

Radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve •OH kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. (76)

2.3.1.5. Hipokloröz Asit (HOCl)

Enzimatik olarak nötrofiller tarafından üretilir, güçlü bir oksidandır. Aktive olan nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller süperoksit üretirler. Özellikle nötrofiller, içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığı ile süperoksitin dismutasyonuyla oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonuyla birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl' e dönüştürür. (79)

2.3.1.6. Nitrik Oksit (NO)

Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığı ile L-arjinin' den sentezlenir. NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, oluşan reaktif oksijen türleri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturmakta ve bunun da ileri dekompozisyonu ile •OH radikali oluşumuna yol açmaktadır. (80)

2.3.2. Serbest Radikallerin Etkileri

2.3.2.1. Membran lipitlerine etkileri (Lipid peroksidasyonu)

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Reaktif oksijen radikali ile hücre membran fosfolipidlerinin yapısını oluşturan poliansatüre yağ asitleri reaksiyona girerek lipid hidroperoksitlerini oluşturur. Bu olaya lipid peroksidasyonu denir. Lipid hidro peroksidasyonu sonucu aldehit, pentan, etan gibi ürünler oluşur. Bunlardan en toksik olanı aldehitlerdir. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asidle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Dokudaki ve kandaki MDA seviyesi lipid peroksidasyonu ve lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. MDA, hücre için çok toksik bir molekül olup aynı zamanda mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olarak kabul edilir. (81, 82)

2.3.2.2. Proteinlere etkileri

Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asid kompozisyonlarına bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, methionin, sistein gibi sülfür bağına sahip amino asitler daha fazla olmak üzere amino asit türü ve dizilimine göre serbest radikallerden etkilenirler ve yeni serbest radikaller oluştururlar. (83)

2.3.2.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek tek ya da çift dal kırıklarına neden olurlar. DNA üzerinde etki ile hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. (84)

2.3.2.4. Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2, peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelir. Okzoaldehidler DNA, RNA, proteinlere bağlana-bilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterir. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynar. Serbest radikaller, bu tür etkilerinden dolayı çok çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynar. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner arter hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri, kas ve göz hastalıkları, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalıkta serbest radikal üretiminin

arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir.(85)

2.3.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller, organizmada normal hücre metabolizması sırasında oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluşabildiği gibi çeşitli dış kaynaklı nedenlerle de oluşabilir. Serbest radikal olusturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

Tablo 1. Hücrelerde serbest radikal kaynakları (86)

ENDOJEN KAYNAKLAR	EKZOJEN KAYNAKLAR
✓Mitokondriyal elektron transport zinciri ✓Mikrozomal elektron transport zinciri ✓Oksidan enzimler ✓Ksantin oksidaz ✓İndolamin dioksijenaz ✓Galaktoz oksidaz ✓Siklooksijenaz ✓Lipoksijenaz ✓Monoamin oksidaz ✓Fagositik hücreler ✓Nötrofiller ✓Monositler ve makrofajlar ✓Eozinofiller ✓Endotelyal hücreler ✓Otooksidasyon reaksiyonları (ör, Fe^{+2})	✓Redoks siklus bileşikleri (ör, paraquat, doksorubisin) ✓İlaç oksidasyonları (ör, parasetamol) ✓Sigara ✓Güneş ışığı ✓Isı şoku ✓Okside glutatyon

2.4. Antioksidan Sistem

Canlı organizmalarda, oksidatif harabiyetin önlenmesi, sınırlanması ya da kısmen düzeltilmesini sağlayan koruyucu mekanizmalar vardır. Oksidan ürünlere karşı korunma, oluşan radikallerin detoksifikasyonu, radikal reaksiyonların sona erdirilmesi ve radikal oluşumunun sınırlandırılması şeklinde gelişir.

Düşük konsantrasyonlarda, okside olabilecek bir substratın oksidasyonunu geciktiren veya inhibe eden maddeler antioksidan, olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar, biyomoleküllerde bozulmaya neden olan ROT'ları ortadan kaldırabilen, oksidatif hasarın yayılmasını engelleyen maddelerdir. Farklı organ, hücre ve hücre organellerinde farklı ROT'lara karşı, farklı antioksidanlar bulunmaktadır. (87)

2.4.1. Hücreiçi Enzimatik Antioksidan Savunma

Hücreiçi ROT'ların başlıca detoksifikasyonu enzimatik yollarla sağlanır. Enzimatik antioksidanlar aktif merkezlerinde bakır, çinko, mangan, demir, selenyum gibi metaller içerirler. SOD, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi süperoksit ve hidrojen peroksiti temizleyen spesifik enzimler antioksidan savunmanın önemli bölümünü oluşturur. (87)

2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Organizmada serbest radikallere karşı ilk savunma süperoksit dismutaz enzimiyle gerçekleşir. Süperoksit dismutaz süperoksit radikallerinin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Süperoksit genel olarak,

zincirleme radikalik tepkimeleri baslatır ve tepkimeler boyunca hidroksil radikali, $^{1}O2$ ve organik radikallerin olusumuna neden olur. Radikalik zincir tepkimelerinin baslaması ve tepkimeler boyunca $O2^{\bullet -}$ ' den çok daha reaktif ve toksik etkili radikal olan hidroksil radikalinin oluşması SOD tarafından engellenir. SOD H_2O_2 üretimine yol açarak O_2 radikallerinden organizmayı koruruken aynı zamanda OH radikali oluşumunu da engeller. (88)

2.4.1.2. Glutatyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)

Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş olan glutatyona (GSH) dönüşmesi gerekir. Glutatyon redüktaz, NADPH varlığında indirgenme reaksiyonunu katalizler. Redükte glutatyonun yüksek konsantrasyonları ve okside glutatyonun düşük düzeyleri organizmanın yaşamı için gereklidir. Yüksek oksidatif strese maruz kalan eritrositlerde kullanılan glukozun bir kısmı NADPH eldesi için pentoz fosfat yoluna yönlendirilir. Eritrositlerde bu yol fonksiyon göremezse hücre lizisi ve sonuçta anemi oluşur. Glutatyon redüktaz sitozol ve mitokondride lokalizedir. (81)

2.4.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz, glutatyonun indirgenmiş halini elektron vericisi olarak kullanarak, peroksitlerin detoksifikasyonunda merkezi bir rol oynar. Lipid peroksidasyonun başlamasını ve gelişmesini önler. Bu enzimler aminoasitlerinin aktif merkezlerinde selenosistein içerip içermemesine göre ikiye ayrılırlar.

Selenyum içeren tip peroksit detoksifikasyonunda önemli etkinliğe sahip olan enzimdir. Selenyum içermeyen tip ise antioksidan etkinliği düşüktür ve sadece lipid peroksitlerini metabolize eder. H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri indirgeme görevi sırasında glutatyonu elektron donörü olarak kullanır. (89, 90)

2.4.1.4. Katalaz (CAT)

Demir içeren bir enzimdir. Katalaz 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Buna ek olarak her alt birimde bir molekül NADPH içerir. NADPH, enzimin kararlılığında rol oynar. Katalaz esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğundur, ama aynı zamanda enzim sitokrom sistemi ihtiva eden tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Katalazın aktivitesi; karaciğer, böbrek ve eritrositlerde yüksektir. Katalaz enzimin fonksiyonu, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. (75, 91)

CAT ve GSH-Px hücre içi H_2O_2 detoksifikasyonunda görev alır. Düşük düzeylerde GSH-Px daha etkin iken, H_2O_2 oluşumunun arttığı durumlarda daha çok CAT görev alır. CAT en çok peroksizomlarda, GSH-Px ise sitozol ve mitokondride yer alır. (92)

2.4.1.5. Glutatyon S-Transferaz (GST)

Glutatyon (γ glutamil sisteinil glisin) glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Glutatyon genelde GSH olarak kısaltılır; SH sisteinin sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır. Glutatyon ile

ksenobiyotiklerin reaksiyonunu katalizleyen enzimlere "*glutatyon S-transferazlar*" kısaca "*GST*" denir.

Ksenobiyotik metabolizmasında glutatyonun rolü; faz I enzimlerince oluşturulan reaktif türlerin glutatyon ile konjugasyona girmesi ve sonuçta hücre makro-molekülleri (DNA, RNA, protein) ile bağlanmasını engelleyerek hücre hasarını önlemesi şeklinde gerçekleşmektedir. Ksenobiyotiğin reaktif türleri, bir proteine bağlanıp onu değişikliğe uğratıp antijenik özelliğini değiştirebilir. Ksenobiyotik bir hapten yani tek başına antikor sentezini uyarmayan bir molekül gibi davranıp, antikorla birleşip hücreyi hasara götürebilir.

Glutatyon S-transferaz enzim sistemleri birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda önemli rol oynayan enzimlerindendir.

2.4.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

Doğal enzim sistemlerinin (SOD, CAT, GSH-Px, GR, sitokrom c oksidaz, hidroperoksidaz) dışında antioksidan etki gösteren başka maddeler de vardır. Bunlar bazı makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, hemoglobin, miyoglobin, ferritin), mikromoleküller (vitamin E, C ve A, ürik asit, glutatyon, N-asetil sistein, metyonin, kaptopril, ubiquinon, glukoz, bilurubin), bazı ilaçlar (rekombinant h-SOD, 21-aminosteroidler, demir şelatörleri, interlökin-1, ksantin oksidaz inhibitörleri, mannitol, barbitüratlar), karboksimetilsistein, trakeobronşial mukus, albumin ve taurin olarak sayılabilir. Daha çok hücre içinde etkili olan enzimatik antioksidanlara karşılık, nonenzimatik antioksidanlar ekstraselüler

mesafede de etkinlik gösterir. Bu antioksidanları, temel olarak yağda eriyenler ve suda eriyenler olarak ikiye ayırabiliriz. Yağda eriyen antioksidanlar membranlarda ve lipoproteinlerde, suda eriyenler ise daha çok ekstraselüler mesafe olmak üzere enzimatik antioksidanlar ile birlikte intraselüler mesafede de etkilidir. (87, 93)

2.5. Vitamin D - Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi

Hücre membranı ile vitamin D'nin hidrofobik halkası arasındaki etkileşim membranı lipid peroksidasyonnuna karşı korumakta ve membran bütünlüğünü sağlamaktadır. Böylece vitamin D membran antioksidanı görevi görmektedir. (94)

Javanbakht ve ark. atopik dermatitli hastalarda yaptıkları çalışmada vitamin D'nin SOD ve CAT aktivitesinde anlamlı artışa neden olduğunu göstermişler. (95)

Vitamin D'nin kansere karşı koruyucu etkisine hücre farklılaşmasını inhibe etmesi, apopitozu düzenlemesi yanında hedef hücrelerde ROS üretimini artırmasının da aracılık ettiği düşünülmektedir. Meme kanseri olan kişilerde yapılan bir çalışmada vitamin D'nin prooksidan etkilerinin olduğu görülmüştür. Koren ve ark. yaptıkları çalışmada vitamin D'nin meme kanserli hastalardaki pro-oksidan etkilerine redoks potansiyelindeki aşırı artışın aracılık ettiğini göstermiştir. (96)

Vitamin D'nin yapısal olarak endojen östrojene benzediği için intranükleer östrojen reseptörlerine bağlanıp SOD, CAT ve GSH-Px gen transkripsiyonuna neden olarak antioksidan enzimlerin seviyelerinde artışa neden olmaktadır. (97)

Diyabetik ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada vitamin D'nin antioksidan etkilerinin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin gen ekspresyonuna ya da östrojen ve testosteronu artırarak insulin salgısını artırmasına ve insulin reseptör modülasyonuna bağlı olabileceği söylenmiştir. (4)

