

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

**LİPOPOLİSAKKARİT İLE SEPSİS OLUŞTURULAN
RATLARIN KALP DOKULARINDA SERBEST RADİKAL
METABOLİZMASININ İNCELENMESİ;
D VİTAMİNİNİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. MURAT KOCABIYIK**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MUSTAFA KAVUTÇU**

**ANKARA
ARALIK 2015**

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

**LİPOPOLİSAKKARİT İLE SEPSİS OLUŞTURULAN
RATLARIN KALP DOKULARINDA SERBEST RADİKAL
METABOLİZMASININ İNCELENMESİ;
D VİTAMİNİNİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. MURAT KOCABIYIK**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MUSTAFA KAVUTÇU**

**ANKARA
ARALIK 2015**

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Dr. Murat KOCABIYIK
Baba Adı	Hasan Ali
Doğum Yeri/Tarihi	SENİRKENT/1985
Diploma Tarihi / Diploma No	30/06/2009 2009-09-176
Mezun Olduğu Fakülte	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Biyokimya
İhtisas Süresi	Yıl: 4 Ay:2
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Lipopolisakkaritler ile Sepsis Oluşturulan Ratların Kalp Dokularında Serbest Radikal Metabolizmasının İncelenmesi; D Vitamininin Etkisi

JÜRİ KARARI: BAŞARILI

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK

ÜYE

Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU

ÜYE

Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL, TABLO, GRAFİK VE RESİM LİSTELERİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sepsis	3
2.1.1. Epidemiyoloji	9
2.1.2. Etyoloji	10
2.1.3. Fizyopatoloji.....	11
2.1.4. Sepsisin Organ ve Sistemler Üzerine Etkileri	16
2.1.4.1. Dolaşım Sistemi.....	16
2.1.4.1.1. Santral Dolaşım	17
2.1.4.1.2. Bölgesel Dolaşım.....	17
2.1.4.1.3. Mikrosirkülasyon.....	17
2.1.4.2. Akciğerler	18
2.1.4.3. Gastrointestinal Sistem.....	18
2.1.4.4. Karaciğer	18
2.1.4.5. Böbrekler.....	19
2.1.5. Sepsis ve Kalp.....	19
2.1.6. Sepsiste Tedavi.....	20
2.2. D Vitamini	21
2.2.1. D Vitamininin Formları.....	21
2.2.2. D Vitamininin Sentez ve Metabolizması	22
2.2.3. D Vitamininin Etki Mekanizması	24
2.2.3.1. D Vitamininin Kalsiyum Metabolizması Üzerine Etkisi.....	25
2.2.3.2. D Vitamininin İmmünolojik Etkileri	26
2.2.3.3. D Vitamini ve Sepsis	27
2.2.3.4. D Vitamini ve Kanser	29
2.2.3.5. D Vitamini ve Kardiyovasküler sistem.....	29

2.2.3.6. D Vitamini ve Diabetes Mellitus.....	30
2.2.4. D Vitamini Eksikliği.....	31
2.3. Serbest Radikaller	32
2.3.1. Reaktif oksijen Türleri	33
2.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2\bullet^-$)	33
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	34
2.3.1.3. Hidroksil Radikali ($\bullet OH$)	34
2.3.1.4. Hipokloröz Asit (HOCl)	35
2.3.1.5. Nitrik Oksit (NO).....	35
2.3.2. Serbest Radikallerin Hücresel Komponentler Üzerine Etkisi	36
2.3.2.1. Lipidlere Olan Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)	36
2.3.2.2. Proteinlere Etkileri	36
2.3.2.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	37
2.3.2.4. Karbonhidratlara Etkileri.....	37
2.3.2.5. Ekstrasellüler Etkileri.....	37
2.3.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	38
2.4. Antioksidan Sistem.....	39
2.4.1. Enzim olan Antioksidanlar	39
2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz	39
2.4.1.2. Katalaz (CAT)	40
2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	41
2.4.1.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)	41
2.4.1.5. Glutasyon S-Transferaz (GST).....	42
2.4.1.6. Nitrik Oksit Sentaz.....	43
2.4.1.7. Enzim olmayan antioksidanlar	43
2.5. D Vitamini Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi.....	44
2.6. Sepsis- Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	48
3.2. Kullanılan Aletler	50
3.3. Yöntemlerin Uygulanması.....	51

3.3.1. Total Protein Ölçümü	51
3.3.2. Superoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	52
3.3.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü.....	53
3.3.4. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	55
3.3.5. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzim Ölçümü	55
3.3.6. Malondialdehid (MDA) Miktarının Ölçümü	57
3.4. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	58
3.5. İstatistiksel Analiz.....	58
4. BULGULAR	60
4.1. Ratların Sepsis Bulgularının Değerlendirilmesi	60
4.1.1. Ratların Gözlemsel Sepsis Bulguları	60
4.1.2. Ratların Rektal Yolla Ölçülen Vücut Sıcaklıkları.....	60
4.1.3. Ratların Gruplara Göre Kalp Atım Sayıları.....	62
4.1.4. Ratların Gruplara Göre Solunum Sayıları	63
4.2. Rat Kalp Dokularında Enzim Aktiviteleri	64
4.2.1. Rat Kalp Dokularının SOD Aktiviteleri	67
4.2.2. Rat Kalp Dokularının CAT Aktiviteleri.....	67
4.2.3. Rat Kalp Dokularının GSH-Px Aktiviteleri	68
4.2.4. Rat Kalp Dokularının NOS Aktiviteleri	68
4.2.5. Rat Kalp Dokularının MDA miktarları.....	69
4.2.6. Tüm Enzim Aktiviteleri ve MDA seviyeleri	69
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	71
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ	88
7. KAYNAKLAR	89
8. ÖZET	100
9. SUMMARY	102
10. ÖZGEÇMİŞ.....	104

KISALTMALAR

AMP: Anti Mikrobiyal Peptid

APC: Antijen Sunan Hücre

ARDS: Akut Respiratuar Distres Sendrom

BSA: Bovin Serum Albumin

CAT: Katalaz

CDNB: 1-Kloro 2,4 Dinitrobenzen

DBP: D vitamini Bağlayıcı Protein

DIC: Dissemine İntravasküler Koagülasyon

DNPG: Dinitrofenilglutasyon

EF: Ejeksiyon Fraksiyonu

GM-CSF: Granülosit Monosit Koloni Stimulan Faktör

GSH: İndirgenmiş Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

GSSG: Oksitlenmiş Glutasyon

GST: Glutasyon-S-Transferaz

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

IFN- γ : İnterferon Gama

IL-1: İnterlökin-1

IL-10: İnterlökin-10

IL-12: İnterlökin-12

IL-1 β : 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- κ B: Nükleer Faktör Kappa Beta

NHANES: Ulusal Sağlık ve Beslenmenin İncelenmesi

NO: Nitrik Oksit

NO₂: Azot Dioksit

O₂⁻: 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, TABLO, GRAFİK VE RESİM LİSTELERİ

Şekil 1. Sepsis, Enfeksiyon ve SIRS ilişkisi

Şekil 2. Sepsis fizyopatolojisi

Şekil 3. Vitamin D'nin iki temel formu

Şekil 4. D Vitamini Sentezi

Şekil 5. D Vitamini etki mekanizması

Şekil 6. D vitamininin kemikler üzerindeki etkisi

Tablo 1. Hücrelerde serbest radikal kaynakları

Tablo 2. Ratların gözlemsel sepsis bulguları

Tablo 3. Ratların rektal yolla ölçülen vücut sıcaklıkları

Tablo 4. Ratların kalp atım sayıları

Tablo 5. Ratların solunum sayıları

Tablo 6. Rat kalp dokularında enzim aktiviteleri ve MDA miktarlarına ait

ortalama±standart sapma değerleri

Tablo 7. Tüm gruplara ait korelasyon analizi

Tablo 8. SHAM grubuna ait korelasyon analizi

Tablo 9. D Vitamini grubuna ait korelasyon analizi

Tablo 10. Sepsis grubuna ait korelasyon analizi

Tablo 11. D Vitamini + Sepsis grubuna ait korelasyon analizi

Grafik 1. Protein Standard Grafiğ

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

Grafik 3. Ratların tüm gruplarda kalp atım sayısı

Grafik 4. Ratların tüm gruplarda solunum sayısı

Grafik 5. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait SOD aktiviteleri

Grafik 6. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait CAT aktiviteleri

Grafik 7. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait GSH-Px aktiviteleri

Grafik 8. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait NOS aktiviteleri

Grafik 9. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait MDA miktarları

Grafik 10. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait tüm enzim aktiviteleri ve MDA miktarları

Resim 1: SHAM Grubu

Resim 2: SHAM Grubu

Resim 3: D Vitamini Grubu

Resim 4: D Vitamini Grubu

Resim 5: Sepsis Grubu

Resim 6: Sepsis Grubu

Resim 7: Sepsis Grubu

Resim 8: Sepsis Grubu

Resim 10: D Vit+ Sepsis Grubu

Resim 11: D Vit+ Sepsis Grubu

1. GİRİŞ

Sepsis, kanıtlanmış ya da şüphe edilen enfeksiyon varlığında tüm sistemleri etkileyen genel durum bozukluğu tablosudur. Enfeksiyon etkenine karşı oluşan abartılı immünolojik yanıt, tüm organ ve sistemlere zarar verebilmektedir.

Hem insanlardaki beklenen ömür süresinin artmasına paralel yaşlı nüfusun artması, hem de tıptaki ilerlemelere bağlı olarak gelişen invaziv girişimlerin ve immünsüpresif tedavilerin çoğalması, sepsis insidansını artırmıştır . Her gün 1400 kişinin sepsis nedeniyle hayatını kaybettiği göz önünde bulundurulursa, sepsis tablosunun tedavisinin önemi daha iyi anlaşılabilir (1, 2).

Sepsisin tedavisinde, sadece enfeksiyon ajanına karşı bir mücadele yürütülmemekte, aynı zamanda enfeksiyona karşı gelişen aşırı immünolojik yanıt ve bu yanıtla bağlı gelişen organ hasarlarının önlenmesi de hedeflenmektedir. Bu nedenle uygun antibiyotiklerin yanısıra immün modülatuarların kullanılması da güncel yaklaşımlar içindedir (2)

Sepsiste enfeksiyon ajanları ile uyarım sonucu proinflamatuvar sitokinlerden interlökin-1-beta (IL-1- β), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), salınımı artmaktadır (3, 4). Salınan proinflamatuvar mediyatörler serbest radikal oluşumunu tetiklemekte, oluşan serbest radikaller de oksidatif strese neden olmaktadır. Endotoksik şok tablosunun oksidatif stresle beraber seyretmesi de sepsis tablosunu ağırlaştırmaktadır.

D vitamininin, özellikle kemik ve kalsiyum metabolizması üzerinde düzenleyici etkisi olmakla birlikte immün sistem üzerinde de immünsüpresif bir

rol oynadığı düşünölmektedir (5). Ayrıca antioksidan enzimleri artırarak oksidatif stresi azalttığı da kaydedilmiştir (6).