2.6. Sepsis - Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi

Serbest radikaller sepsis seyirinde görülen çoklu organ hasarlanması ve yetmezliğinden sorumludur. Makrofaj ve sitokinlerin endotoksin ile aktivasyonu sonucu ROT oluşumu görülmektedir. LPS ile uyarım sitokinlerin salınımını ve sistemik inflamatuvar kaskadın başlamasına neden olur. Bunun sonucunda polimorf nüveli lökositler (PMNLs) organlarda birikir. PMNLs bulundukları yerde doku üzerinde direkt hasar yapabildikleri gibi aktive olmuş nötrofillerin miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ile oluşturdukları serbest radikaller lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre membran hasarına neden olurlar.(98)

LPS uygulanması GSH düzeylerini azaltırken GSSG' de artmaya neden olmaktadır. GSH'ın azalması ile antioksidan savunma zayıflamakta, lipid peroksidasyonu önlenememekte böylece doku hasarı oluşmaktadır. SOD, CAT, GSH-Px oksidatif hasara karşı koruyucu primer moleküllerdir. LPS'nin neden olduğu toksisite durumunda bu moleküllerin artmış kullanımı aktivitelerinde geri dönüşümsüz inhibisyona neden olmaktadır. (98)

Sepsiste oksidatif hasarın hidrojen peroksit seviyelerinde artışla sonuçlanan SOD/CAT imbalansla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Antioksidanlarla tedavinin sepsisin neden olduğu ölümleri azaltabileceği belirtilmektedir. SOD ve

CAT enzimlerinin serbest radikal detoksifikasyonunda rol oynayan iki önemli enzimdir. Aşırı SOD enzim aktivasyonu olup CAT enziminin birlikte artmadığı durumlarda hidrojen peroksit artışının olacağını bunun da fenton reaksiyonu yolu ile hidroksil radikali kaynağı olabileceği ifade edilmiştir. (99)

Endotoksemi tablosu bozulmuş hücre içi redoks balansına; aşırı ROS üretimi sonucu DNA, protein ve lipid membranlarında hasar oluşmasına; lipit peroksitlerinin artışı ve antioksidan enzim seviyelerinde düşmeye bağlı organ hasarına neden olmaktadır. (100)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

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

1. Kontrol grubu
2. Sepsis grubu
3. 25(OH)Vitamin D3 grubu
4. 25(OH)Vitamin D3 + sepsis grubu

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

2. Sepsis grubu: Bu gruptaki 6 rata 16 mg/kg dozunda LPS E.coli (O111.b4) intraperitoneal yolla verildi.

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

4. 25(OH)Vitamin D3 +sepsis grubu: Bu gruptaki 6 rata sepsis oluşturmadan 3 gün önce, her gün 2 mg/kg 25(OH)Vitamin D3 (ayçiçek yağında çözülerek) gavaj yoluyla verildi ve 3.günün sonunda 16 mg/kg dozunda LPS E.coli (O111.b4) intraperitoneal yolla uygulandı.

Çalışma süresinin sonunda hayvanların anestezi altında kanları alındıktan sonra sakrifiye edildi. Karaciğer dokuları çıkarıldı ve soğuk (+4ºC) serum fizyolojik ile dokuların temizliği yapıldı. Bir miktar doku, içerisinde formol bulunan temiz şişelere konularak histopatolojik inceleme için ayrıldı. Kalan karaciğer dokuları analiz gününe kadar –80°C de saklandı.

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

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

3.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (Heidolph DIAX 900)

Vortex (Heidolph Reax 2000)

Santrifüj (Hermle Z 380 K)

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

Spektrofotometre (Schimadzu, UV 1601)

pH metre (Jenway)

Manyetik Karıştırıcı, Otomatik ve cam pipetler

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

3.3.1 Total Protein Tayini

Süpernatanlarındaki total protein miktarı tayini Lowry metoduna göre yapıldı. (101)

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

Reaktifler:

1) A reaktifi: 0.5 gr CuSO4.5H2O ve 1.0 gr Na_3-Sitrat bir miktar distile suda çözündükten sonra 100ml'ye tamamlandı.

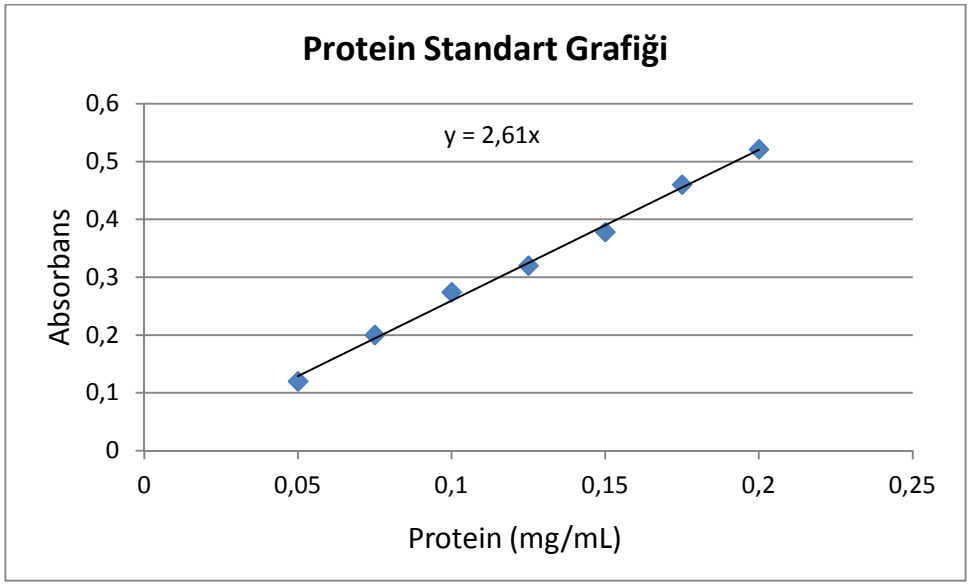
2) B reaktifi: 20gr Na2CO3 ve 4.0 gr NaOH bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlandı.

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

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

Deneyin Yapılısı:

Kör ve numune tüplerine 2.5 ml C reaktifi ve numune tüpüne 10µl süpernatan eklendikten sonra iyice karıştırılarak laboratuvar sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Kör ve numune tüplerine 250 µl D reaktifi eklendikten sonra laboratuvar sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve 700nm'de numunelerin absorbansları köre karşı okundu. Sonuçlar protein standart eğim grafiği kullanılarak hesaplandı.



Grafik 1. Protein Standart Grafiği

3.3.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Karaciğer doku örneklerinde SOD aktivitesi Durak I ve arkadaşları tarafından modifiye edilen metoda göre çalışıldı. (102)

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

Kullanılan reaktifler:

- Ksantin (0,30mM)
- NBT (150μM)
- Na_2CO_3 (400mM)
- BSA (1g/L)
- XO (167U/L)
- $CuCl_2$ (8mM)

Deneyin yapılışı:

Numune tüplerine ölçüm reaktifi, numune ve ksantin oksidaz enzimi; kör tüplerine ise ölçüm reaktifi ve ksantin oksidaz enzimi konuldu. Tüpler 25^0C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numune tüplerine sadece $CuCl_2$, kör tüplerine ise $CuCl_2$ ile reaksiyon durdurulduktan sonra nunune eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra her bir tüpün absorbansı 560 nm'de distile suya karşı okundu. Sonuçlar U/mg protein olarak verildi. Metoda göre 1U SOD aktivitesi, NBT indirgenmesini %50 inhibe eden enzim aktivitesi olarak tarif edilmektedir.

3.3.3 Glutatyon peroksidaz (GSH-PX) Aktivitesi Tayini

GSH-PX aktivitesi Paglia DE ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı.(103)

Metodudun prensibi: 340 nm'de NADPH'ın absorbans değişimine dayanmaktadır. Enzim aktivitesi ise NADPH'ın ε değerinden ($6,22x10^3 M^{-1}.cm^{-1}$) yararlanılarak hesaplandı.

Kullanılan Reaktifler:

- GSH (150mM)
- NADPH (3mM)
- H_2O_2 (100mM)
- NaN_3 (2M)
- Fosfat tampon (pH:7,0; 50mM) (Na_2HPO_4/KH_2PO_4)
- GSH-red: Sıvı enzimden $(NH_4)_2SO_4$ ile seyreltilerek hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

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

3.3.4 Katalaz Aktivitesinin Tayini

Karaciğer doku örneklerinde Katalaz aktivitesinin tayini Aebi H'nın metoduna göre yapıldı. (104)

Metodun prensibi:

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

Kullanılan reaktifler:

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

Deneyin yapılışı:

Tampon çözelti ile sıfır ayarı yapılmış spektrofotometreye içerisinde tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi (absorbans aralığı yaklaşık 0.5) bulunan küvet konuldu, absorbans değişimi 1 dakika boyunca takip edildi. Daha sonra numune ilave edildi, küvet 2-3 kez altüst edilip karıştırılarak numunenin absorbansı değişimi 5 dakika boyunca takip edildi. Lineer olan bölgeden ΔA/dak değeri bulunarak aktivite hesaplandı. Sonuçlar IU/mg protein olarak verildi.

3.3.5. Glutatyon-S-Transferaz Tayini

Glutatyon S-transferaz aktivitesi tayini Habig WH ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı. (105)

$$\text{1-Cloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)} + \text{GSH} \xrightarrow{\text{GST}} \textit{S}\text{-2,4-dinitrofenilglutatyon (DNPG)} + H^+ + Cl^-$$

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

Kullanılan Reaktifler:

- 100 mM. pH:6 fosfat tamponu (Na_2HPO_4/KH_2PO_4)
- CDNB (1-Kloro 2,4-Dinitrobenzen): 25 mM, saf etanolde çözüldü.
- GSH:50 mM (tamponda çözülür)

Deneyin Yapılışı:

Numune ve kör tüplerine fosfat tamponu, CDNB, numune eklenip iyice karıştırıldı. 340 nm de köre karşı sıfır ayarı yapıldıktan sonra numunedeki absorbans değişimi1 dakika takip edildi. Daha sonra küvete redükte glutatyon (GSH) eklendi ve absorbans değişimi 3 dakika boyunca takip edildi. Lineer bölgeden ΔA/dak değeri bulunarak aktivite hesaplandı. GST aktivitesi DNPG'un ε katsayısından yararlanılarak hesaplandı (ε: 10 mM^{-1}. cm^{-1}). Sonuçlar spesifik aktivite (IU/mg protein) olarak verildi.

3.3.6. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Rat serumlarında AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotransferaz) enzim aktiviteleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Acil Laboratuvarı'nda Roche Integra 800 cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.4. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi

Karaciğer dokuları %10 luk formalinde tespit edildikten sonra ince dilimler halinde kesilip parafin bloklara gömüldü. Her bir parafin bloktan seri kesitler yapılıp Hematoksilen ve Eozin ile boyandı. Histopatolojik değişiklikler mikroskop altında incelendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

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

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

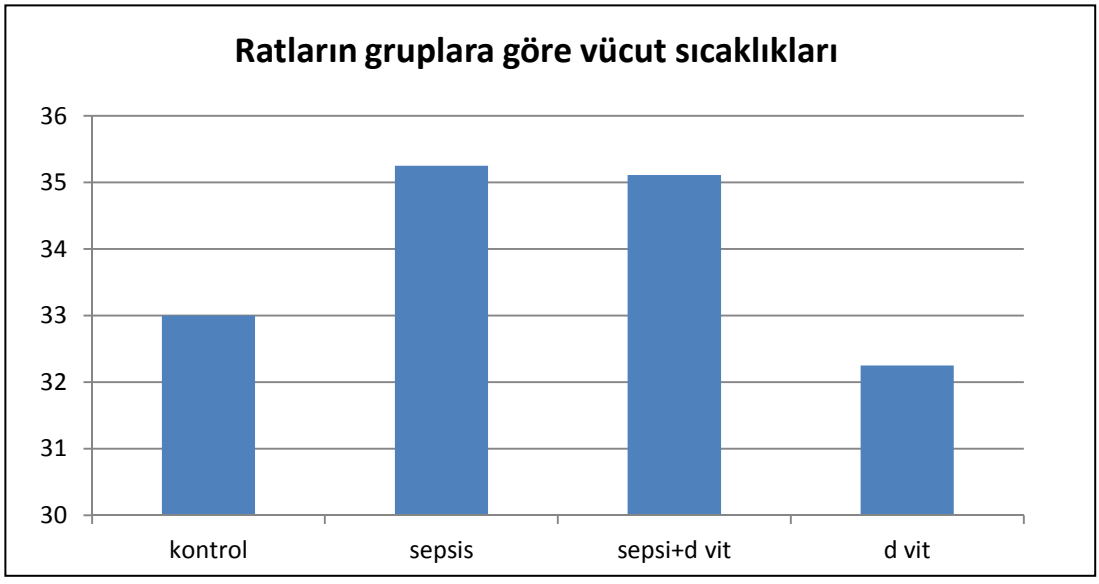
4. BULGULAR

4.1. Ratların Rektal Yolla Ölçülen Vücut Sıcaklıkları

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

Tablo 2. Ratların rektal yolla ölçülen vücut sıcaklıkları

GRUP	Vücut Sıcaklıkları ± Standart sapma
Kontrol	33,0 ± 0,6 °C
Sepsis	35,2 ± 0,2 °C
Sepsis+D vitamini	35,1 ± 0,4 °C
D vitamini	32,2 ± 0,2 °C



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

4.2. Karaciğer Fonksiyonunu Gösteren Testler

Deney sonrası rat serumları karaciğer fonksiyon testleri parametrelerine ait ortalama ± standart sapma değerleri Tablo 3'de görülmektedir.