Çalışmamızda, deneysel sepsis oluşturulmuş ratların kalp dokularında serbest radikal metabolizmasını ve bu metabolizma üzerine D Vitamininin etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızın, sepsiste kalp dokusundaki antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu üzerinde D vitamininin etkisini inceleyen ilk çalışma olduğunu düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

Yunanca çürüme ve ayrışma anlamına gelen "σήψη" (sepo) kökünden türetilen Sepsis kelimesini, milattan önce 5. yüzyılda yaşamış olan Hipokrat, Corpus Hippocraticum adlı kitabında “hastalık yapan tehlikeli et çürümesi” şeklinde tarif etmiş ve bu olayın, kolondan kaynaklanan otointoksikasyona bağlı olduğunu yazmıştır (7-9). MÖ 4. Yüzyılda yaşamış olan Aristo ise Sepsisin kaynağının bataklıklarda yaşayan gözle görülmeyen canlılar olduğunu iddia etmiştir (9).

İbn-i Sina, 1020 yılında yazdığı El Kanun fi’ t Tıb adlı kitabında, bulaşıcı hastalıkların gözle görülmeyen canlılar tarafından meydana getirildiği yazmıştır (10).

1546 yılına gelindiğinde ise İtalyan bilim adamı Hieronymus Fracastorius enfeksiyonların, küçük partiküllerle ya da sporlarla taşınıp epidemik hastalıklara sebep olabileceğini savunan “Germ Teorisi”ni öne sürmüştü ve bu teori 17. yüzyılda Hollandalı Anton van Leeuwenhoek ve İngiliz Robert Hooke tarafından bulunan mikroskop sayesinde desteklenmiş ve geliştirilmiştir (7, 11).

1841 yılında ise Alman asıllı Macar hekim Ignaz Philipp Semmelweiss, otopsi incelemesi yaptıktan sonra ellerini yıkamadan doğum yaptıran hekim ve tıp öğrencilerinin, kadavranın ölümüne sebep olan zehiri, doğum yapan kadına taşıdıklarını ve bu kadınlarda puerperal sepsise sebep olduklarını belirtmiştir (9). Semmelweiss, sağlıkçıların hastaya dokunmadan önce ve işlem sonrasında el

yıkama uygulaması yapması ile doğum sonrası mortaliteyi %16'dan %2'ye düşürmüş ve “Annelerin kurtarıcısı” lakabıyla anılmaya başlanmıştır (9).

1822-1895 yılları arasında yaşamış olan Fransız mikrobiyolog ve kimyager Louis Pasteur çürümenin yaşayan mikroorganizmalara mutlak bir biçimde ihtiyaç duyduğunu kanıtlamış ve kendiliğinden oluşum hipotezini çürütmüştür (9).

Pasteur'un çalışmalarından etkilenen İngiliz cerrah Joseph Lister (1827-1912) ameliyat sonrası oluşan sepsis tablosundan açık yarayla temas eden cerrahi aletlerin taşıdığı enfeksiyöz ajanların sorumlu olduğunu düşünmüş ve açık yarayla temas eden her şeyin karbonik asit ile sterilize edilmesi gerektiğini savunmuştur. Sterilizasyon yöntemi ile hem postop sepsis, hem de sepsise bağlı mortalite oranlarında belirgin azalma görülmüştür (12).

1843-1910 yılları arasında yaşamış olan Alman hekim Robert Koch, enfeksiyöz hastalıkların etkenlerine yönelik incelemelerde bulunmuş ve bir organizmanın, bir hastalığın etkeni olması için aşağıdaki kriterleri taşıması gerektiğini belirtmiştir (13):

- 1) Hasta konaktan, hastalık sebebi izole edilebilmeli
- 2) Hastalık ajanı, kültürde üretilbilmeli
- 3) Kültürde üretilen etken, sağlıklı konağa verildiğinde aynı hastalığı oluşturabilmeli
- 4) Deneysel olarak hastalık bulaştırılan konaktan aynı etken izole edilebilmeli

1991 yılına kadar Sepsis ve Sepsisle ilişkili durumların tanımlarında karışıklık bulunmaktaydı. Amerikan Göğüs Hastalıkları Uzmanları Derneği

[American College of Chest Physicians (ACCP)] ve Yoğun Bakım Dernekleri [Society of Critical Care Medicine]] tarafından düzenlenen uzlaşı konferansında mortalitesi yüksek olan bu tablonun tanımlanmasında söz birliği olması, organ yetmezliklerinin erken tanınması, erken tedaviye başlanıp mortalitenin azaltılması ve yapılan çalışmaların standardizasyonunun sağlanması amacıyla sepsis ve ilişkili durumlar aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (14).

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: $\leq 36^{\circ}\text{C}$ veya $\geq 38^{\circ}\text{C}$,

Taşikardi: >90 atım/dk,

Takipne: solunum sayısı $>20/\text{dk}$ veya $\text{PaCO}_2 \leq 32$ mmHg,

Lökosit sayısı $\geq 12000/\text{mm}^3$ veya $<4000/\text{mm}^3$ ya da %10 immatür bant formu varlığı

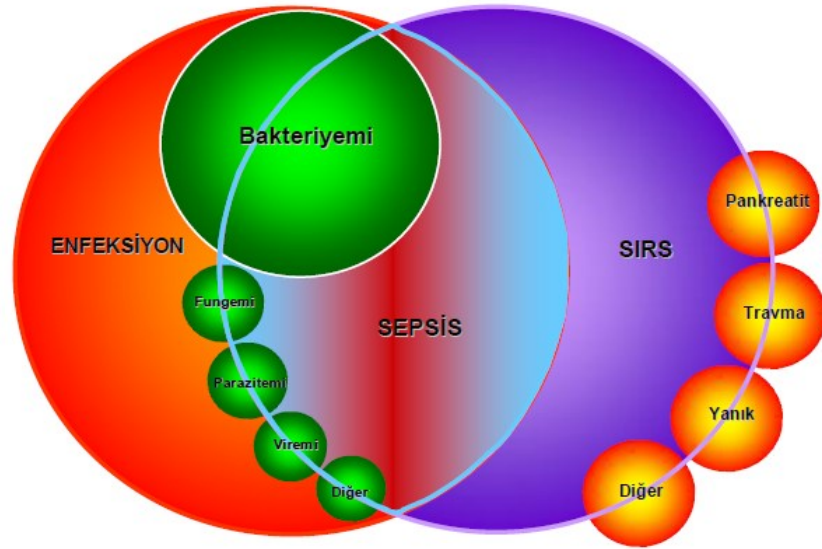
Sepsis: Enfeksiyonun tetiklediği sistemik inflamatuvar yanıt (Enfeksiyona bağlı SIRS)

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 konusunda artan araştırmalar ve güncellenen bilgiler sebebiyle 2001 yılında yapılan Uluslararası Sepsis Tanımlamaları Toplantısı yapılmış ve Sepsisin tanımı “kanıtlanmış ya da şüphe edilen enfeksiyon (bir mikroorganizma

tarafından oluşturulan patolojik süreç) varlığı ile beraber aşağıdaki kriterlerden iki veya daha fazlasının bulunması” şeklinde yapılmıştır (15).

A. Genel değişkenler

- Ateş $> 38,3^{\circ}\text{C}$
- Hipotermi $< 36^{\circ}\text{C}$
- Kalp atım sayısı $> 90/\text{dk}$ ya da yaşa göre normal değerlerinden standart sapma > 2
- Takipne $> 30/\text{dk}$
- Mental durum değişikliği
- Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte $> 20\text{mL/kg}$)
- Diyabet yokluğunda hiperglisemi (plazma glukoz $> 7,7 \text{ mmol/L}$ ya da $> 110\text{mg/dL}$)

B. İnflamatuvar değişkenler

- Lökositoz ($> 12000/\text{mm}^3$) ya da lökopeni ($< 4000/\text{mm}^3$)
- 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 (SO₂) > % 70
- Kardiyak indeks > 3,5 L/dk/m²

D. Organ disfonksiyon değişkenleri

· Arteriyel hipoksemi (PaO₂/FıO₂ < 300)

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

- Kreatinin artışı (> 0.5mg/dL)
- Koagülasyon anormallikleri (INR >1,5 veya aPTT > 60 saniye)
- İleus (bağırsak seslerinin yokluğu)
- Trombositopeni (trombosit sayısı < 100.000/mm³)
- Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin > 4 mg/dL veya 70 mmol/L)

E. Doku perfüzyon değişkenleri

- Hiperlaktatemi (> 3 mmol/L)
- Kapiller dolmanın azalması veya beneklenme

2.1.1. Epidemiyoloji

Sepsisli hastalarda çoğunlukla malignite, KOAH, kronik böbrek yetmezliği, siroz ve diabet gibi bir eşlik eden hastalık veya immünsüpresyon, steroid kullanımı, asplenizm, kemoterapi, nötropeni, yabancı cisim varlığı, majör cerrahi operasyon geçirme ve obstrüksiyon gibi zemin hazırlayıcı bir faktör bulunur. Bu nedenle sepsis bulgularından bu hastalık ya da faktör de sorumlu tutulabileceğinden sepsis tanısı güçlükle konulabilmektedir. Bu durum sepsis insidansının tam olarak saptanamamasına sebep olmaktadır (16).

Tanı ve tedavi amaçlı yapılan girişimsel teknikler sepsis için zemin hazırlamakta ve sepsis olgularının çoğunun hastane ortamında gelişmesine sebep olmaktadır (17, 18). Hastane kaynaklı sepsislerde üriner sonda ile ilişkili pyelonefrit, ventilatörle ilişkili pnömoni, karın içi enfeksiyon (sekonder peritonit, abse) ve yabancı cisim enfeksiyonları en sık odaklardır (16).

Sepsis ve septik şokla ilgili verilere bakıldığında bu klinik tabloların önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında olduğu anlaşılabacaktır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1979 yılı sepsis insidansı 82,7/100000 iken 2000 yılına kadar bu oran yıllık %8,7'lik bir artışla 240,4/100000 olarak saptanmıştır (1). ABD'de ağır sepsis insidansının %0,3, yoğun bakım gereksiniminin %51,1 ve mortalitenin de %28,6 olduğu bulunmuştur (2). Dünyada her gün 1400, yılda yaklaşık 500000 hastanın sepsis nedeniyle öldüğü tahmin edilmekte olup, sepsis ABD'de ölüm nedenleri arasında 10. sırada yer almaktadır (1, 2).

2002 yılında yapılan ve 24 Avrupa ülkesinde 198 yoğun bakım ünitesini kapsayan bir çalışmada sepsis insidansı %37 olarak bulunmuş, en sık enfeksiyon

odağı olarak %68 akciğer, %22 batın, %20 kan ve %14 üriner sistem tespit edilmiştir.(19)

2.1.2. Etyoloji

Sepsis çeşitli infeksiyöz mikroorganizmalara bağlı olarak gelişebildiği gibi, ağır travma ve pankreatit gibi noninfeksiyöz olaylarla da meydana gelebilir. Olguların yarısında sorumlu etken gösterilememesine rağmen yapılan antibiyotik tedavilerine cevap vermesi bunlarda da infeksiyöz bir etkenin olduğunu düşündürmektedir (20).

1960-1980 yılları arasında gram negatif bakteriler olguların çoğunda etken durumda iken 80'lerin sonuna doğru gram pozitif bakteriler baskın konuma gelmişler, aynı süreçte fungal sepsisler de 3 kat artış kaydetmişlerdir (1, 20). Sepsiste en sık görülen mikroorganizmalar *Escherichia coli* (%22), *Streptococcus pneumoniae* (%16) ve *Staphylococcus aureus* (%12) olarak saptanmıştır (20, 21).

Gram pozitif sepsiste etken sıklıkla *S. aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar, enterokoklar ve streptokoklar iken, Gram negatif sepsiste etken sıklıkla *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*dır. Fungal sepsislerde kandida türleri ön plana çıkmakta ve görülme oranı ciddi sepsis ve septik şok olgularında %5'e varmaktadır.(21)

2.1.3. Fiziopatoloji

Sepsis fiziopatolojisi, sepsis sürecini başlatan enfeksiyon odağına karşı abartılı hücresel immünolojik yanıtla başlayan, sonrasında organ ve sistemler düzeyinde konağa zarar veren karmaşık mekanizmalar bütünüdür. Hüceler arası sinyal iletide rol oynayan mediyatörler ve sitokinler, sepsis oluşum sürecinde önemli rol oynamaktadır (22).

Patojenle ilişkili moleküler yapılar [Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)] şeklinde adlandırılan bakteri ürünleri vücudun doğal immünitesi tarafından algılanma ve tanınma özelliğine sahiptir (23). Gram negatif hücre duvarında yer alan Lipopolisakkaritler (LPS) en önemli PAMPs'lardan biridir ve septik sürecin tetiklenmesinde kilit rol oynar (24).

Gram pozitif bakterilerde endotoksin bulunmamakta ancak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma yeteneğinde olan ve proinflatuar özellik gösteren peptidoglikan ve lipoteikoik asit içeren hücre duvarı yapısıyla immün sisteminin aktivasyonunu sağlamaktadır (24). Bazı gram pozitif bakteriler ekzotoksinleri sayesinde septik şoka sebep olmaktadır. Toksik Şok Sendromu Toksin-1 (TSST-1) adlı ekzotoksini *S. aureus* salgımlarken *S. pyogenes* ise pirojenik ekzotoksini sayesinde toksik şok sendromuna sebep olmaktadır (25).

Septik şoku başlatan olay bakterilerin lizisi sonucunda LPS veya toksik hücre duvarı komponentlerinin organizmanın dolaşım sistemine geçmesidir. Gram negatif bakteri orijinli LPS ilk olarak özel plazma proteinleri (LPS-Binding Proteinler) tarafından bağlanır ve bu kompleks monosit ve makrofaj yüzeyindeki CD14 reseptörleri ve endotelial hücreler gibi diğer bazı konak hücrelerinin yüzey

reseptörleriyle etkileşime girerler. Gram pozitif hücre duvarı bileşeni peptidoglikan ve lipoteikoik asitlerin başlangıçta hangi proteinlerle etkileşime geçtiği tam olarak bilinmese de her iki olaydan sonra aynı şok mediatörlerinin açığa çıkması LPS ile aynı konak hücrelerini aktive ettiklerini düşündürmektedir (26).

CD14 hem hücre membranında (mCD14) hem de dolaşımda (sCD14) bulunmaktadır ve dolaşımda bulunan sCD14'ler hücre yüzeyinde CD14 reseptörü olmayan dendritik hücreler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri gibi hücrelerle etkileşime girerek LPS ile uyarılmalarını sağlamaktadır (27).

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 CD14'le tutulan PAMPs'ları tanır. 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 ve böylece sitokin sentezi için kopyalama başlamış olur (28, 29).

Antijenik yapı ve toksinler, immün sisteminin komponenti olan mononükleer fagositleri ve endotel hücreleri gibi güçlü mediatörlerin salınımını gerçekleştirebilecek hücreleri uyarır. Monositlerden TNF- α , interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) salınır. IL-1 ve IL-6 T hücrelerini aktive ederek interferon gama (IFN- γ), interlökin-2 (IL-2), interlökin-4 (IL-4), Granülosit Monosit Koloni Stimülan

Faktörlerin (GM-CSF) salgılanmasını sağlarlar. Mediyatörlerin salınmasıyla koagülasyon sistemi, kompleman sistemi, fibrinolizis ve kinin sistemi aktive olur (25, 30).

TNF- α ve IL-1 gibi mediatörler 1 LPS ortaya çıkmasından sonraki 30 ila 90 dk içinde salınır ve ikincil sitokinlerin, lipid mediyatörlerinin ve reaktif oksijen metabolitlerinin salınımına neden oldukları gibi sepsiste son derece önemli olan araşidonik asit metabolitlerinin açığa çıkmasını ve sentezini de başlatırlar. Siklooksijenaz yolla vazodilatör olan prostoglandinler ve kuvvetli vazokonstrüktör olan tromboksan A2, lipooksijenaz yolla ise lökotrienler açığa çıkar. Araşidonik asit metabolitleri ateş, taşikardi, takipne, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu ve laktik asidoz oluşumunda rol alırlar (31, 32).

Birçok biyolojik etkisi ortak olan TNF- α ve IL-1 sepsiste ateş, hipotansiyon ve şok patogeneğinde sinerjistik etki gösterirler. IL-10, TNF- α sentezini önlerken akut faz reaktanları ve immünglobülinlerin etkisini artırır aynı zamanda T lenfositlerin ve makrofajların fonksiyonlarını inhibe ederek sepsiste inflamasyonu düzenleyici ve antiinflamatuvar rol oynar (31).

Endotoksinler, koagülasyon kaskadının ve kompleman sisteminin tetiklenmesini mononükleer fagositler, endotel hücreleri ve diğer hücrelerin aktivasyonları üzerinden gerçekleştirir. Kompleman aktivasyonu damar permeabilitesini doğrudan ya da nötrofilleri aktive etmek suretiyle bozarak endotel hasarı yapar. Aktive olan nötrofiller degranüle olarak toksik oksijen radikalleri ve lizozomal enzimleri açığa çıkararak endotel permeabilitesini artırır. Damar endotelinde meydana gelen bu değişiklikler ekstravazyon ve

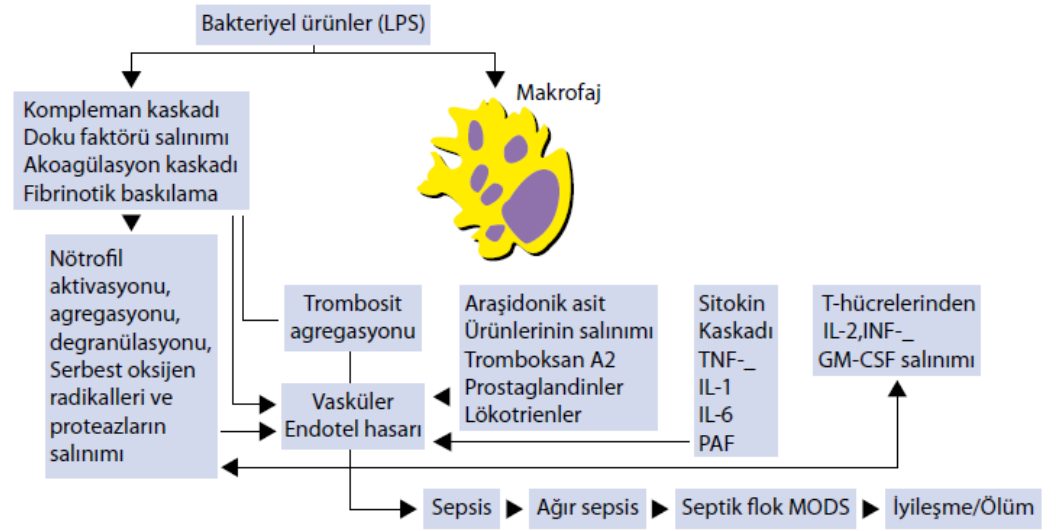
mikrotrombüs oluşumunu kolalaştırıp organ perfüzyon bozukluklarına sebep olur ve sonuçta organ yetmezliği tablosunun gelişmesine zemin hazırlar. Sepsiste gerçekleşen olaylar organizmanın tamamını etkileyebildiği için bu tablo multipl organ yetmezliğine kadar uzanabilir. Sepsiste en sık karşılaşılan organ yetmezlikleri akciğer, böbrek, karaciğer ve kalp yetmezliğidir (31, 33).

Sepsiste meydana gelen mikrosirkülatuvar perfüzyon bozukluğu, oksijen sunumu yetersizliği ve mitokondriyal disfonksiyon gelişimine zemin hazırlar. Mitokondriyal disfonksiyon gelişmesi sonucu aşırı artmış oksijen ve nitrojen radikalleri ile birlikte azalmış glutatyon seviyeleri oksidatif fosforilasyon ve ATP üretiminde azalmayla birlikte sepsiste mortalitenin artışına sebep olur (34, 35).

TNF- α ve diğer endojen mediyatörler, kontakt sistem ve doku faktörünü aktive eder. Hegeman faktörünün aktivasyonu (Faktör XII) plazminojeni plazmine çevirir ve intrinsek koagülasyonu başlatır. Fibrinojen fibrine dönüşerek pıhtılaşma başlar ve aynı zamanda fibrinolitik aktivite de artar. Septik şok ile beraber gerçekleşen ve SHAM edilemeyen koagülasyon aktivasyonu, tromboz, trombosit ve pıhtılaşma faktörlerinin (Faktör II, V ve VII) tüketimi ile gerçekleşen ve deri ve mukoza kanamaları ile kendini gösteren bu tabloya Dissemine İntravasküler Koagülasyon (DIC) adı verilmektedir (36).

Septik şok, sepsiste gelişen en önemli olaylardan birisidir ve eğer tedavi edilmezse sepsisin ölümden önceki son basamağıdır. En sık gram negatif bakteriler tarafından meydana getirilmekle birlikte gram pozitif bakteri, mantar, mikobakteri, riketsiya ve protozoa enfeksiyonlarında da görülebilir. Sepsiste prostaglandin I₂ (PGI₂), tromboksan A₂ (TxA₂), histamin, serotonin ve Nitrik

Oksit (NO) gibi birçok vazoregülatör mediatörler açığa çıkar. Bu mediatörler sistemik damar direncinin azalmasına sebep olarak jeneralize ödemle birlikte dokulara giden kan akımının azalmasına neden olurlar. Sepsiste salgılanan “myokardial depressant substance” ventriküler dilatasyona, miyokardda depresyona ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda azalmaya sebep olarak kardiyak performansı baskılar. Ayrıca TNF- α miyokardı deprese ederken, PAF kalp üzerinde negatif inotropi gösterip arteriyel kan basıncını düşürür. Lökotrienler C4, D4, E4, koroner ve miyokard kan akımını azaltır. IL-2 de kardiyovasküler fonksiyon bozukluğuna yol açar. Tüm bu mediyatörler sepsiste gerçekleşen hipotansiyon ve şok tablosunun oluşumunda önemli role sahiptirler (37, 38).



Şekil 2. Sepsis fizyopatolojisi (39).

Sepsiste parankimal doku düzeyinde apoptozis önemli rol oynamaktadır. Sepsisli hastalarda akciğer, karaciğer, böbrek ve intestinal yapılarda apoptoz artışı

hızlanmıştır (40). Apoptozis antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Bakteri ve mantarların nötrofillerce fagositozu apoptozu hızlandırır (41).