Tablo 3. Serum Karaciğer Fonksiyon Testleri Sonuçları

Grup	AST (U/L)	ALT (U/L)
1.Kontrol	127,6±32,5	53,6±15,4
2.Sepsis	200,4±52,5	72,2±37,6
3.Sepsis+ d vitamini	443,5±248,9	392,6±282,2
4.D vitamini	180,5±43,1	59,5±14,8
İSTATİSTİKSEL ANALİZ		
1-2	P<0,05	P>0,05
1-3	P<0,05	P<0,05
1-4	P>0,05	P>0,05
2-3	P<0,05	P<0,05
2-4	P>0,05	P>0,05
3-4	P<0,05	P<0,05

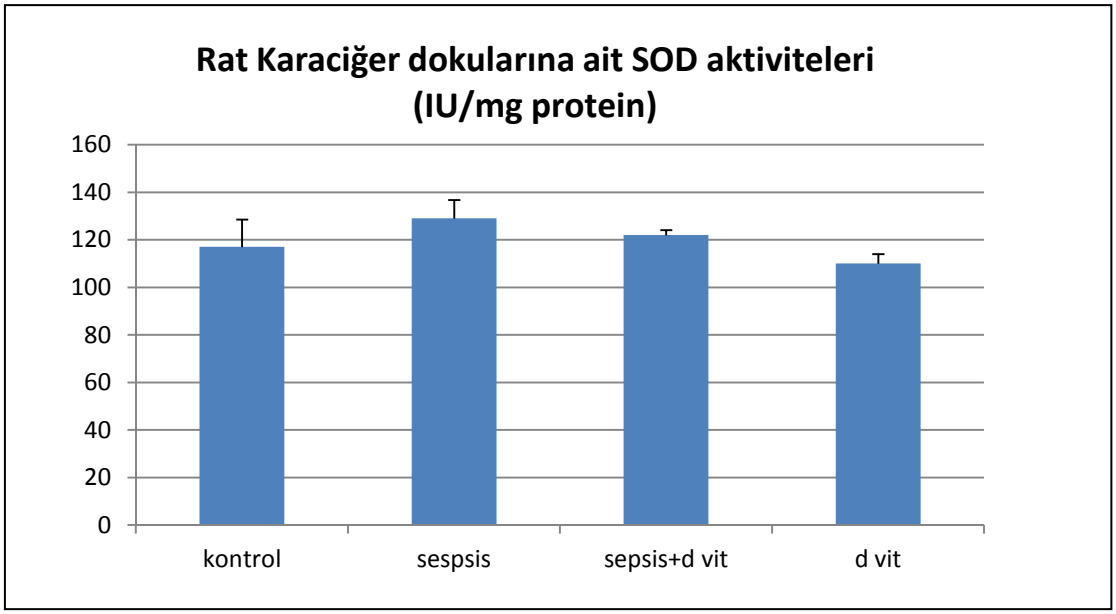
4.3. Rat Karaciğer Dokularında Enzim Aktiviteleri

Deney sonrası rat karaciğer dokularında enzim aktivitelerine ait ortalama±standart sapma değerleri Tablo 4'de görülmektedir. Enzim aktiviteleri grafiklerde ortalama ± standart hata şeklinde grülmektedir (Grafik 3-6).

Tablo 4. Rat Karaciğer Dokularında Enzim Aktiviteleri

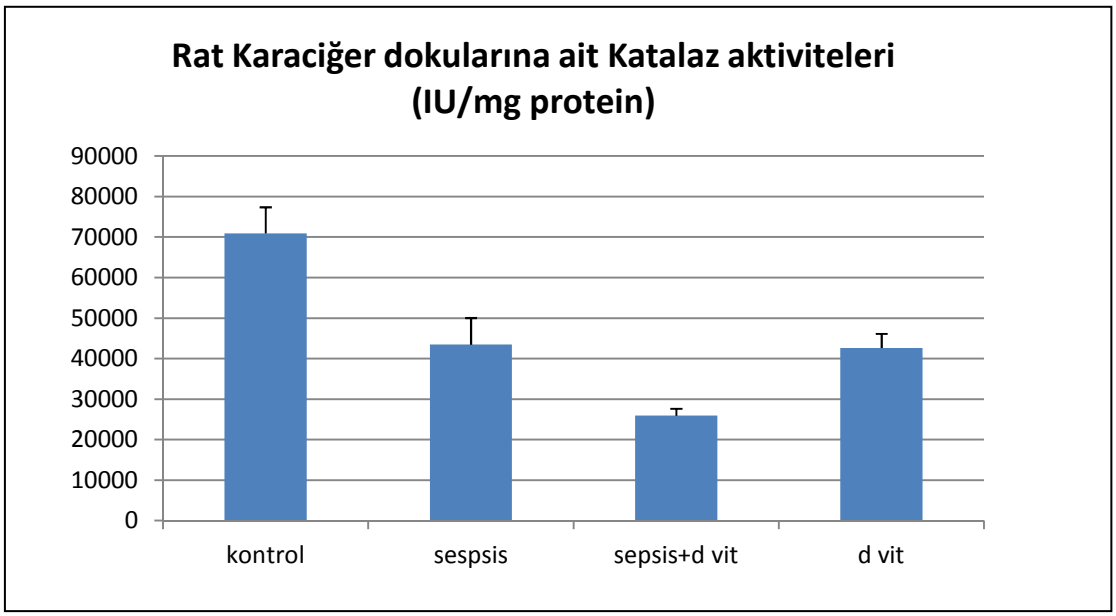
Grup	SOD (U/mg protein)	KATALAZ (IU/mg protein)	GST(IU/mg protein)	GSH-PX (IU/mg protein)
1.Kontrol	117±28,2	70919±15760	47±9,9	8,9±3,1
2.Sepsis	129±19,1	43481±16030	36,7±13,8	8,1±2,4
3.Sepsis+ d vitamini	122±5,4	25918±4204	30,3±4,4	7,8±0,8
4.D vitamini	110±9,8	42639±8542	40,7±8	7,3±1,5
İSTATİSTİKSEL ANALİZ				
1-2	P>0,05	P<0,05	P>0,05	P>0,05
1-3	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05
1-4	P>0,05	P<0,05	P>0,05	P>0,05
2-3	P>0,05	P<0,05	P>0,05	P>0,05
2-4	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
3-4	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05

4.3.1. Rat Karaciğer Dokularının SOD Aktiviteleri



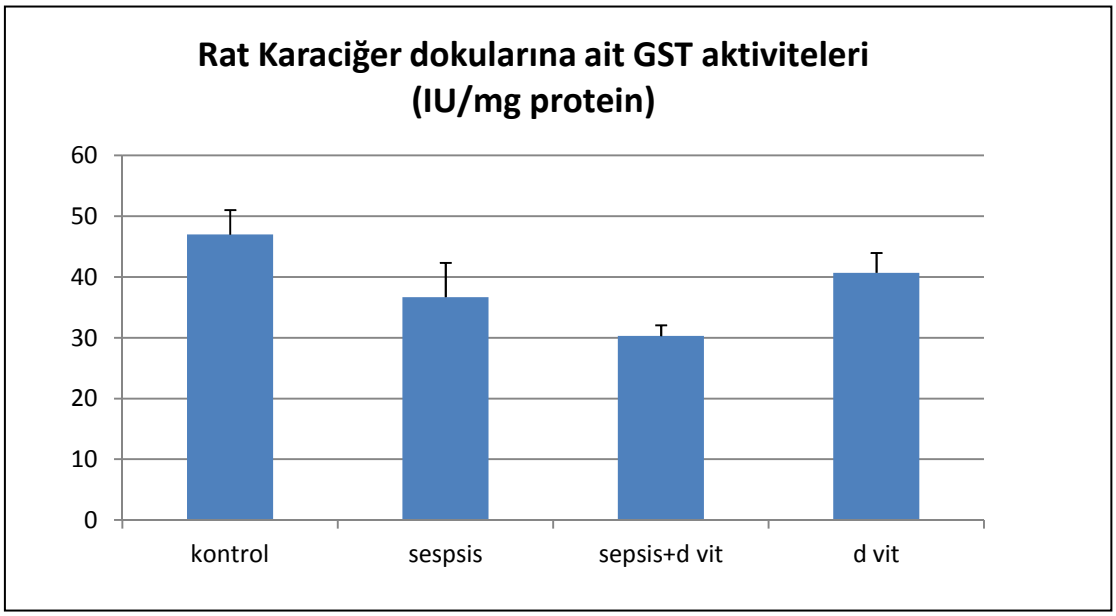
Grafik 3. Tüm gruplarda rat karaciğer dokularına ait SOD aktiviteleri

4.3.2. Rat Karaciğer Dokularının CAT Aktiviteleri



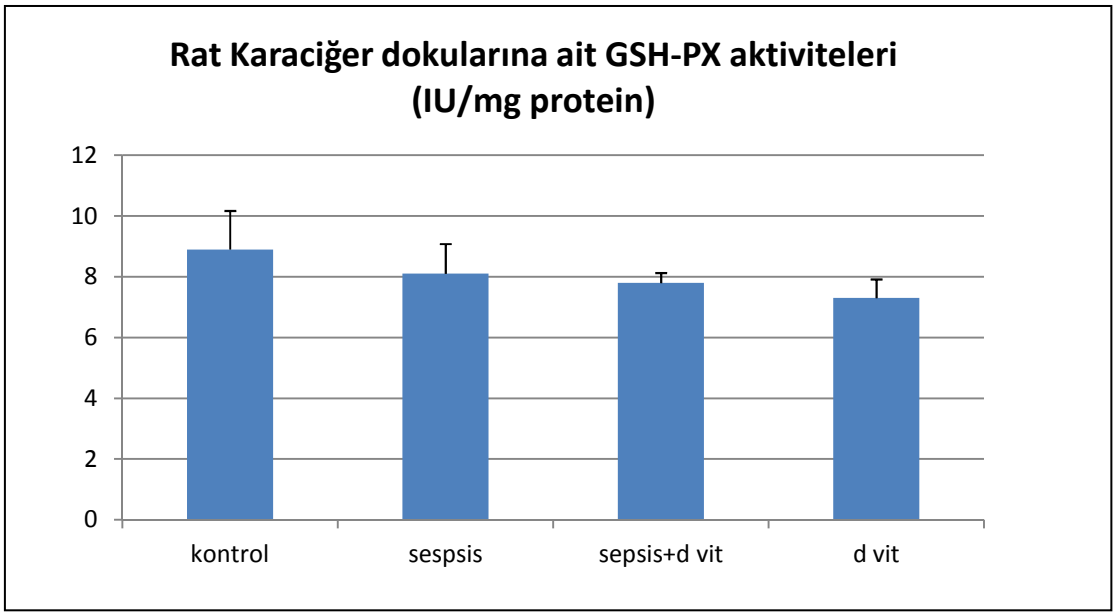
Grafik 4. Tüm gruplarda rat karaciğer dokularına ait CAT aktiviteleri

4.3.3. Rat Karaciğer Dokularının GST Aktiviteleri



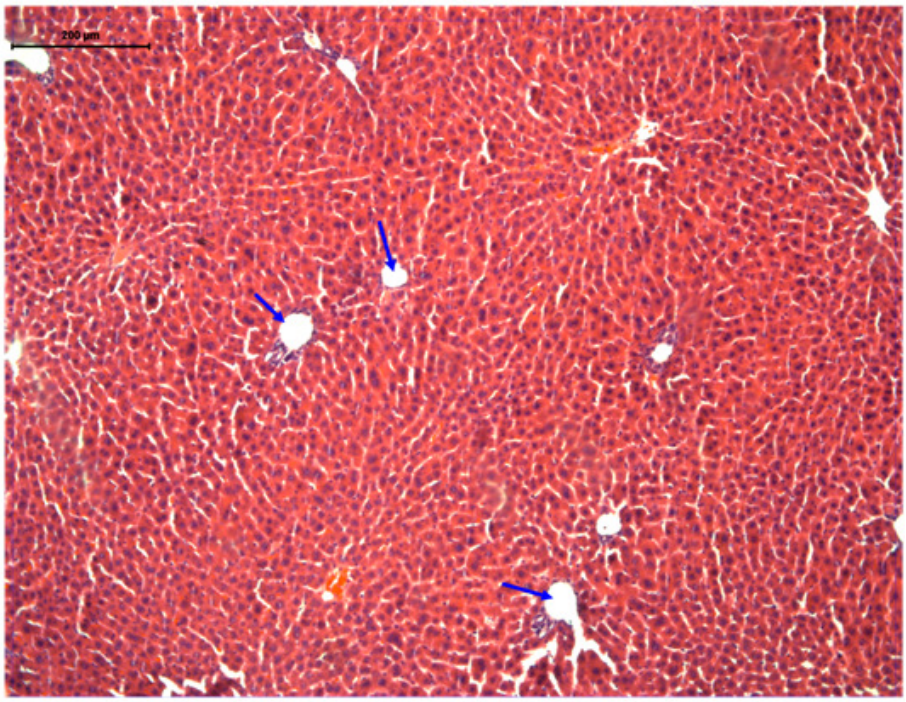
Grafik 5. Tüm gruplarda rat karaciğer dokularına ait GST aktiviteleri

4.3.4. Rat Karaciğer Dokularının GSH-PX Aktiviteleri

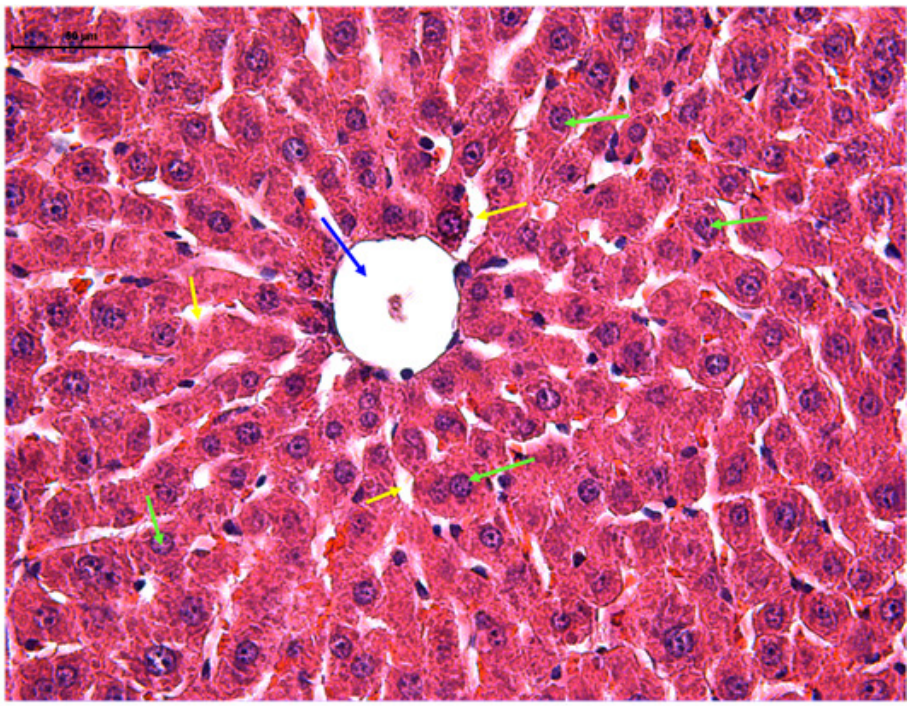


Grafik 6. Tüm gruplarda rat karaciğer dokularına ait GSH-PX aktiviteleri

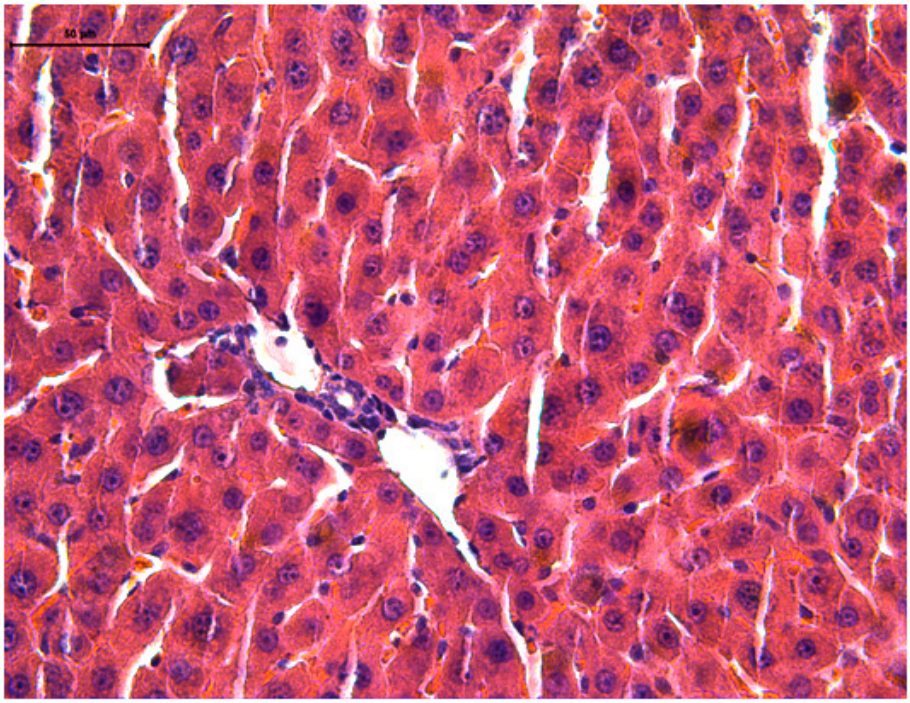
4.4. Histopatolojik Bulgular



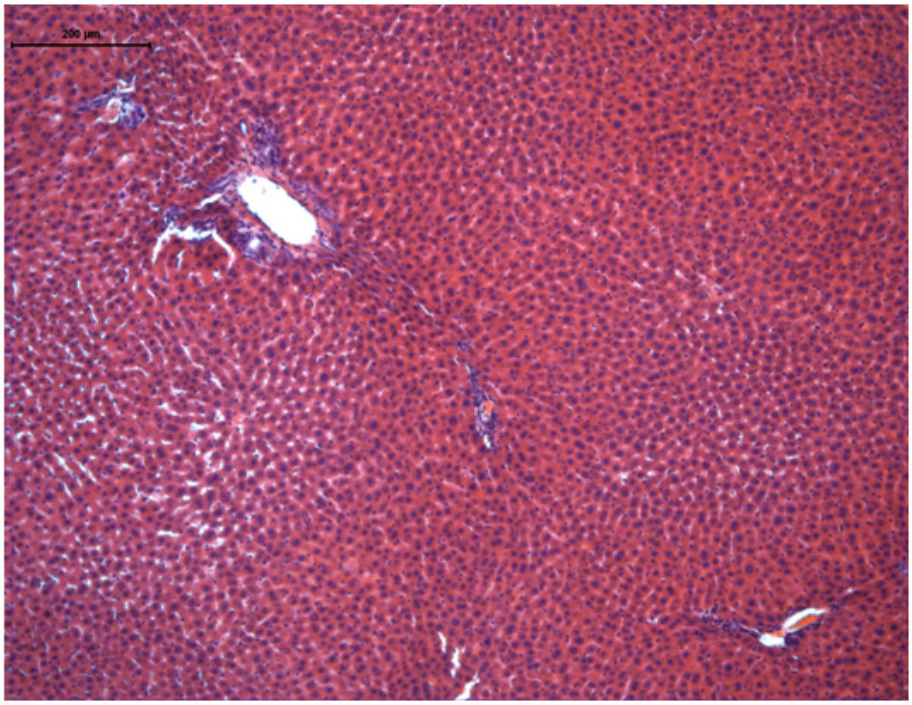
Resim 1. Kontrol grubu: Normal histolojik görünümde karaciğer parankim ve stroma yapısı.



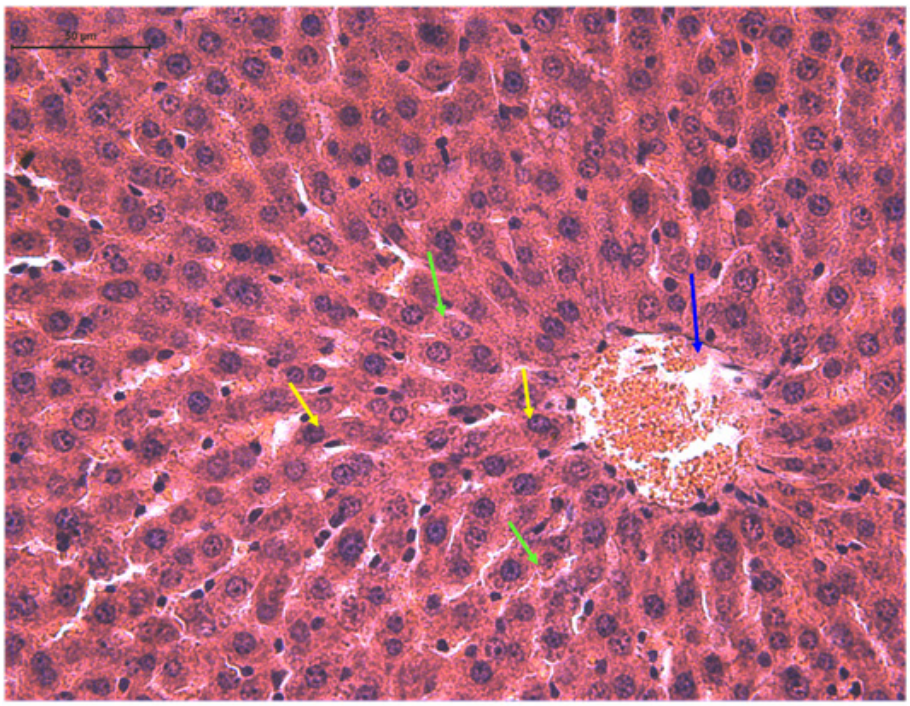
Resim 2. Kontrol grubu: Central ven (mavi ok), hepatik sinüzoidler (sarı oklar), hepatositler (yeşil oklar)