2.1.4. Sepsisin Organ ve Sistemler Üzerine Etkileri

Sepsiste organizmanın aşırı yanıtı yaygın inflamasyon, organ disfonksiyonları ve organ yetersizlikleri ile sonuçlanır. Sepsiste organ disfonksiyonları ve ölümden hücre hipoksisi ve apoptoz sorumludur (42). En fazla organ hasarı akciğerler, karaciğer, böbrekler, kalp ve gastrointestinal sistemde görülür (31).

2.1.4.1. Dolaşım Sistemi

Sepsiste, dolaşım sisteminin bozulmasına paralel doku oksijen gereksiniminin sağlanmasında bozulma başlar. İnflamasyonun başlamasıyla salınan PGI₂ ve NO gibi vazodilatör mediyatörler infeksiyon bölgesinde vazodilatasyon ve mikrovasküler permeabilitede artışa neden olur (43). Bu durum santral, bölgesel ve mikrosirkülasyonda gereksinim duyulan oksijenin iletimini baskılar. Sepsiste Antidiüretik Hormon (ADH=Vazopressin)'un sekresyonu azalmıştır. Septik şoklu hastalardaki plazma ADH düzeylerinin, benzer sistemik kan basınçlarına sahip kardiyojenik şoklu hastalara göre çok daha düşük düzeylerde (1/7'si kadar) olduğu saptanmıştır (44).

2.1.4.1.1. Santral Dolaşım

Sepsisin ilk döneminde sistolik ve diyastolik ventriküler performans bozulmaya başlar. Sepsisin komplikasyonu olan sistemik vazodilatasyona bağlı hipotansiyonu kompanze etmek için ventriküler fonksiyonda artış görülür ve kardiyak debinin artışı sağlanır (45).

2.1.4.1.2. Bölgesel Dolaşım

Sağlıklı organizmanın ani şokla karşılaşması durumunda gastrointestinal sistem gibi splanknik organlardaki kan akımı azalırken, organizmanın yaşaması için hayati öneme sahip beyin gibi yaşamsal organlardaki kan akımı artar. Ancak bu durum sepsiste baskılanmaktadır (45).

2.1.4.1.3. Mikrosirkülasyon

Doku ödeminin dışarıdan kapillerlere bası yapması, endotelyal şişme ve kapiller lümeninin eritrosit ve lökositler tarafından tıkanması bazı kapillerlerde kan akımının yok olmasına ya da intermittan kan akımına sebep olur. Sepsisin vazodilatasyona bağlı hipotansiyon ile komplike olması durumunda bölgesel dolaşım ve mikrosirkülasyonda anomaliler görülür ve bu da doku zedelenmesinin ilerlemesini hızlandırır (45).

2.1.4.2. Akciğerler

Koagülasyon ve kompleman sistemlerinin aktivasyonu sonucunda gelişen yaygın endotel zedelenmesi sonucu; akciğerlerde de gaz değişiminin gerçekleştirildiği alveolokapiller membranda hasar meydana gelir ve “Akut Respiratuar Distres Sendromu” (ARDS) diye adlandırılan tabloyla karşı karşıya kalınır (46, 47).

2.1.4.3. Gastrointestinal Sistem

Sepsisteki tipik sirkülatuvar bozukluklar, bağırsakların normal bariyer fonksiyonunu baskırlar. Bu durum bakteri ve endotoksinin lenfatikler ve portal ven yoluyla sistemik dolaşıma geçmesine ve septik yanıt daha da artmasına sebep olur (46, 47).

2.1.4.4. Karaciğer

Karaciğerin retiküloendotelyal sistemi, sağlıklı organizmada bağırsaklardan portal sisteme giren bakteri ve bakteri kaynaklı ürünlere karşı ilk savunma mekanizmasıdır. Sepsiste karaciğer disfonksiyonu, enterik kaynaklı endotoksin ve bakteri kaynaklı ürünlerin eliminasyonunu önler, uygun lokal sitokin yanıtını engelleyerek bu potansiyel zedeleyici ürünlerin sistemik dolaşıma direkt yayılımına izin verip sepsisin ilerlemesine sebep olur (46, 47).

2.1.4.5. Böbrekler

Sepsis, sistemik hipotansiyon, direkt renal vazokonstrüksiyon, TNF- α gibi sitokinlerin salımı ve nötrofillerin endotoksin ve FMLP (bakteri hücre duvarında bulunan ve fMet-Leu-Phe aminoasitlerinden oluşan kemotaktik bir peptid) tarafından aktivasyonu sonucunda sıklıkla oluşan akut tübüler nekroza bağlı akut böbrek yetmezliği (ABY) ile birlikte seyreder (46, 47).

2.1.5. Sepsis ve Kalp

Sepsiste hemodinamik değişiklikler ardışık fazlardan oluşur. Birincisi erken faz olarak adlandırılır ve hipovolemiye bağlı düşük akım hızının olduğu dönemdir. Bu evrede volüm genişlemesi kardiyak outputu ve perfüzyonu artırır. Bu ilk kurtarma fazından sonra hemodinamik profil, yüksek kardiyak output ve düşük sistemik vasküler direnç ile ikinci faz olarak adlandırılan hiperdinamik duruma döner. Üçüncü fazda ise azalmış kardiyak output ve artmış sistemik vasküler dirençle birlikte kardiyak yetmezliğe gider. Bu faz organizma tarafından düzeltilmesi zor bir tablodur ve yetersiz kardiyak outputa bağlı artan metabolik asidoz ve sonucunda multiorgan yetmezliği gelişerek sıklıkla ölümle sonuçlanır (48).

Apoptoz immün hücrelerin fizyolojik regülasyon ve maturasyonlarında önemli rol oynadığı gibi organ disfonksiyonunun oluşumuna da katkıda bulunur. TNF- α ve endotoksinler kardiyomiyositlerde apoptozu indükleyerek sepsisteki

kardiyak disfonksiyona katkıda bulunur. Sepsiste kaspazların farmakolojik inhibisyonları kalpteki apoptozu önler (49).

Septik şokta üretilen NO periferel vazodilatasyon ve hipotansiyondan sorumludur. Miyokardda da üretilen NO etkisini siklik GMP (cGMP) üzerinden göstererek filament kontraksiyonunda görev alan sitozolik kalsiyumu azaltıp miyokard kontraktilitesinin azalmasına sebep olur (49, 50). cGMP'nin artması cAMP'nin bozunmasını sağlayan bazı fosfodiesterazları aktive ederek cAMP'nin miyokarddaki miktarını azaltır. Bu durum da sepsiste β -adrenerjik stimülasyonun azalmasıyla sonuçlanır (49).

Sepsiste TNF- α ve IL-1 dokulara nötrofil göçünü artırır, ICAM-1 ve VCAM-1 adlı adhezyon molekülleri de nötrofillerin infiltrasyonlarına aracılık ederler (51-53). Lipopolisakkaritler ICAM-1 ve VCAM-1'in ekspresyonunu artırarak nötrofil infiltrasyonuna sebep olurlar ve miyokarddaki hasarın artmasına katkıda bulunurlar (53).

2.1.6. Sepsiste Tedavi

Sepsiste mortalitenin çok yüksek olması dolayısıyla sepsisin tanı ve tedavisi vakit kaybetmeden gerçekleştirilmelidir.

Sepsiste hastanın hayati fonksiyonlarının düzeltilmesi ilk hedeftir. Bu nedenle oksijenasyon ve ventilasyonunun sağlanması ve kan basıncının düzenlenmesi ilk resüsitasyon açısından son derece önemlidir (54).

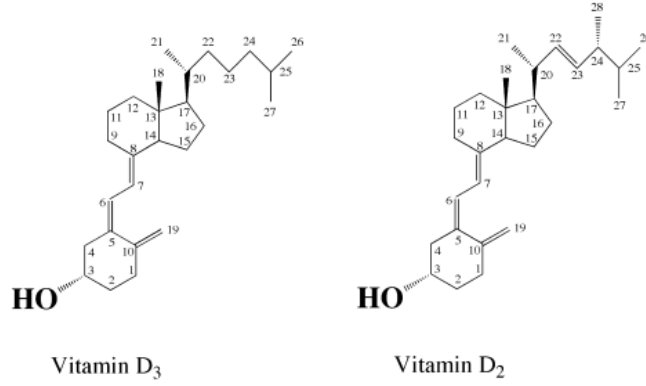
Enfeksiyon ajanının tespiti ve uygun antimikrobiyal tedavi vakit kaybetmeden uygulanmalı, vücudun metabolik ve homeostatik dengesi için gerekli destek tedavisi (sıvı tedavisi, vazopressörler, inotrop ajanlar, kan ürünleri, bikarbonat tedavisi) başlanmalıdır (54).

2.2. D Vitamini

Organizmalar vitaminlerin çoğunu sentezleyemeyip dışarıdan almalarına rağmen D Vitamini dışarıdan alınmayıp güneşe maruziyet sonucu deride sentezlenir (55). Yapısı steroide benzeyen D Vitamininin bilinen temel görevi barsaklardan kalsiyum ve fosfor emiliminin sağlanmasıdır.

2.2.1. D Vitamininin Formları

D Vitamininin Vitamin D1 (lumisterol bağlı ergokalsiferol), Vitamin D2 (ergokalsiferol), Vitamini D3 (kolekalsiferol), Vitamini D4 (22-dihidroergokalsiferol), Vitamini D5 (sitokalsiferol) olmak üzere 5 farklı formu vardır. İnsan vücudunda bu formlardan kolekalsiferol ve ergokalsiferol bulunmaktadır (56).

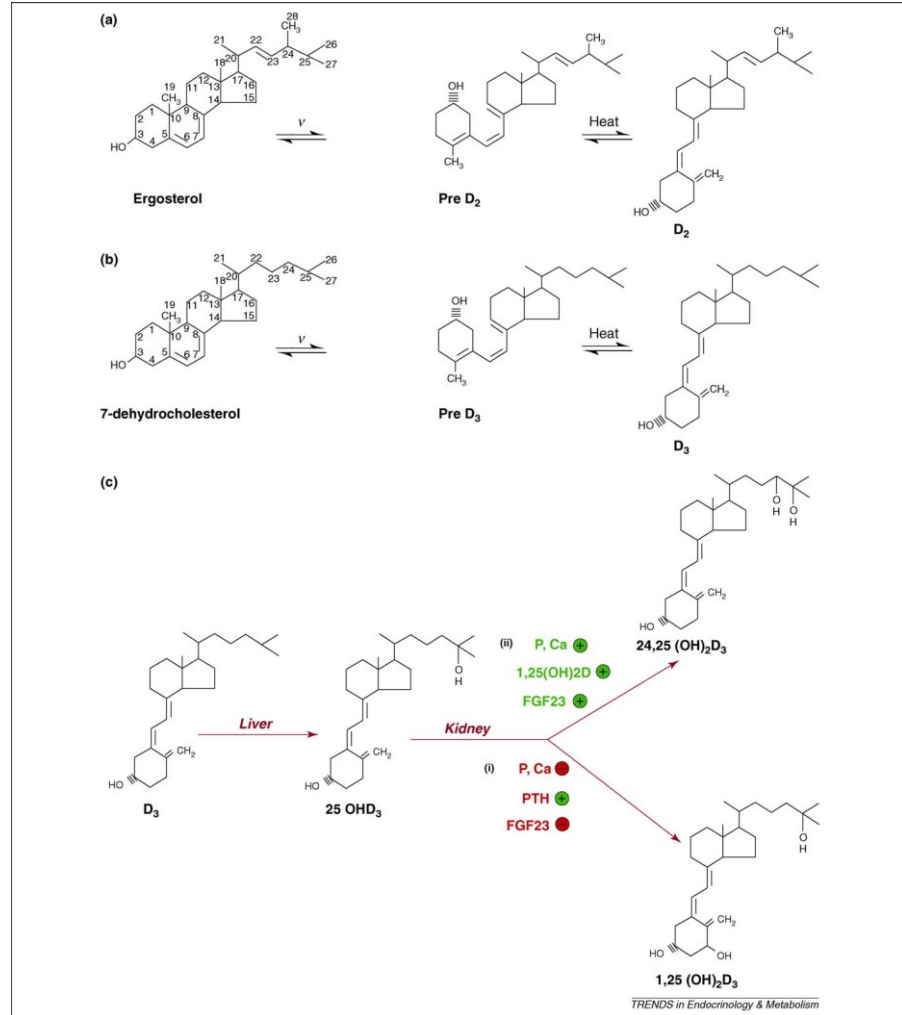


Şekil 3. Vitamin D'nin iki temel formu (57).