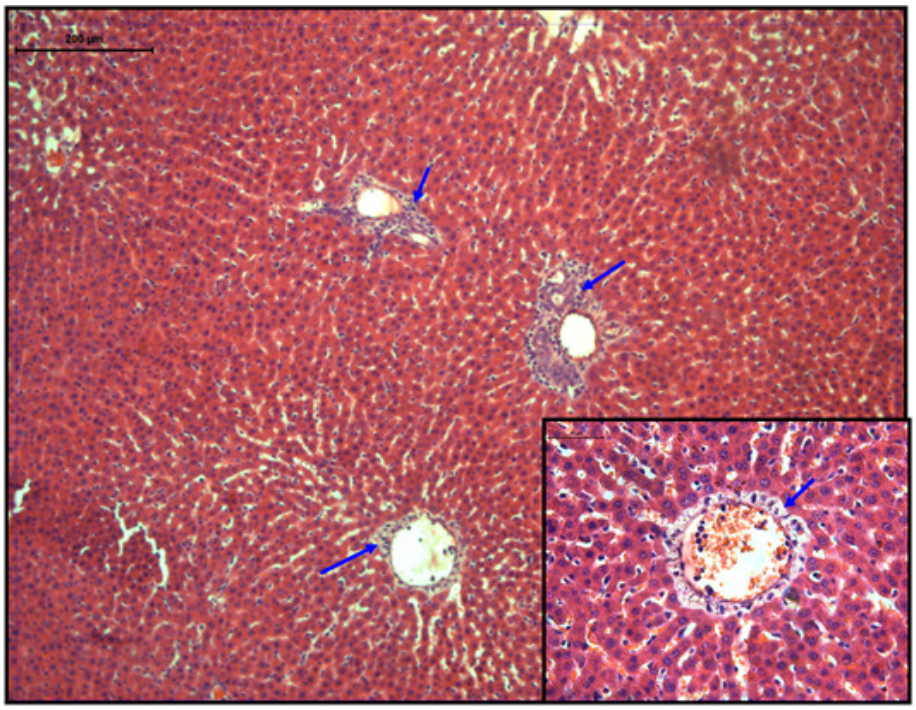
Resim 3. Kontrol grubu: Normal görünümde portal aralık



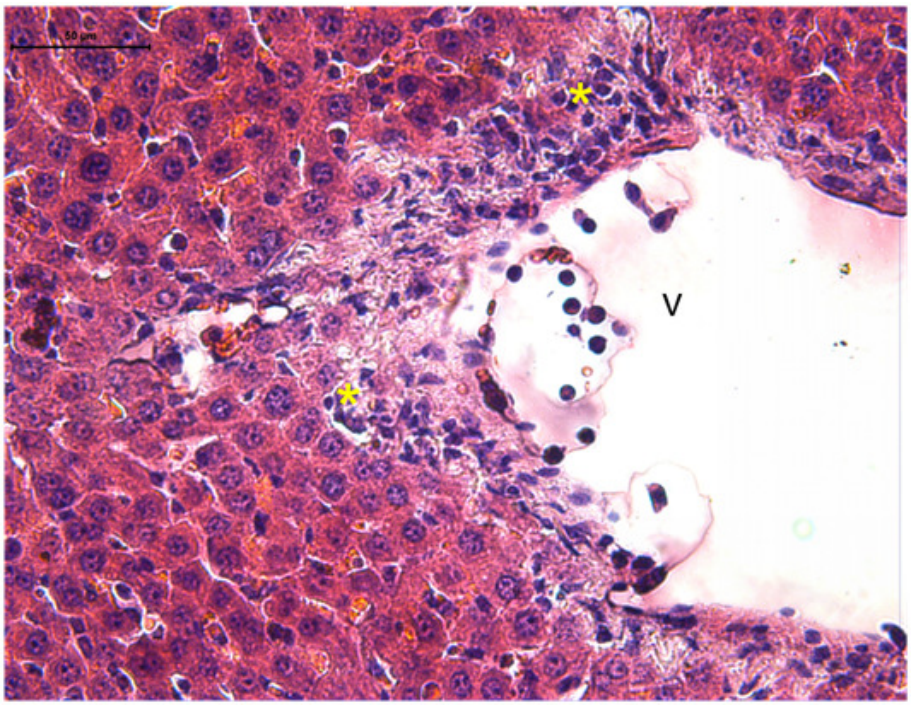
Resim 4. Vitamin D grubu: Hepatositler, portal aralık ve central ven gibi tüm elemanları normal histolojik yapıda karaciğer dokusu



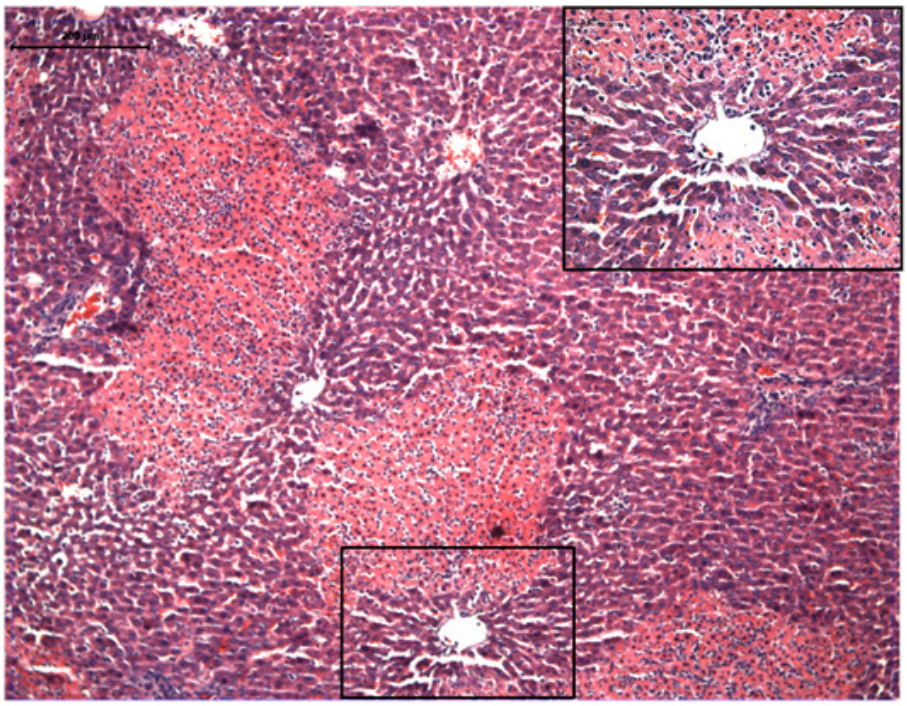
Resim 5. Vitamin D grubu: Normal histolojik yapıda sentral ven (mavi ok), sinüzoidler (sarı oklar) , hepatositler (yeşil oklar)



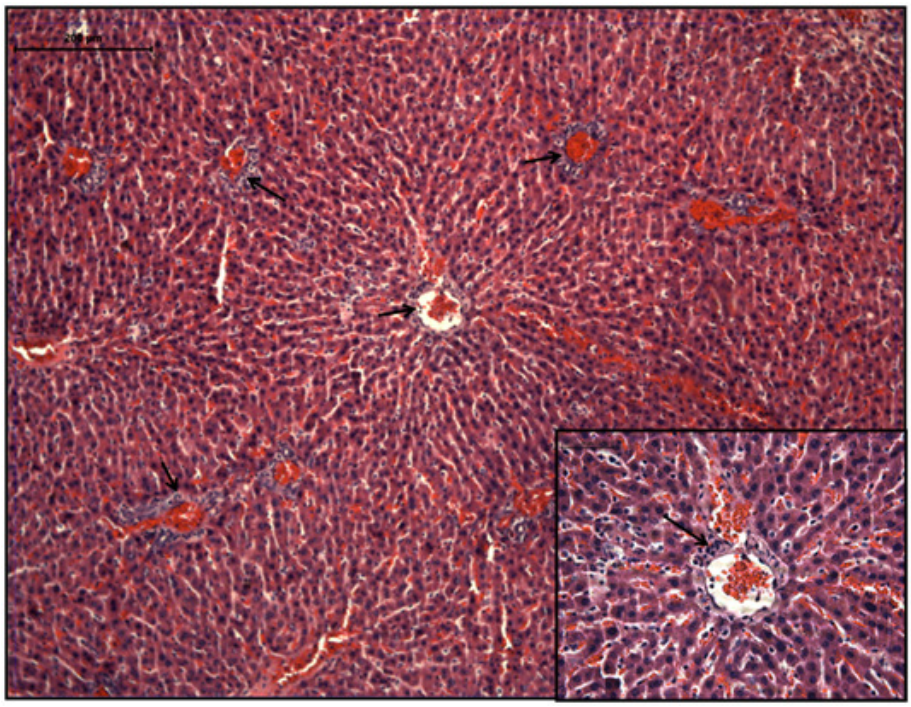
Resim 6: Sepsis grubu: Büyük ve küçük büyültmede genel görünüm. Central ven periferinde inflamatuar hücre infiltrasyonu ve fibrosis (mavi oklar)



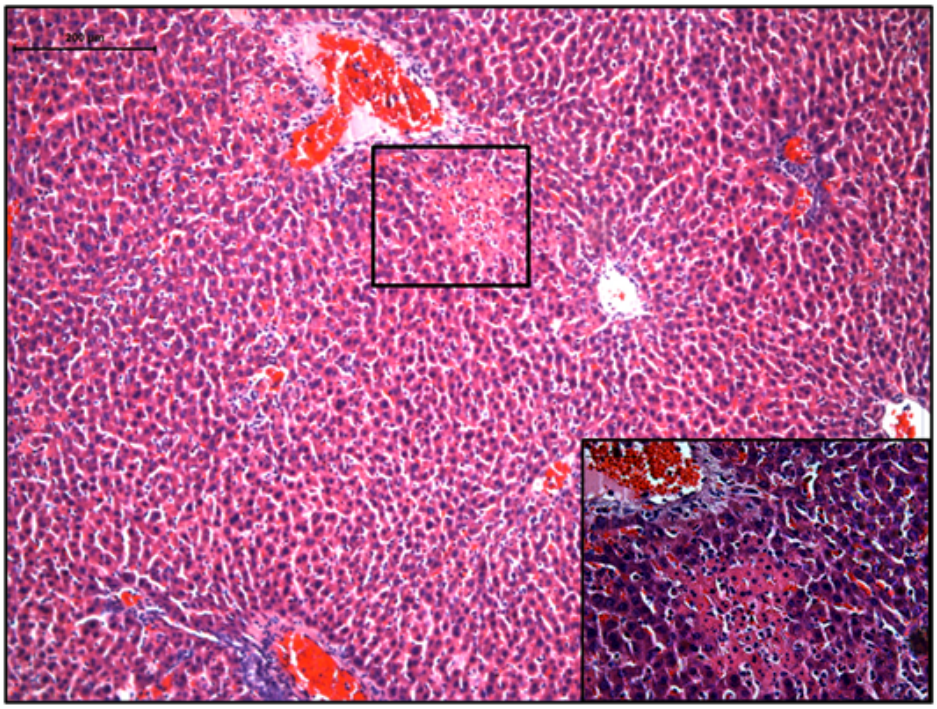
Resim 7. Sepsis grubu: Portal aralıkta perivenüler (V) bölgede inflamatuar hücre infiltrasyonu (*)



Resim 8. Sepsis grubu: Büyük ve küçük büyültmede karaciğer parankiminde tüm zonlarda belirgin olarak gözlenen nekrotik alanlar ve nötrofilik infiltrasyon.



Resim 9. Sepsis+vitamin D grubu: Küçük ve büyük büyültmede portal aralıkta ve perivenüler bölgede nötrofilik infiltrasyon (siyah oklar)



Resim 10. Sepsis+vitamin D grubu: Küçük ve büyük büyültmede karaciğer parankiminde az sayıda nekrotik alanlar

Çalışmamızda SOD ve GSH-Px aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ve gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında aralarında anlamlı fark olmadığı görüldü (Tablo 4).