2.2.2. D Vitamininin Sentez ve Metabolizması

Kolekalsiferol, ultraviyole B ışınlarının etkisiyle epidermiste hayvansal kaynaklı olan 7-dehidrokolesterolden yapılırken Ergokalsiferol ise bitkisel sterol olan ergosterolden sentezlenir (56). UV dalgaları epidermiste bulunan 7-dehidrokolesterolün Vitamin D₃ (kolekalsiferol)'e dönüşümünü gerçekleştirir. Gıdalar ile Vitamin D₂ (ergokalsiferol) veya Vitamin D₃ formlarında alınır. D Vitamini endojen olarak üretildikten ya da besinler yolu ile alındıktan sonra dolaşım sistemine geçer (56). D Vitamininin her iki formu dolaşımda bulunan D vitamini bağlayan protein (DBP) yardımı ile karaciğere gider. D Vitamini karaciğerde bulunan 25-hidroksilaz enzimi ile 25-hidroksi D Vitamini (kalsidiol = 25(OH)D) formuna çevrilir. 25(OH)D DBP aracılığı ile böbreklere taşınır ve böbreğin proksimal tübülüs hücresinin mitokondrisinde bulunan 1- α -hidroksilaz enzimi ile aktif formu olan 1,25-dihidroksi D Vitamini (kalsitriol = 1,25(OH)₂D) formuna dönüştürülür. 1- α -hidroksilaz aktivitesi böbrekten başka deri, kemik,

makrofaj, kolon, plasenta ve prostat dokularında da mevcuttur. D Vitamininin temel görevi kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi olduğu için bu metabolizmayı düzenleyen organ olan böbrekler D Vitamini için hedef organdır. Eğer $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ yeterli ise $25(\text{OH})\text{D}$ 'nin bir kısmı 24 alfa hidroksilaz enzimi ile böbreklerde daha az aktif bir molekül olan $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ (kalsitroik asit)'e dönüştürülür (58, 59).

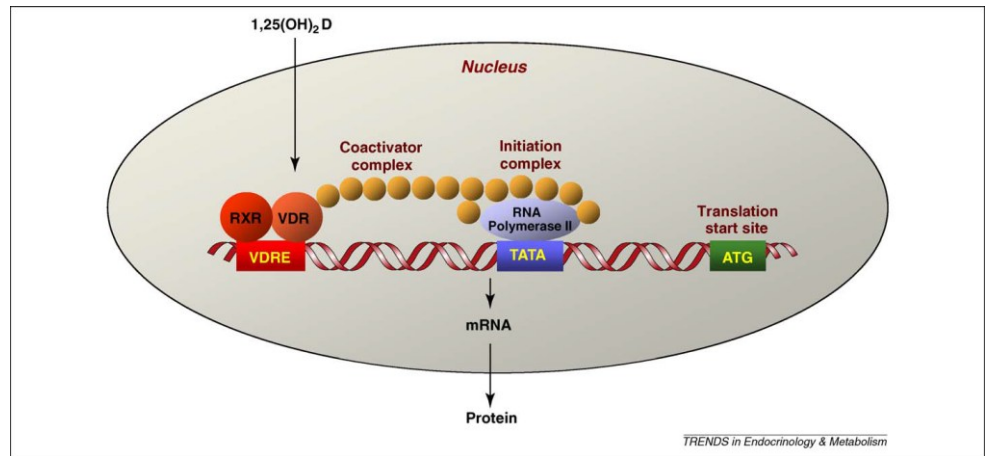


Şekil 4. D Vitamini Sentezi (60)

2.2.3. D Vitamininin Etki Mekanizması

D vitamininin reseptör düzeyindeki etkisi D vitamininin aktif formu olan (kalsitriol =1,25(OH)₂D) sayesinde gerçekleşir. D Vitamini etkisini doğrudan nükleer d vitamini reseptörü (DVR) üzerinden gen transkripsiyonunu regüle ederek gösterebileceği gibi hücre membranı üzerindeki DVR üzerinden genellikle geçici olan iyonlardan kalsiyum (Ca) ve klorür (Cl)'ün trans-membran geçişini değiştirerek veya hücre içi sinyal yolak aktivitelerini (cAMP, PKA, PLC, PI-3 kinaz ve MAP kinaz), aktive ederek gerçekleştirebilmektedir (61).

Retinoik asit reseptörlerini içeren bir nükleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesi olan DVR'nin hedef gende eksprese olabilmesi için retinoik asit X reseptörü (RXR) ile bir heterodimer oluşturması gerekir ve oluşan bu kompleks DNA üzerinde bulunan D vitamini cevap elemanı (D Vitamini responsive element, VDRE), olarak bilinen bölgeye bağlanarak transkripsiyonu gerçekleştirmiş olur (61, 62)



Şekil 5. D Vitamini etki mekanizması (60).

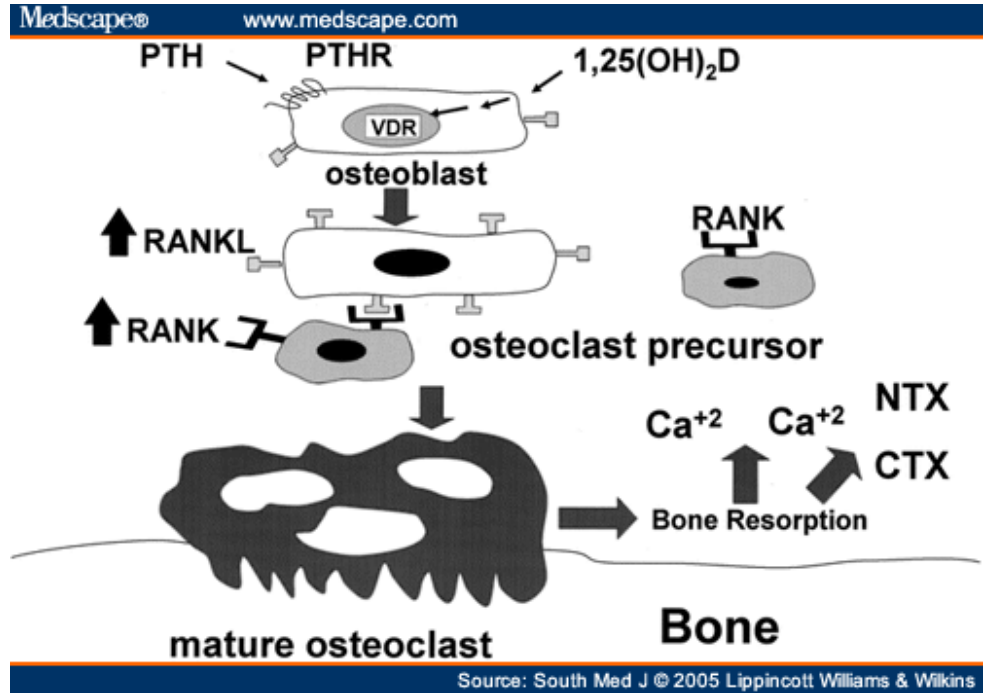
Böylece, genomik etki ile kalsiyum bağlayıcı protein veya osteokalsin gibi gen ürünleri üretilerek ya da inhibe D Vitamininin etkisi gerçekleştirilirken diğer yandan non-genomik etki ile plazma membran reseptörüne bağlanıp cAMP gibi ikinci habercileri aktive ederek Ca kanalları, vasküler düz kaslar, bağırsaklar, pankreasın beta hücreleri ve monositler üzerinde de etkili olabilmektedir.

2.2.3.1. D Vitamininin Kalsiyum Metabolizması Üzerine Etkisi

D vitamini kalsiyum değerini normal sınırlarda tutmak için temelde barsak, kemik ve böbrek dokularını hedef alır.

D Vitamini barsaklarda etkisini ince barsak lümeninden dolaşıma kalsiyum ve fosfor geçişini artırarak gösterir.

Kemikler üzerine etkisine bakılacak olursa net etkisi kemik rezorpsiyonunun artırılmasıdır. Kemik dokusunda Parathormon ile sinerjistik etki gösteren D Vitamini osteoblast ve stromal fibroblastlar üzerindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak osteoblast yüzeyindeki Reseptör Aktivatör Nucleus Factor-K β (RANKL) ligandının üretimini uyarıp bu ligandın immatür osteoklastlara bağlanmasını sağlar. Bu bağlanma sonucunda matür osteoklast oluşumu sağlanarak kemik rezorpsiyonu artırılmış olur.



Şekil 6. D vitamininin kemikler üzerindeki etkisi (63).

Distal renal tübülde kalsiyumun reabsorbsiyonunu PTH ile sinerjistik etki göstererek stimüle eder (64).

2.2.3.2. D Vitamininin İmmünolojik Etkileri

D Vitamininin immün sistem üzerinde değişik etkileri bulunmaktadır. Bir taraftan antimikrobiyal aktiviteyi artırırken diğer taraftan inflamatuvar aktiviteyi baskılayan 25(OH)D vitamini monosit, makrofaj, T ve B hücreleri gibi immün hücreler dahil birçok hücre tipinde yer alan VDR'lere bağlanarak etki gösterirler (65).

Kathelisidinler adı verilen Antimikrobiyal Paptidler (AMP) doğal immün sistemin parçalarıdır ve bakteri hücre membranında bulunan porların yapısını etkileyerek bakterisidal etki gösterirler. Solunum yolu epitel hücreleri tarafından kathelisidin üretilmesi için D vitamininin yeterli konsantrasyonda olması gereklidir (66).

D Vitamini, doğal immün yanıtta görevli hücrelerden olan Natural Killer hücrelerinin sentezinin artırılması da sağlar.

D vitamini makrofaj ve monositlerde bulunan CD80, CD83, CD86 ve MHC class-II antijenlerinin ekspresyonunu azaltarak bu hücrelerin antijen sunma özelliklerini azaltır. Anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 yapımını artırırken proinflamatuvar sitokin olan IL-12 üretimini azaltır. Böylece Th1 hücre cevabında azalma görülürken immün cevabın baskılanmasından sorumlu olan Treg hücreleri üzerinde uyarıcı rol oynar. IL-2 üretimini baskılar ve T hücre proliferasyonu inhibisyonunu sağlar. IL-4, IL-5 ve IL-10 üretimini artırarak Th2 hücreleri üzerinden proinflamatuvar etki göstermektedir (67).