Çalışmamızda ilgi çeken bulgu CAT aktivitelerinin sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında baskılanmış olmasıdır($p<0,05$). Bu baskılanmanın özellikle sepsis+vitamin D grubunda en yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$) (Tablo 4).

Yine sepsis+vitamin D grubunda GST aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı baskılandığı bulunmuştur($p<0,05$). GST aktivitesi diğer gruplarda kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırıldıklarında anlamlı farkın olmadığı görülmüştür (Tablo 4).

Çalışmamızda karaciğer fonksiyon testlerinden AST'nin yine özellikle sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). ALT düzeyinin, sepsis+vitamin D grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğunu tespit edilmiştir. ($p<0,05$) (Tablo 3). Sepsis+vitamin D grubundaki ALT yüksekliği sepsis ve vitamin D grupları ile karşılaştırıldığında da anlamlılık ifade etmektedir ($p<0,05$) (Tablo 3).

Çalışmamızın histopatolojik sonuçları değerlendirildiğinde kontrol ve vitamin D gruplarında; tüm deneklerde karaciğer parankimi ve stromal yapılar normal histolojik görünüm sergilemekteydi (Resim 1-5).

Sepsis grubunda; büyük ve küçük büyültmelerde mikroskobik bulgular perivenüler ve portal alanda yaygın nötrofilik infiltrasyon varlığını ortaya koymaktaydı (Resim 6,7). Ayrıca bu gruba ait hemen tüm deneklerden alınan

doku örneklerinde karaciğer parankiminde tüm zonları kapsayan geniş ve yaygın nekrotik alanlar belirgin olarak gözlenmekteydi. (Resim 8)

Sepsis+vitamin D grubunda; Bulgular kontrol ve yalın vitamin D grubuna benzer özellikler göstermekteydi . Ancak sepsis grubuna göre çok daha az olmak üzere perivenüler ve portal alanda inflamatuar hücre infiltrasyonu gözlenirken (Resim 9), karaciğer parankiminde de ender küçük nekrotik alanlar dikkati çekmekteydi (Resim 10).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda wistar tipi 24 rat kontrol, yalnız sepsis, sepsis+vitamin D, yalnız vitamin D grupları olmak üzere rastgele 4 gruba bölündü. Grupların karaciğer dokularında antioksidan enzimleri (SOD, CAT, GSH-Px ve GST) histopatolojik görüntüleri; serumlarında karaciğer fonksiyon testlerini (AST, ALT) inceleyerek sepsiste serbest radikal metabolizmasını ve vitamin D'nin etkisini araştırdık.

Bu konuda literatür bilgilerine baktığımızda bu alanda çok fazla çalışma yapılmadığı buna karşılık sepsis, D vitamini, radikal metabolizması ilişkileri ile ilgili olarak yapılan çalışmaların ise çelişkili olduğunu gördük.

Mohamadin ve ark.(98) LPS ile toksisite ve oksidatif stres oluşturdukları, montelukastın koruyucu rolünü araştırdıkları çalışmada rat karaciğer dokularında SOD, CAT ve GSH-Px düzeylerini sepsis grubunda kontrol grubuna göre daha düşük bulmuşlar. Bu düşüklüğün serbest radikallerin ortadan kaldırılması esnasında aşırı kullanılmalarına bağlı olarak enzim aktivitelerinin geri dönüşümsüz inhibisyonundan kaynaklanabileceğini ifade etmişler. Bu açıklama özellikle yüksek miktardaki radikal oluşumunun enzimler üzerine süpresif etki göstermesi bakımından önemlidir. Enzim kinetiği açısından değerlendirildiğinde ise SOD 'un özellikle CAT ve GSH-Px için subsrat üretmesi ve bu üç enzimin biribiriyle olan ilşkilerini değerlendirme bakımından çalışmamıza ışık tutmaktadır.

Uyanık ve ark.(106) çekal ligasyon yolu ile sepsis oluşturdukları, diyabet ve sepsisin sitokin ve oksidatif organ hasarına etkilerini inceledikleri çalışmada, rat karaciğer dokularında SOD ve CAT düzeylerinin sepsis grubunda, kontrol grubuna göre yüksek olduğunu bulmuşlar. Sepsis tablosu açısından bakıldığında bu sonuçlar Mohamadin ve arkadaşlarının sonuçlarıyla çelişmektedir.

Rodriguez ve ark.(100) LPS ile sepsis oluşturdukları, ozonun oksidatif strese karşı koruyucu rolünü araştırdıkları çalışmada fare karaciğerinde SOD düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sepsis grubunda arttığını GSH-Px ve GST düzeylerinin ise azaldığını göstermişler.

Allameh ve ark.(107) çekal ligasyonyu ile oluşturdukları, etanol tedavisinin koruyucu rolünü araştırdıkları sepsis modelinde rat karaciğer dokusunda GST ve CAT düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu bulmuşlar.

Carlos ve ark.(99) çekal ligasyon ile deneysel sepsis oluşturdukları, difenil diselenidin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada ratların karaciğer dokularında SOD ve CAT enzim aktivitelerini incelemişler. Sepsis oluşturulan grupta kontrol grubuna göre SOD seviyelerinde anlamlı artış olurken CAT seviyelerinin baskılandığını görmüşler. SOD ve CAT enzimlerinin serbest radikal detoksifikasyonunda rol oynayan iki önmeli enzim olduğunu, aşırı SOD enzim aktivasyonu olup CAT enziminin birlikte artmadığı durumlarda hidrojen peroksit artışının olacağını bunun da fenton reaksiyonu yolu ile hidroksil radikali kaynağı olabileceğini söylemişler. Çalışmalarının literatürde yer alan sepsisin SOD / CAT imbalansına neden olduğu verisiyle uyum gösterdiğini söylemişler.

Hamden ve ark.(4) alloksan ile diyabet oluşturulmuş ratlarda D vitamininin karaciğer, böbrek ve pankreasın oksidatif strese bağlı hasarını tedavi edici ve önleyici etkisini araştırmışlar. Diyabet oluşturulan grupta kontrol grubuna göre SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinde baskılanma olduğu görülmüş. Diyabet oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan sonra D vitamini verilen gruplarda SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında daha düşük olduğu fakat sadece diyabet oluşturulan gruba göre enzim seviyelerinin yükseldiği görülmüş. Buna göre D vitamini kullanımının hiperglisemiyi, oksidatif strese bağlı karaciğer hücre hasarını; insülin seviyesini , sensitivitesini artırarak ve antioksidan kapasiteyi artırarak önlediğini ifade etmişler.

Litaratürde bu şekilde değişik sonuçların verilmiş olması doku farklılığına veya enzimlerin çalışılan örnekler için farklı kinetik davranış göstermesine bağlı olabilir.

Noyan ve ark.(108) streptozotosin ile diyabet oluşturdukları ratlarda D vitamininin oksidan ve antioksidan etkilerini incelemişler. Çalışmada kontrol, insulin tedavisi alan diyabet , insulin+D vitamini tedavisi alan diyabet grubu olmak üzere üç grup kullanılmış. Karaciğer dokusunda yapılan ölçümlerde gruplar arasında SOD,CAT ve GSH-Px düzeyleri arasında anlamlı fark bulamamışlar. D vitamini ile kombine edilmiş insulin tedavisinin sadece insulin tedavisine göre antioksidan savunmada daha yararlı olmadığı sonucuna varmışlar. Bunun nedeninin D vitamininin antioksidan etki göstermesi için gerekli dozunun spesifik etki için gerekli dozdan farklı olmasından kaynaklanabileceğini ifade etmişler.

Ayrıca D vitamininin insulin ile birlikte verilmiş olması nedeniyle etkisinin insulin tarafından maskelenebileceğini söylemişler.

Koren ve ark. MCF-7 kültür hücrelerinde yaptıkları çalışmada vitamin D uygulanmasının GSH seviyelerini baskıladığı ve GSSG/GSH oranını artırdığını gözlemlemişler.(96) Buna karşılık glutatyon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir. Ve bu çalışmada vitamin D'nin özellikle hücre içi ROS üretimine yol açtığı ve pro-oksidan bir molekül olabileceği öne sürülmektedir. Yine daha önceki yaptıkları çalışmada antioksidan olan Cu-Zn-SOD enziminin ekpresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur.(109) Özellikle vitamin D'nin hücre içindeki GSSG ve GSH seviyelerini değiştirmesine rağmen glutatyon bağımlı enzim aktivitelerini etkilememesi SOD baskılanması ve artmış H_2O_2 seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra ortamda artmış süperoksit anyonlarının özellikle NO ile reaksiyona girerek yüksek toksik peroksinitrit molekülüne dönmesi veya ortamda artmış bulunan H_2O_2 konsantrasyonunun fenton tipi reaksiyonlarla oksidatif hasara katkı sağladığı ileri sürülmüştür. (110, 111)

Özellikle ortamda bulunan GSSG/GSH oranının artması hücre içi redoks potansiyelini değiştirebilir. Bu durumda DNA ile etkileşen ve yapılarında sistein bulunan proteinlerin fonksiyonunu etkileyebilir. Özellikle vitamin D'nin hücre içi redoks potansiyelini değiştirmesi bu molekülün biyolojik etkileri açısından önemlidir. (112). Koren ve ark. MCF-7 kültür hücrelerinde yaptıkları bu çalışma D vitaminin GSSG / GSH oranları ve hücre içi redoks potansiyelerini değiştirmesi ve pro-oksidan rolünün olduğunun açıklanması bizim radikal enzimleri ,

karaciğer fonksiyon testleri ve histopatoloji sonuçlarımızı desteklemektedir. Çalışmamızda özellikle sepsis+vitamin D grubunda devam eden histopatolojik sonuçlar ve karaciğer fonksiyon testlerinin yüksekliği vitamin D'nin sepsisteki koruyucu etkisisnin sınırlı olduğu düşüncesini akla getirmektedir.

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

Bu bulguların özellikle bahsi geçen gruplarda artmış karaciğer fonksiyon testleriyle desteklenmesi çalışmamız açısından değerli bir sonuçtur. Çalışmmaızda AST enzimi yine sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında kontrol grubuna göre artarken bu artış özellikle sepsis+vitamin D grubunda daha yüksektir. ALT enzimi sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında kontrole göre artarken, sepsis+vitamin D grubundaki ALT artışı diğer tüm gruplara göre istatisitksel olarak anlamlıdır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz radikal metabolizması enzimleri sonuçları , karaciğer fonksiyon testleri enzimleri sonuçları ve histopatoloji sonuçları birbiriyle uyumluluk göstermektedir. Karaciğer fonksiyon testlerinin yükseklik gösterdiği sepsis ve sepsis + D vitamin gruplarında değişik derecelerde hücre hasarı ortya çıkmıştır. Çalışmamız açısından histopatolojik sonuçlar ve karaciğre fonsiyon testlerine eşlik eden esas bulgu sepsis ve sepsis+D vitamini ve yalın D vitamini gruplarında CAT aktivitelerinde kontrole göre anlamlı bir baskılanmanın ortaya çıkmasıdır. Özellikle CAT aktivitelerinin sepsis+vitamin D gruplarında

diğer gruplara göre istatistiksel olarak en ciddi anlamda baskılanmış olması literatüre yeni bir bilgi olarak girecektir.

Çalışmamızda sepsis+vitamin D grubunda CAT enzim aktivite baskılanmasına eşlik eden GST aktivitesinin baskılanması da vitamin D'nin Koren ve ark. çalışmalarında bahsettiği gibi redoks potansiyelini değiştirdiği düşüncesini akla getirmektedir. Özelikle sepsis+vitamin D grubunda GST baskılanması glutatyon bağımlı ve hidrojen peroksit bağımlı antioksidan savunma mekanizmalarında ikili bir baskılanmayı düşündürmektedir. GSH-Px aktivitesinin düşme eğilimi göstermesi özellikle H_2O_2 metabolizması bakımından önemliyken bunun yanı sıra sepsis + D vitamini grununda GST baskılanması vitamin D'nin hücre içi GSSG/GSH oranlarını değiştirerek pro-oksidan etki gösterdiği görüşünü desteklemektedir. Çalışmamızda sepsis+vitamin D grubunda histopatolojik olarak portal alanda hücre infiltrasyonunun görünmesi ve bunun yanısıra karaciğer parankiminde ender küçük nekrotik alanların tespiti bu grupta halen hasarın sürdüğünü göstermektedir.

Çalışmamızdaki en önemli bulgu CAT enzim aktivitesinin sepsis, sepsis+vitamin D ve yalın D vitamini gruplarında ciddi anlamda baskılanmış olmasıdır. Bu bulgu özellikle H_2O_2 metabolizması açısından önem taşımaktadır. H_2O_2 metabolizması açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlam ifade etmese dahi GSH-Px aktivtesinin de sepsis+vitamin D grubunda baskılanma eğilimi göstermesi bu grupta H_2O_2 metabolizması bakımından bir problem olduğu düşüncesini akla getirmektedir. Çalışmamızda özellikle SOD aktivitesinde herhangi bir değişim olmaması ortamda artmış hidrojen peroksitten ziyade ,

artmış okisjen bazlı radikallerin H_2O_2'yi kullanan enzimlerden katalazın özellikle baskılanmasına yol açmış olabilir. Hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan enzimlerden diğeri olan GSH-Px aktivitelerinin özellikle vitamin D ve sepsis+vitamin D gruplarında düşme eğilimi gösterdiğinin test edilmesi vitamin D'nin özellikle CAT enzimi üzerinden pro-oksidan etkiye yol açtığı veya koruyucu etkisi olamadığı fikrini akla getirmektedir. Sepsis+vitamin D grubunda ortaya çıkan hücresel hasar vitamin D'nin proksidan etkisi özelikle CAT'ın veya GST'nin baskılanmasıyla ilişkili olabilir.

Çalışmamızda özellikle sepsis ve sepsis+vitamin D grubunda ortaya çıkan ve histopatolojiyle desteklenen sonuçlara bakıldığında vitamin D'nin sepsis olgularında koruyuculuğunun yeterli olmadığı görüşlerini desteklemektedir. Özellikle kontrol grubuna göre diğer gruplarda CAT aktivitesinin baskılanmış olması hücre içinde H_2O_2 detoksifiye edilmesini engellemiş olabilir. Artmış H_2O_2 ise Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikaline dönüşmüş olabilir. Çalışmamızda GSH-Px aktivitelerinin gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık ifade etmese dahi baskılanma eğiliminde olması buna karşın özellikle vitamin D ve sepsis+vitamin D gruplarında CAT aktivitelerinin ciddi olarak baskılanmış olması vitamin D'nin serbest radikal metabolizması açısından H_2O_2'yi metabolize eden enzimlerle ciddi bir ilişkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Sepsis+vitamin D grubunda histopatolojik olarak halen bazı nekroz alanlarının da gözlenmesi bu grupta toksik etkinin devam ettiğini göstermektedir. Bu bulgularımız Koren ve ark. çalışmalarında bahsettikleri H_2O_2

artışı ve bu artışa bağlı vitamin D toksisitesini ortaya çıkaran hipotezle uyum halindedir.

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

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

6. SONUÇ

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

7. KAYNAKLAR

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Critical care medicine. 2001;29(7):1303-10.

2. Muller K, Diamant M, Bendtzen K. Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Immunology letters. 1991;28(2):115-20.

3. Moller S, Laigaard F, Olgaard K, Hemmingsen C. Effect of 1,25-dihydroxy-vitamin D3 in experimental sepsis. International journal of medical sciences. 2007;4(4):190-5.

4. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1Alpha,25 dihydroxyvitamin D3: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. Journal of nutritional science and vitaminology. 2009;55(3):215-22.

5. Skirecki T, Borkowska-Zielinska U, Zlotorowicz M, Hoser G. Sepsis immunopathology: perspectives of monitoring and modulation of the immune disturbances. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2012;60(2):123-35.

6. Lewis DH, Chan DL, Pinheiro D, Armitage-Chan E, Garden OA. The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the

compensatory anti-inflammatory response, and regulatory T cells. Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine. 2012;26(3):457-82.

7. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992;101(6):1644-55.

8. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Critical care medicine. 2003;31(4):1250-6.

9. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Critical care medicine. 2006;34(2):344-53.

10. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. The New England journal of medicine. 2003;348(16):1546-54.

11. Bochud PY, Bonten M, Marchetti O, Calandra T. Antimicrobial therapy for patients with severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. Critical care medicine. 2004;32(11 Suppl):S495-512.

12. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. Seminars in immunology. 1998;10(5):349-50.

13. Heine H, Rietschel ET, Ulmer AJ. The biology of endotoxin. Molecular biotechnology. 2001;19(3):279-96.

14. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature. 2002;420(6917):885-91.

15. Salyers AA WD. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington: American Society for Microbiology (ASM); 1994. 56-60 p.

16. Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, et al. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. The Journal of infectious diseases. 1995;171(3):639-44.

17. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature. 2000;406(6797):782-7.

18. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. Infection and immunity. 2002;70(3):1033-41.

19. Toll-like receptor. [21.04.2013]; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Toll-like_receptor.

20. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. The New England journal of medicine. 2003;348(2):138-50.

21. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. The New England journal of medicine. 1999;340(3):207-14.

22. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science. 1999;285(5425):248-51.

23. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. Annals of internal medicine. 1991;115(6):457-69.

24. Doğanay M. Sepsis:Yeni Tanımlar ve Patogenez. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 1996.

25. Wenzel RP, Pinsky MR, Ulevitch RJ, Young L. Current understanding of sepsis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1996;22(3):407-12.

26. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. Lancet. 1991;338(8769):732-6.

27. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Critical care medicine. 1999;27(7):1230-51.

28. Karaali R, Tabak F.Sepsis Patogenezi. [25.06.2013]; Available from: http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/12.pdf.

29. Öz H. Güncel Bilgiler Işığında Sepsis, Sepsis ve Organ Yetersizlikleri: Koagulasyon. [23/06/2013]; Available from: http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/51/5103.pdf.

30. Mete B. Güncel Bilgiler Işığında Sepsis, Sepsiste Böbrek ve Karaciğer. [23/06/2013]; Available from: http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/51/5105.pdf.

31. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Intensive care medicine. 2008;34(1):17-60.

32. Burnand B, Sloutskis D, Gianoli F, Cornuz J, Rickenbach M, Paccaud F, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D: distribution and determinants in the Swiss population. The American journal of clinical nutrition. 1992;56(3):537-42.

33. Haddad JG. Vitamin D--solar rays, the Milky Way, or both? The New England journal of medicine. 1992;326(18):1213-5.

34. Hollis BW, Johnson D, Hulsey TC, Ebeling M, Wagner CL. Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2011;26(10):2341-57.

35. Dini C, Bianchi A. The potential role of vitamin D for prevention and treatment of tuberculosis and infectious diseases. Annali dell'Istituto superiore di sanita. 2012;48(3):319-27.

36. Wagner CL, Taylor SN, Dawodu A, Johnson DD, Hollis BW. Vitamin D and its role during pregnancy in attaining optimal health of mother and fetus. Nutrients. 2012;4(3):208-30.

37. Chagas CE, Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. Nutrients. 2012;4(1):52-67.

38. Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, Slater S, et al. Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. Nutrition reviews. 2008;66(10 Suppl 2):S98-112.

39. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. Physiological reviews. 1998;78(4):1193-231.

40. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2011;96(7):1911-30.

41. Bringhurst FR, Demoy MB, Kronenberg HM. Vitamin D. Williams Textbook of Endokrinology , TenTh edition. Philadelphia, Saunders Elsevier 2003; 1317-1323.

42. Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response-The role of glucocorticoids and Vitamin D. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2010;120(2-3):86-95.

43. Watkins RR, Yamshchikov AV, Lemonovich TL, Salata RA. The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. The Journal of infection. 2011;63(5):321-6.

44. Khoo AL, Chai L, Koenen H, Joosten I, Netea M, van der Ven A. Translating the role of vitamin D3 in infectious diseases. Critical reviews in microbiology. 2012;38(2):122-35.

45. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. Nature reviews Immunology. 2008;8(9):685-98.

46. Chambers ES, Hawrylowicz CM. The impact of vitamin D on regulatory T cells. Current allergy and asthma reports. 2011;11(1):29-36.

47. Grant WB. Solar ultraviolet-B irradiance and vitamin D may reduce the risk of septicemia. Dermato-endocrinology. 2009;1(1):37-42.

48. Asakura H, Aoshima K, Suga Y, Yamazaki M, Morishita E, Saito M, et al. Beneficial effect of the active form of vitamin D3 against LPS-induced DIC but not against tissue-factor-induced DIC in rat models. Thrombosis and haemostasis. 2001;85(2):287-90.

49. Ginde AA, Camargo CA, Jr., Shapiro NI. Vitamin D insufficiency and sepsis severity in emergency department patients with suspected infection. Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine. 2011;18(5):551-4.

50. Webster NR, Galley HF. Immunomodulation in the critically ill. British journal of anaesthesia. 2009;103(1):70-81.

51. Equils O, Naiki Y, Shapiro AM, Michelsen K, Lu D, Adams J, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D inhibits lipopolysaccharide-induced immune activation in human endothelial cells. Clinical and experimental immunology. 2006;143(1): 58-64.

52. Horiuchi H, Nagata I, Komoriya K. Protective effect of vitamin D3 analogues on endotoxin shock in mice. Agents and actions. 1991;33(3-4):343-8.

53. Freedman DM, Looker AC, Chang SC, Graubard BI. Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States. Journal of the National Cancer Institute. 2007;99(21):1594-602.

54. Lim HS, Roychoudhuri R, Peto J, Schwartz G, Baade P, Moller H. Cancer survival is dependent on season of diagnosis and sunlight exposure. International journal of cancer Journal international du cancer. 2006;119(7):1530-6.

55. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nature reviews Cancer. 2007;7(9):684-700.

56. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, Lipkin M, et al. Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2007;103(3-5):708-11.

57. Stajner I. Season of breast cancer diagnosis and probability of death from breast cancer in the United States. International journal of cancer Journal international du cancer. 2010;126(12):3010-3.

58. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. The American journal of clinical nutrition. 2007;85(6):1586-91.

59. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? Journal of the American College of Cardiology. 2008;52(24):1949-56.

60. Walker MD, Fleischer J, Rundek T, McMahon DJ, Homma S, Sacco R, et al. Carotid vascular abnormalities in primary hyperparathyroidism. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2009;94(10):3849-56.

61. Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Atherosclerosis. 2009;205(1):255-60.

62. Krause R, Buhring M, Hopfenmuller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure. Lancet. 1998;352(9129):709-10.

63. Pilz S, Marz W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP, et al. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary

angiography. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2008;93(10):3927-35.

64. Liu E, Meigs JB, Pittas AG, Economos CD, McKeown NM, Booth SL, et al. Predicted 25-hydroxyvitamin D score and incident type 2 diabetes in the Framingham Offspring Study. The American journal of clinical nutrition. 2010;91(6):1627-33.

65. Ashraf A, Alvarez J, Saenz K, Gower B, McCormick K, Franklin F. Threshold for effects of vitamin D deficiency on glucose metabolism in obese female African-American adolescents. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2009;94(9):3200-6.

66. Pittas AG, Sun Q, Manson JE, Dawson-Hughes B, Hu FB. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and risk of incident type 2 diabetes in women. Diabetes care. 2010;33(9):2021-3.

67. Kositsawat J, Freeman VL, Gerber BS, Geraci S. Association of A1C levels with vitamin D status in U.S. adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey. Diabetes care. 2010;33(6):1236-8.