Monositlerde bulunan TLR2 ve TL'ün ekspresyonunu inhibe edip proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α 'nın üretimini azaltır (68).

2.2.3.3. D Vitamini ve Sepsis

Sepsisli hastalarda D Vitamini eksikliği prevalansının yüksek olması, D Vitamini eksikliğinin sepsis için risk faktörü olduğunu düşündürmüştür (69). SIRS gelişiminde anahtar rol oynayan inflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve

benzeri sitokinlerin salınımını inhibe eden D vitamininin sepsis gelişimini inhibe edebileceği düşünülmektedir (70).

Sepsis oluşturulan ratlara verilen D vitamininin sepsise bağlı oluşan DIC tablosunda trombosit, fibrinojen ve antitrombin-3 düzeylerini artırdığı, monositlerde trombomodülini upregüle, doku faktörünü(TF) ise downregüle ederek DIC gelişimini engellediği tespit edilmiştir (71).

Sepsiste hiperinflamatuvar sürecin uzaması, beraberinde hücre ve organ hasarını getirdiği göz önünde bulundurulduğunda, D Vitamininin immün düzenleyici kapasitesinin, sepsisin tedavisinde olumlu etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (67).

D Vitamini, IFN- γ ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltıp IL-10'un salınımını artırarak sepsisin hiper inflamatuvar fazında tedaviye katkı sağlar (67).

Vasküler endotel hücrelerde yapılan bir çalışmada sepsis durumunda NF-kB ve immün aşırı aktivasyonunu sağlayan proinflamatuvar sitokinlerin D vitamini tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (72).

Sepsisli hastalarda D vitamini ve D vitamini Bağlayan Protein düşük miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Düşük D vitaminine sahip olan sepsisli hastaların prognozlarının daha mortal seyrettiği görülmüştür (66).

2.2.3.4. D Vitamini ve Kanser

Ekvatorдан uzaklaşıldıkça kolon, prostat ve meme kanseri insidansının artması ve kanser mortalitelerinin kuzeyde yaşayanlarda ekvatora yakın olanlardan daha yüksek olması, güneşe maruziyetin azalmasıyla gelişen D Vitamini eksikliğine bağlı olduğu düşünölmektedir (73-76).

D Vitamini hücre siklusunu G1 fazında durdurarak hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunu inhibe eder (77). 2011 yılında yapılan bir çalışmada D vitamininin tümör anjiogenezini, metastazı ve invazyonunu baskıladığı gösterilmiştir (78). Tüm bu sebepler D vitamininin kansere karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

2.2.3.5. D Vitamini ve Kardiyovasküler sistem

D Vitamininin Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi üzerinde negatif düzenleyici bir etkisi bulunmaktadır (79). Yapılan çalışmalar D Vitamininin plazma renin aktivitesini, anjiotensin II düzeylerini, kan basıncı değerlerini ve sol ventriköl hipertrofisini azalttığını göstermiştir (80, 81). Hipertansiyonun RAAS'in uygunsuz uyarılması ile ilişkili olduğu düşünöldüğünde D Vitamini düzeylerinin düşük seyretmesi hipertansiyon gelişimi adına risk taşımaktadır.

D Vitamini düzeyleri ve total koroner arter kalsifikasyonu (intimal ve medial) yaygınlığı arasında ters bir ilişki vardır (82). Medial kalsifikasyonlar kardiyovasküler mortalite için prediktördür (83). Bu durum göz önünde

bulundurulduğunda düşük D Vitamini düzeyleri, kardiyovasküler mortaliteyi olumsuz yönde etkiler.

Böbrek yetmezliğinde azalmış D Vitamini sentezine bağlı Parathormon artışı görülür. Artmış PTH seviyeleri, kan basıncı ve miyokard kontraktilitesini artırarak miyokard hipertrofisine neden olur ve kalpte interstisyel fibrozisi artırıp kardiyovasküler hastalıkların prognozlarının kötüleşmesine katkıda bulunur (84).

2.2.3.6. D Vitamini ve Diabetes Mellitus

D vitamini reseptörleri (VDR) immun sistem hücrelerinin yanı sıra pankreatik beta hücrelerinde de tanımlanmıştır (85, 86). Pankreatik beta hücrelerinde aynı zamanda D vitaminine bağlı kalsiyum bağlayıcı protein olan kalbindin de bulunur. Kalbindin, D Vitamini varlığında eksprese olarak beta hücrelerini sitokine bağlı hücre ölümünden korur (87).

Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında yaşamın ilk evrelerinde ve yıllarında alınan D Vitamini desteğinin Tip 1 DM gelişim riskini azalttığı tespit edilmiştir (88-90).

VDR Tag1 polimorfizmi insülin salınımı ile ilişkiliyken, VDR Apa1 polimorfizmi ise insülin direnci ve glukoz intoleransı ile alakalıdır. Bu bilgiler ışığında Tip 2 diyabet gelişiminde VDR polimorfizminin rol oynayabileceği düşünülmüştür (91, 92).

D Vitamini insülin salgısını nükleer D Vitamini reseptörleri aracılığı ile stimüle eder (93). D Vitamini eksikliği insülin direnci, pankreatik β hücre

disfonksiyonu ve metabolik sendrom riskini artırır (94). D Vitamini tedavisi Tip 2 diabetli hastalarda insülin sekresyon ve sensitivitesini artırır (95).

2.2.4. D Vitamini Eksikliği

1,25 (OH) D Vitamininin yarı ömrü çok kısa olması ve 25(OH) D Vitamini'ye göre serumda 1000 kat daha az bulunması sebebiyle hastaların genellikle 25(OH) D Vitamini düzeyleri ölçülmektedir. 1,25(OH) D Vitamini radioimmünassay yöntemle ölçülebilirken, 25(OH)D Vitamini ölçümünde ise immünassay yöntemlerin yanısıra HPLC (High performance liquid chromatography) ve HPLC-tandem kütle spektrometri de kullanılmaktadır.

25(OH) D Vitamini düzeyleri için <20 ng/mL eksiklik, 20-30 ng/mL arası yetmezlik olarak tanımlanırken >150 ng/mL ise toksik doz olarak kabul edilmektedir (96).

D Vitamini eksikliğin en sık sebebi güneş maruziyetinin az olmasıdır. Güneş maruziyetinin yanısıra deri pigmentasyonu ve yaşlanma gibi deriyi etkileyen diğer durumlar, azalmış biyoyararlanım (malabsorbsiyon, obezite), artmış katabolizma (antikonvulzan, kortikosteroid), laktasyon ve azalmış sentez (karaciğer hastalıkları) D Vitamini eksikliğin diğer sebepleridir (97).

Amerika'da yapılan bir çalışmada genç sağlıklı erişkinlerin %36'sında, hastaneye giden erişkinlerin ise %57'sinde D Vitamini eksikliği tespit edilmiştir (98). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise hastaneye başvuranların %52'sinde D

Vitamini eksikliği bulunurken %21'inde D Vitamini yetmezliği tespit edilmiştir (99).

2.3. Serbest Radikaller

Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijenin çeşitli mekanizmalar sonucunda oluşan radikalleri, sayısız enzimatik tepkime ve biyolojik fonksiyon için gereklidir. Dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron bulunduran moleküller olarak tanımlanan serbest radikaller, genellikle kararsız ve çok reaktiftirler. Bu yüzden çevrelerindeki atom ve moleküllere saldırırlar (100).

Serbest radikaller, organizmada 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 kalma, yaşlanma ve stres gibi değişik birçok nedenle de meydana gelebilmektedirler (101).

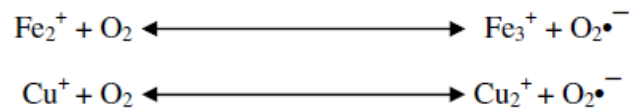
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Dış yörüngesinde iki adet eşleşmemiş elektron bulunan oksijen, 'biradikal' olarak da nitelendirilmektedir ve organizmada gerçekleşen kimyasal reaksiyonlarda rol alan elementlerin başında gelmesi nedeniyle bir serbest radikale dönüşmeye her zaman aday görünmektedir. Moleküler oksijenin çeşitli reaksiyonları sonucunda meydana gelen 'serbest oksijen radikalleri' veya diğer adıyla 'reaktif oksijen türevleri' (ROT) serbest radikaller içerisinde karşımıza

oldukça sık çıkan bir sınıfı oluşturmaktadır. Bu şekilde meydana gelen başlıca ROT'lar, süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojenperoksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalidir ($\bullet OH$) (102).

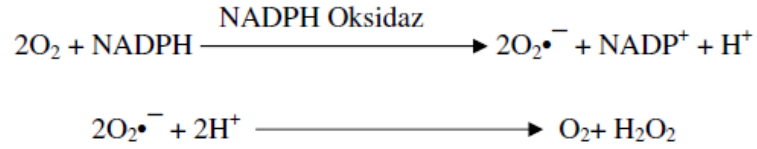
2.3.1. Reaktif oksijen Türleri

2.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Oksijen kararlı duruma geçerek suya dönüşmek amacıyla bir elektron alarak indirgenir ve Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) meydana gelir. Süperoksit radikalinden, nitrik oksitle reaksiyona girerek azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali ($\bullet OH$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilen peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşur. Süperoksit, indirgenmiş geçiş metallerinin reversibl otooksidasyonu olan Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile de meydana gelebilmektedir (101).

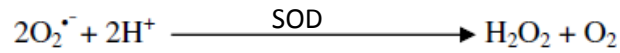


Nötrofillerde süperoksit radikali NADPH oksidaz enzimi aracılığı ile oluşturulur. Önce fagosit uyarılır ve sonra NADPH oksidaz enzimi aktive olarak redükte piridin nükleotidlerinden (NADPH) iki elektron iki molekül oksijene transfer edilip iki molekül $O_2^{\bullet-}$ oluşur (101).



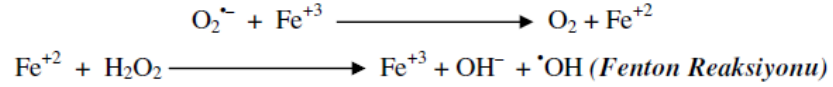
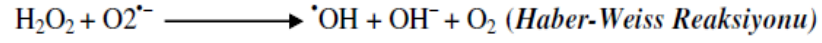
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Kendisi bir serbest radikal olmayan fakat kararsız yapısı nedeniyle süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali türevi olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilen H₂O₂'in üretimi, Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi katalizörlüğünde olmaktadır (103). Hidrojen peroksit hücre membranlarını kolaylıkla geçebilir (104).



2.3.1.3. Hidroksil Radikali (•OH)

Hidroksil radikali, Haber–Weiss reaksiyonu, Fenton reaksiyonu ya da suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda olur. Yarılanma ömrü çok kısa olan son derece reaktif bir oksidandır. Oluştığı yerde büyük hasara sebep olan Hidroksil radikali tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına sebep olur (101).



2.3.1.4. Hipokloröz Asit (HOCl)

Enzimatik olarak nötrofiller tarafından üretilen güçlü bir oksidandır. Aktive olan nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller önce süperoksit, sonrasında da süperoksitten dismutasyon yoluyla hidrojen peroksit oluşur. Oluşan bu hidrojen peroksit, miyeloperoksidaz enziminin katalizörlüğünde klorür iyonu ile birleşerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'ye dönüşür (105).