68. Diaz VA, Mainous AG, 3rd, Carek PJ, Wessell AM, Everett CJ. The association of vitamin D deficiency and insufficiency with diabetic nephropathy: implications for health disparities. Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM. 2009;22(5):521-7.

69. Aksoy H, Akcay F, Kurtul N, Baykal O, Avci B. Serum 1,25 dihydroxy vitamin D (1,25(OH)2D3), 25 hydroxy vitamin D (25(OH)D) and parathormone levels in diabetic retinopathy. Clinical biochemistry. 2000;33(1):47-51.

70. Janssens W, Lehouck A, Carremans C, Bouillon R, Mathieu C, Decramer M. Vitamin D beyond bones in chronic obstructive pulmonary disease: time to act. American journal of respiratory and critical care medicine.2009;179(8):630-6.

71. Fraser WD, Milan AM. Vitamin D assays: past and present debates, difficulties, and developments. Calcified tissue international. 2013;92(2):118-27.

72. Holick MF. Vitamin D deficiency. The New England journal of medicine. 2007;357(3):266-81.

73. Kaplan: Clinical Chemistry, 5th Edition Clinical References - Methods of Analysis, 25 (OH) D Vitamin.

74. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. The American journal of clinical nutrition. 2008;87(4):1080S-6S.

75. Akkus İ. Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri. Konya: Mimoza Basım, 1995.

76. Marzatico F, Cafe C. Oxygen radicals and other toxic oxygen metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. Functional neurology. 1993;8(1):51-66.

77. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. The American journal of medicine. 1991;91(3C):14S-22S.

78. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. Annals of internal medicine. 1980;93(3):480-9.

79. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic. 1988;63(4):381-9.

80. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. The American journal of medicine. 1991;91(3C):23S-30S.

81. Champe P.C, Harvey R.A. Lippincot's illustrated reviews: Biochemistry second edition, J B Lippincot Company, Philadelphia. 1994.

82. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. Annals of clinical biochemistry. 1998;35 (Pt 2):181-200.

83. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. Sendrom 2000; 9: 31-9.

84. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiological reviews. 1994;74(1):139-62.

85. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1982;47(5):412-26.

86. Aksoy Y. Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. T Klin J Med Sci 2002; 22: 442-448.

87. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. The American journal of medicine. 1991;91(3C):2S-13S.

88. Kılınç K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. Biyokimya Dergisi 1986; 11: 59-76.

89. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. Asian journal of andrology. 2003;5(3):231-42.

90. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. Reproductive biology and endocrinology : RB&E. 2005;3:43.

91. Jenkins RR, Tengi J. Catalase activity in skeletal muscle of varying fibre types. Experientia. 1981;37(1):67-8.

92. Cao Danh H, Strolin Benedetti M, Dostert P. Age-related changes in aldehyde dehydrogenase activity of rat brain, liver, and heart. Journal of neurochemistry. 1983;41(3):618-22.

93. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. The American journal of medicine. 1994;97(3A):5S-13S; discussion 22S-8S.

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

95. Javanbakht M, Keshavarz S, Mirshafiey A, Djalali M, Siassi F, Eshraghian M, et al. The effects of vitamins e and d supplementation on erythrocyte superoxide dismutase and catalase in atopic dermatitis. Iranian journal of public health. 2010;39(1):57-63.

96. Koren R, Hadari-Naor I, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. Cancer research. 2001;61(4):1439-44.

97. Hamden K, Carreau S, Boujbiha MA, Lajmi S, Aloulou D, Kchaou D, et al. Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: protective effect of 17 beta-estradiol. Steroids. 2008;73(5):495-501.

98. Mohamadin AM, Elberry AA, Elkablawy MA, Gawad HS, Al-Abbasi FA. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist abrogates lipopolysaccharide-induced toxicity and oxidative stress in rat liver. Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP. 2011;18(3):235-42.

99. Prauchner CA, Prestes Ade S, da Rocha JB. Effects of diphenyl diselenide on oxidative stress induced by sepsis in rats. Pathology, research and practice. 2011;207(9):554-8.

100. Rodriguez ZZ, Guanche D, Alvarez RG, Martinez Y, Alonso Y, Schulz S. Effects of ozone oxidative preconditioning on different hepatic biomarkers of oxidative stress in endotoxic shock in mice. Toxicology mechanisms and methods. 2011;21(3):236-40.

101. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry. 1951;193(1):265-75.

102. Durak I, Canbolat O, Kavutcu M, Ozturk HS, Yurtarslani Z. Activities of total, cytoplasmic, and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. Journal of clinical laboratory analysis. 1996;10(1):17-20.

103. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1967;70(1):158-69.

104. Aebi H. Catalase. In: H.U. Bergmeyer, editor. Methods of enzymatic analysis.New York and London: Academic Press;1974. p.673-677.

105. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal of biological chemistry. 1974;249(22):7130-9.

106. Uyanik MH, Albayrak A, Odabasoglu F, Karakus E, Ozden K, Polat B, et al. Effects of diabetes on cytokines and oxidative organ injury in a rat model of sepsis. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2012;58 Suppl:OL1623-31.

107. Allameh A, Razavi-Azarkhiavi K, Mohsenifar A, Jamali-Zavarei M. Effect of acute ethanol treatment on biochemical and histopathological factors in rat liver in an experimental sepsis model. Pathology, research and practice. 2012;208(6):331-7.

108. Noyan T, Balaharoglu R, Komuroglu U. The oxidant and antioxidant effects of 25-hydroxyvitamin D3 in liver, kidney and heart tissues of diabetic rats. Clinical and experimental medicine. 2005;5(1):31-6.

109. Ravid A, Rocker D, Machlenkin A, Rotem C, Hochman A, Kessler-Icekson G, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. Cancer research. 1999;59(4):862-7.

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

111. Minotti G. Sources and role of iron in lipid peroxidation. Chemical research in toxicology. 1993;6(2):134-46.

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

8. ÖZET

LİPOPOLİSAKKARİT İLE SEPSİS OLUŞTURULAN RATLARIN KARACİĞER DOKULARINDA SERBEST RADİKAL METABOLİZMASININ İNCELENMESİ; VİTAMİN D'NİN ETKİSİ

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

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

SOD ve GSH-Px aktivitelerinde gruplar arasında fark görülmedi. CAT aktivitelerinde en fazla sepsis+vitamin D grubunda olmak üzere tüm gruplarda kontrol grubuna göre baskılanma görüldü. GST aktivitelerinin sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında baskılandığı görüldü. AST ve ALT düzeylerinde sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında artış olduğu gözlendi. Kontrol ve vitamin D grupları normal histolojik yapı gösterirken, sepsis ve sepsis+vitamin D gruplarında inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve parankimde nekroz alanları görüldü.

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

Anahtar kelimeler: karaciğer toksisitesi , sepsis , D vitamini , antioksidan enzimler

9. SUMMARY

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

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

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

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

were depressed in sepsis ve sepsis+vitamin D group. AST and ALT levels were elevated in sepsis and sepsis+vitamin D group. While control and vitamin D groups showed normal histological structure, inflammatory cell infiltration and necrosis were seen in the parenchyma in sepsis and sespsis+vitamin D groups.

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

Key words: hepatotoxicity , sepsis , vitamin D , antioxidant enzymes

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Mehmet Zahit

Soyadı: Çıracı

Doğum Yeri ve Tarihi: Konya - 15.09.1984

Eğitimi: 2009-2013: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.

2002-2008: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği

Türk Klinik Biyokimya Derneği

Türk Biyokimya Derneği

Bilimsel Etkinlikleri:

Yurt dışı yayınlar:

1. Gurbuz N, Coskun ZK, Omeroglu S, Bayraktar AC, Ciraci Z. Antioxidative and therapeutic effects of spirulina on trichloroethylene induced cutaneous irritation balb/c mice. Bratisl Lek Listy. 2013;114(4):192-8.

Poster sunumları:

1. Gülbahar Ö, Çıracı MZ, Elbeg Ş, Paşaoğlu H. Hastane Verileri Kullanılarak 25(OH)Vitamin-D'nin Referans Aralığının Hesaplanması. 22.Ulusal Biyokimya Kongresi. 27-30 Ekim 2010 / Eskişehir

2. Çıracı Z, Demirtaş C, Tuncel AF, Elbeg Ş, Gülbahar Ö, Paşaoğlu H. Akut Koroner Sendrom Erken Tanısında Troponin mi? Yüksek Duyarlıklı Troponin mi? 7. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi. 27 Eylül-1 Ekim 2011/ Dalaman, Muğla

3. Ispir E, Serdar MA, Ozgurtas T, Pasaoğlu H, Cıracı Z, Kurt I. Comparison of Four Immunoassay Analyzers For Inverse Log/linear Relationship of TSH and FT4. AACC 2012 Annual Meeting & Clinical Lab Expo. July 15-19. Los Angeles, California

4. Gülbahar Ö, Çıracı MZ, Gönül İI, Karakuş E, Kocabıyık M, Demirtaş C, Elbeg Ş, Paşaoğlu H. Prostat Kanserinde PSA'nın Klinik Performansının değerlendirilmesi. 8. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi. 18-22 Eylül 2012 / Bodrum

5. Gülbahar Ö, Kocabıyık M, Çıracı MZ, Demirtaş C, Elbeg Ş, Paşaoğlu H. Süreç Sigma Değerleri Kullanılarak Rutin Biyokimyasal Testlerin Analizleri ve Cihazların Performanslarının Kıyaslanması. 8. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi. 18-22 Eylül 2012 / Bodrum

6. Gulbahar O, Kocabiyik M, Ciraci MZ, Cingirt M, Demirtas C, Ucar F, Bayraktar N, Akbiyik F, Yavuz Taslipinar M. Analytical Performances Of Different Laboratories Which Use Various Analyzers Of Biochemistry. 20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab). 19-23 May 2013. Italy, Milan

7. Ozciftci S, Gamli M, Ornek D, Horasanli E, Dikmen B, Canbolat O, Ciraci MZ. The Effects Of Fluids Given Peroperatively On Injury Of Ischemia/Reperfusion. III NWAC 2012 Sayfa 54, Poster no: 46. İstanbul

Sözlü Sunumlar:

1. Elbeg Ş, Tuncel AF, Demirtaş C, Çıracı Z, Gülbahar Ö, Paşaoğlu H. Serum 25 OH Vitamin D Ölçümünde Kullanılan HPLC ve ELISA Yöntemlerinin Karşılaştırılması. 7. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi. 27 Eylül-1 Ekim 2011/ Dalaman, Muğla

Katıldığı Kongreler:

1. Türk Biyokimya Derneği 22.Ulusal Biyokimya Kongresi. 27-30 Ekim 2010 / Eskişehir

2. Türk Klinik Biyokimya Derneği 11. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi. 28 Nisan – 1 Mayıs 2011 / Antalya

3. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 7. Ulusal Kongresi. 27 Eylül - 1 Ekim 2011 / Dalaman, Muğla

4. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 8. Ulusal Kongresi. 18-22 Eylül 2012 / Bodrum

Katıldığı Kurslar:

1. Türk Biyokimya Derneği, Yöntem Geçerliliğini Kanıtlama (Metod Validasyonu) Kursu. 27 Ekim 2010 / Eskişehir
2. Gazi Üniversitesi Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi, VIII. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu. 22-30 Kasım 2010 /Ankara
3. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, Klinik Laboratuvarlarda Elektroforez Kursu. 29 Eylül 2011 / Dalaman, Muğla
4. Türk Biyokimya Derneği, Kalite Klavuzları Temelinde Laboratuvar Hesaplamaları ve Değerlendirmeleri Kursu, 11-12 Mayıs 2012 / Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara
5. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, Bilimsel Araştırmalarda Temel İlkeler Sağlık Bilimlerinde SPSS Kullanım Kursu. 21 Eylül 2012 / Bodrum