2.3.1.5. Nitrik Oksit (NO)

Azot monoksit veya nitrojen monoksit olarak da bilinen Nitrik oksit, L-argininden nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla üretilir. NO eşlenmemiş bir elektron içerdiği için oksijen, süperoksit radikalleri ve geçiş metalleriyle hızla reaksiyona giren, yarı ömrü çok kısa olan bir moleküldür. Nitrik oksit radikali süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyona girerek onlardan daha oksidan bir ajan olan peroksinitriti (ONOOH-) meydana getirir. Peroksinitrit bir radikal olmamasına rağmen ileri derecede reaktif olan •OH radikali oluşumuna yol açmaktadır(106).

2.3.2. Serbest Radikallerin Hücresel Komponentler Üzerine Etkisi

2.3.2.1. Lipidlere Olan Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitelerini aştıkları zaman membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar (104). Reaktif oksijen türleri çoklu doymamış yağ asidi molekülünden bir hidrojen atomu çıkardığı zaman bir lipid radikali meydana gelir. Bu lipid radikaline oksijenin katılmasıyla lipid peroksil radikali oluşur. Birçok yıkım sonrası son ürün olan malondialdehid (MDA) meydana gelir. Kan ve dokudaki MDA, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak en sık başvuru parametreler arasında gösterilmektedir. MDA mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olduğu için hücre için çok toksik bir bileşiktir (107).

2.3.2.2. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden ne kadar etkileneceği amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, methionin, sistein gibi doymamış ve sülfür içeren amino asitler serbest radikallerden daha fazla etkilenecek dimerler ve büyük agregatlar oluştururlar. Protein harabiyetinin boyutları, proteinin hücresel lokalizasyonuna göre değişebileceği gibi, radikalın toksisite gücüne göre de artabilir (104).

2.3.2.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

İyonize radyasyonla serbest radikaller oluşur. Oluşan bu radikaller DNA'yı etkileyerek tek ya da çift dal kırıklarına neden olup hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar (104).

Aktive olmuş nötrofillerden hidrojen peroksit salınır. Dolaşıma geçen bu hidrojen peroksit de membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (108).

2.3.2.4. Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaridler otookside olarak H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehidleri oluşturur. Okzoaldehidlerin DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özellikleri sayesinde antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (109).

2.3.2.5. Ekstrasellüler Etkileri

Serbest radikaller, inflamatuvar cevap ve ardından gelen doku harabiyetinin oluşumunda önemli rol oynarlar (104). İnflamatuvar hücre kaynaklı serbest radikallerin oluşturduğu harabiyetten en çok etkilenen ekstrasellüler doku komponentleri hyaluronik asit ve kollajendir (104). Süperoksit radikali kollajenin jelasyonu engelleyerek yapı ve fonksiyonunu bozar. Hyaluronik asit ise superoksit

radikali tarafından depolimerize edilerek eklemde sinoviyal sıvının viskozitesinin değişmesini ve fonksiyonunun bozulmasını sağlar (104).

2.3.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller, hücrelerin normal metabolizması içinde oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluşabildiği gibi çeşitli dış kaynaklı nedenlerle de meydana gelebilir. Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir (110).

Tablo 1. Hücrelerde serbest radikal kaynakları (110)

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 ✓ Endotelial hücreler ✓ Otoksidasyon reaksiyonları (ör, Fe²⁺)	✓ Redoks siklus bileşikleri (ör, paraquat, doksorubisin) ✓ İlaç oksidasyonları (ör, parasetamol) ✓ Sigara ✓ Güneş ışığı ✓ Isı şoku

2.4. Antioksidan Sistem

Ortamda düşük konsantrasyonda bulunsa bile, yükseltgenebilir bir substratın (protein, lipid, karbonhidrat...) oksidasyonunu belirgin biçimde geciktiren yada önleyen maddeye antioksidan denir (111). Antioksidanlar, biyomoleküllerde bozulmaya neden olan ROT'ları ortadan kaldırırken, oksidatif hasarın yayılmasını da engellerler. Organizmanın farklı organ, hücre ve hücre organellerinde bulunan çeşitli ROT'lara karşı, farklı antioksidanlar bulunmaktadır (112).

Antioksidan savunma mekanizmaları etkilerini çeşitli şekillerde gösterebilirler. Bu mekanizmalardan bazıları hasarlı hedef moleküllerin yerini alıp ROT oluşumunu minimumda tutmak olduğu gibi , hasarlı hedef molekülleri onarıp metal iyonlarını bağlamak şeklinde de olabilir (113).

Antioksidanlar yerleşimlerine göre (intraseküller, ekstraseküller), yapılarına göre (enzim olanlar, olmayanlar), kaynaklarına göre (endojen, ekzojen), çözünürlüklerine göre (suda çözünen, yağda çözünen) gruplandırılabilirler.

2.4.1. Enzim olan Antioksidanlar

2.4.1.1. Süperoksit Dismutaz

Organizmada serbest radikallere karşı ilk savunma sistemidir. Superoksit dismutaz enzimi (SOD) süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüğü reaksiyonu katalizler. Süperoksit genel olarak, zincirleme radikalik tepkimeleri başlatır ve tepkimeler boyunca üretilen hidroksil radikali ve

süperoksit radikallerinden H_2O_2 üretimine yol açarak oksijen radikallerinden çok daha reaktif ve toksik etkili olan $\bullet\text{OH}$ radikalının ortamda birikmesini engeller (114).

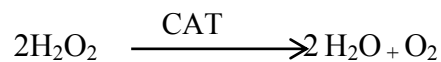


Hidrojen peroksitin oluşması spontan olarak da gerçekleşebilmekle birlikte SOD enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon spontan olana göre 4000 kat hızlı olur. Dolayısıyla SOD enzimi antioksidan savunmada son derece önemli bir enzimdir.

SOD enziminin bakır-çinko, mangan ve demir içeren üç tip izoenzimi vardır. Bakır ve çinko içeren Cu-Zn-SOD sitoplazmada, mangan içeren Mn-SOD mitokondride, demir içeren tipi ise ekstraselüler aralıkta aktivite gösterir(115).

2.4.1.2. Katalaz (CAT)

Hücre içinde peroksizomlarda yerleşmiş olan katalaz enzimi hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizler. 4 tane Hem grubu bulunduran bir hemoprotein olan katalazın her alt biriminde bir molekül NADPH bulunur. Katalazın aktivitesi karaciğer, böbrek ve eritrositlerde yüksektir(115).



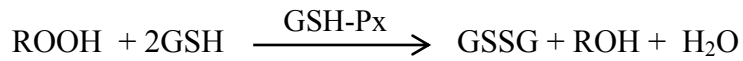
Katalazın K_m 'i yüksek olduğundan, hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonda olduğu durumlarda aktivite düşük olur, diğer peroksidazlar

(glutasyon peroksidaz) daha aktif olabilir. Katalazın substratı olan hidrojen peroksit miktarı arttıkça lineer olarak katalazın aktivitesi de artar ve bu da oksidatif strese karşı korunmada mükemmel bir olanak sağlar(115).

2.4.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Substratı hidrojen peroksit veya organik peroksit olan bir hidroperoksidazdır. Hücrenin sitoplazmada yer alır ve aktif bölgesinde 4 adet selenyum bulunur. Eritrositlerde ve diğer dokularda redükte glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin parçalanmasında rol alarak membran lipitlerini ve hemoglobini peroksitler aracılığıyla oluşabilecek oksidasyona karşı korur.

GSH-Px in iki substratı olan peroksitler alkolle indirgenirken diğer substrat olan glutayon (GSH) yükseltgenir ve yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) ortaya çıkar (116).



2.4.1.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-Redüktaz)

Hidrojen peroksitin indirgenmesi sırasında GSH oksitlenerek yükseltgenir. Glutasyon peroksidazın fonksiyonunun devamlılığı için yükseltgenmiş okside

glutatyon GSH redüktaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla tekrar indirgenir. NADPH bağımlı olan enzim hem sitoplazmada hemde mitokondride bulunur (107).

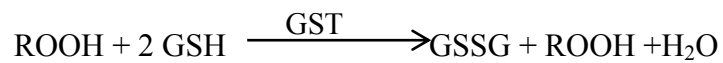


2.4.1.5. Glutatyon S-Transferaz (GST)

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

Detoksifikasyon metabolik yolunda son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek homeostasisin sağlanmasında önemli rol oynar. Endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşiklerin bağlanması glutatyon sayesinde gerçekleşmektedir (117). Hem sitozolde hem de membranda bulunan GST, vücutta karaciğer, böbrek, dalak ve plasentada yoğunlaşmıştır.

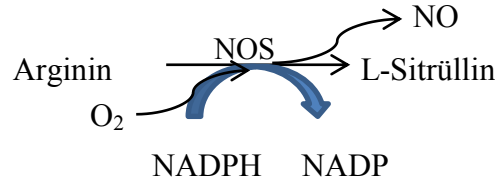
GST bir taraftan besinlerle alınan toksik maddelerin eliminasyonunu sağlarken, diğer taraftan prostoglandinlerin izomerizasyonu, hem, bilirubin, safra tuzu gibi maddeleri de GSH’ya bağlayarak taşınmasını da sağlamaktadır. Ayrıca reaktif bileşiklerle kovalent bağ yaparak onların vücuda zarar vermesini önlemektedir (118).



2.4.1.6. Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın endotelial, nöronal ve indüklenabilir olmak üzere üç formu tespit edilmiştir. Düşük miktarlarda üretilerek vasküler olayları yönlendiren endotelial izoformu eNOS, sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen izoformu nNOS ve yüksek miktarda üretilerek immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili komponent olan uyarılabilir formu iNOS olarak adlandırılır.

NOS, NO sentezinde substrat olarak L-arginin, kosubstrat olarak NADPH ve koenzim olarak da FAD, FMN, Tetrahidrobiopterin, indirgenmiş tiyol ve hem molekülünü kullanır. Bu kofaktörler elektron taşınmasında redoks grubu olarak görev alırlar ve sonuçta oksijen molekülünden bir oksijen atomu arjininin terminal guanidin nitrojen grubuna aktarılarak L-sitrüllin ve NO oluşur.



2.4.1.7. Enzim olmayan antioksidanlar

Organizmada doğal enzim sistemlerinin (SOD, CAT, GSH-Px, GR, sitokrom c oksidaz, hidroperoksidaz) dışında antioksidan etki gösteren başka maddeler de bulunmaktadır. Bunlar bazı makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, hemoglobin, miyoglobin, ferritin), mikromoleküller (A, C ve E vitaminleri, ürik asit, glutatyon, N-asetil sistein, metyonin, kaptopril, ubiquinon,

glukoz, bilirubin), bazı ilaçlar (rekombinant h-SOD, 21-aminosteroidler, demir şelatörleri, interlökin-1, ksantin oksidaz inhibitörleri, mannitol, barbitüratlar), karboksimetilsistein, trakeobronşial mukus, albumin ve taurin olarak sayılabilir. Enzimatik antioksidanların hücre içi etkinliklerine karşın, nonenzimatik antioksidanlar ekstraselüler aralıkta da etkinlik gösterir. Bu antioksidanlar, yağda eriyenler ve suda eriyenler olmak üzere iki başlıkta toplanabilir. Yağda eriyen antioksidanlar membranlarda ve lipoproteinlerde, suda eriyenler ise daha çok ekstraselüler aralıkta etkilidir (119, 120).

2.5. D Vitamini Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi

Saedisomeolia ve ark. Tip 2 diabetli ve sağlıklı bireylerde yaptıkları çalışmada diyabetli grupta 25OH D Vitamini düzeyleri ile GR ve GSH-Px seviyelerinin ters orantılı olduğunu, sağlıklı grupta ise 25OH D Vitamini düzeyleri ile SOD ve GSH-Px aktivitelerinin ters orantılı ancak GR aktivitesi ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir (121).

54 gebe üzerinde yapılan bir çalışmada D Vitamini desteği verilen grupta verilmeyen gruba göre Total Antioksidan Kapasitede ve Total Glutasyon konsantrasyonunda anlamlı artış saptanmıştır (122).

Diabetik ratlarda yapılan bir çalışmada, D Vitamini nin insülin salgılanmasını arttırdığı bunun yanısıra SOD, CAT, GSH-Px aktivitesini özellikle karaciğer ve böbrekte arttırdığı ve oksidatif strese karşı koruyucu olabileceği vurgulanmıştır (6).

Yine diabetik ratların testislerinde yapılan çalışmada ise, diabetin testiste SOD, CAT, GSH-Px düzeylerini düşürdüğü ancak verilen D vitaminin diabetin antioksidan enzimler üzerine yaptığı inhibisyonu kaldırdığı gösterilmiştir (123).

D Vitamini yapısal olarak endojen östrojene benzemektedir. Bu nedenle intranükleer östrojen reseptörlerine bağlanıp SOD, CAT ve GSH-Px gen transkripsiyonuna neden olarak antioksidan enzimlerin seviyelerinde artışa neden olmaktadır (124).

Hemodiyaliz hastalarına verilen D vitamini tedavisi sonrası D Vitamini nin GSH, SOD, CAT aktivitelerini artırıp antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir (125).

Vasküler düz kas hücrelerine 1,25 (OH) D Vitamininin SOD aktivitesini arttırdığı görülmüştür (126).

Atopik dermatitli hastalarda yapılan bir çalışmada D Vitamininin SOD ve CAT aktivitesinde anlamlı artışa neden olduğu gösterilmiştir (127).

D Vitamini ve vitamin E nin etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, D Vitamininin vitamin E ye benzer etki gösterip lipid peroksidasyonunun azalttığı görülmüştür. Aynı çalışmada D vitamininin SOD ve glukoz 6 fosfat dehidrogenaz aktivitesi artırdığı izlenirken, glutatyon redüktaz aktivitesini ise azalttığı tespit edilmiştir (128).

İntestinal hücrelerde 1,25 (OH) D Vitamini metaboliti olan 24,25 (OH) D Vitamininin katalaz enzimine bağlandığı ve inaktive ettiği, buna karşın ortamdaki hidrojen peroksit miktarını ise arttırdığı tespit edilmiştir (129).

Deneysel akut böbrek yetmezliği geliştirilen ratlara verilen D vitaminin GSH miktarını arttırdığı gösterilmiştir (130). Yapılan başka bir çalışmada da monositlere verilen D Vitamininin glutamat sistein ligaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon miktarlarını arttırdığı gösterilmiştir (131).

Meme kanserli hücrelerde, D Vitamini nin hücre içi GST ve GSH-Px'i değiştirmeden GSSG/GSH dengelerini değiştirdiğini, dolayısıyla ortamdaki hidrojen peroksit miktarını arttırarak prooksidan olabileceğini tespit edilmiştir (132).

Osteoblastlarda yapılan bir çalışmada D Vitamininin bu hücrelerde oluşan ROT'lerinin artışına sebep olduğu gösterilmiştir (133).

2.6. Sepsis- Serbest Radikal Metabolizması İlişkisi

Sepsiste görülen çoklu organ hasarlanması ve yetmezliğinden serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır. Enfeksiyon durumunda endotoksinlerin makrofaj ve sitokinlerinleri aktivasyonu sonucu ROT oluşumu görülmektedir. LPS ile uyarılan immün hücrelerden sitokinlerin salınır ve bu durum sistemik inflamatuvar kaskadın başlamasına sebep olur. Bunun sonucunda polimorf nüveli lökositler (PMNLs) organlarda birikir. PMNLs doku üzerinde direkt hasar yapabildikleri gibi aktive olmuş nötrofillerin miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ile oluşturdukları serbest radikaller lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre membran hasarına da sebep olur (134).

SOD, CAT, GSH-Px oksidatif hasara karşı koruyucu primer antioksidan molekülüdür. LPS'nin neden olduğu toksisite durumunda, artmış ROT'lerinin kompanzasyonu için bu moleküllerin artmış kullanımı, aktivitelerinde geri dönüşümsüz inhibisyona sebep olmaktadır. Ayrıca LPS uygulanması GSH düzeylerini azaltırken GSSG' de artmaya neden olmaktadır. Bu durumda antioksidan savunma zayıflamakta ve lipid peroksidasyonu, dolayısıyla da doku hasarı oluşmaktadır (134).

SOD ve CAT enzimleri serbest radikal detoksifikasyonunda rol oynayan önemli enzimler arasındadır. Sepsiste oksidatif hasarın, SOD/CAT imbalansı sonucu gelişen hidrojen peroksit seviyelerinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir. SOD enziminin aşırı aktive olduğu ancak CAT enziminin SOD ile korele artmadığı durumlarda hidrojen peroksit artışının olacağı bunun da fenton reaksiyonu yolu ile hidroksil radikali kaynağı olabileceği ifade edilmiştir. Antioksidanlarla tedavinin sepsisin neden olduğu ölümleri azaltabileceği de belirtilmektedir (135).

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 ve 19/10/2012 tarihinde 147-20993 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 ve her brinde 6 adet rat bulunan dört grup üzerinde gerçekleştirildi.

1. SHAM Grubu
2. Sepsis Grubu
3. 25(OH)Vitamin D3 Grubu
4. 25(OH)Vitamin D3+ Sepsis Grubu

SHAM grubu: Bu gruptaki 6 rata 3 gün boyunca 25(OH)Vitamin D3 içermeyen ayçiçek yağından 0,75 ml/gün olacak şekilde gavaj yoluyla verildi. Dördüncü gün intraperitoneal yolla serum fizyolojik verildi ve bir gün sonra sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Sepsis grubu: Bu gruptaki 6 rata 3 gün normal beslenme sonrası 4. günde 16 mg/kg dozunda LPS E.coli (O111.b4) intraperitoneal yolla verildi. Bir gün sonra ratlarda sepsis geliştiği gözlemlendi ve sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

25(OH)Vitamin D3 grubu: Bu gruptaki 6 rata 3 gün boyunca 2 mg/kg 25(OH)Vitamin D3(ayçiçek yağında çözülerek) gavaj yoluyla verildi ve bir gün sonra sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

25(OH)Vitamin D3+sepsis grubu: Bu gruptaki 6 rata 3 gün boyunca her gün 2 mg/kg 25(OH)Vitamin D3(ayçiçek yağında çözülerek) gavaj yoluyla verildi ve 4.gün 16 mg/kg dozunda LPS E.coli (O111.b4) intraperitoneal yolla uygulandı. Bir gün sonra ratlarda sepsis geliştiği gözlemlendi ve sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Çalışma süresinin sonunda hayvanlarda sepsis gelişip gelişmediğini değerlendirmek için hayvanların genel durumları, gözleri, tüy renkleri ve aktiviteleri gözlemlendi. Solunum sayısı ve kalp atım hızları sayıldı. Sonrasında anestezi uygulanan hayvanların vücut ısıları rektal yoldan ölçüldü. Bu işlemi takiben intrakardiyak yöntemle kanları alınıp sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Kalp dokuları çıkarıldı ve soğuk (+4°C) serum fizyolojik ile dokuların temizliği yapıldı. Bir miktar doku, içerisinde formol bulunan temiz şişelere konularak

histopatolojik inceleme için ayrıldı. Kalan kalp dokuları sıvı azot içinde dondurularak analiz gününe kadar -80°C de saklandı.

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

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

3.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (Heidolph DIAX 900)

Vortex (Heidolph Reax 2000)

Santrifüj (Hermle Z 380 K)

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

Spektrofotometre (Schimadzu, UV 1601)

pH metre (Jenway)

Manyetik Karıştırıcı, Otomatik ve cam pipetler

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

3.3.1. Total Protein Ölçümü

Süpernatanlarındaki total protein miktarı Lowry metoduna göre yapıldı.

Metodun Prensipleri: Alkali ortamda proteinlerin Cu^{2+} ile protein kompleksi oluşturarak, fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu Phenol reaktifini) indirgemesi ile mavi-mor renkli ürün oluşturması esasına dayanır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır (136).

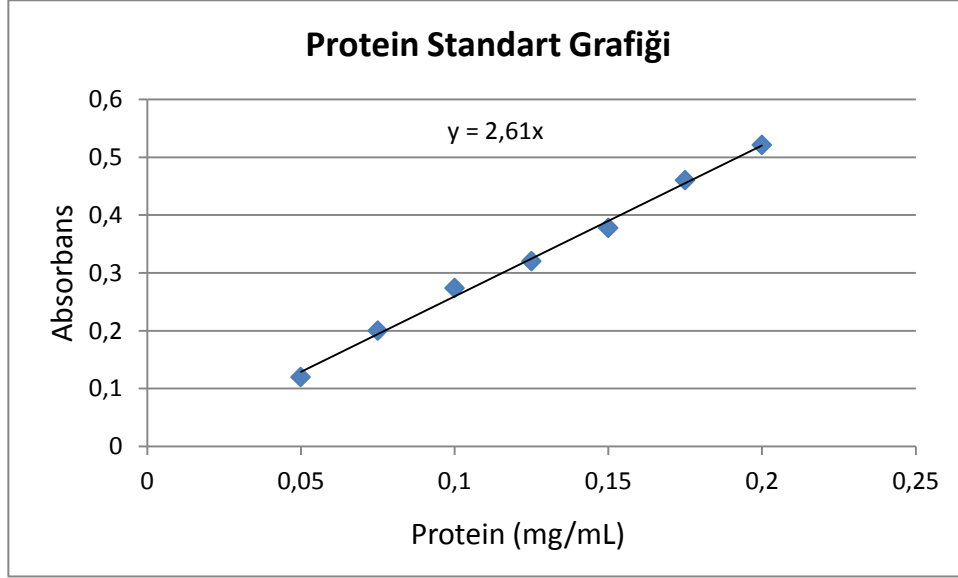
Reaktifler:

- 1) A reaktifi: 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1.0 gr $\text{Na}_3\text{-Sitrata}$ bir miktar distile suda çözüldükten sonra 100ml'ye tamamlandı.
- 2) B reaktifi: 20gr Na_2CO_3 ve 4.0 gr NaOH bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlandı.
- 3) C reaktifi: 50 ml B çözeltisi + 1.0 ml A çözeltisi karışımı hazırlandı.
- 4) D reaktifi (Folin-Ciocalteu Çözeltisi): 10 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi 10 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

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

hesaplandı. Standart olarak 0-0,5 mg/ml konsantrasyonlarında Bovin Serum Albumin (BSA) hazırlanarak absorbans konsantrasyon(mg/ml) grafiğı çizildi.



Grafik 1. Protein Standard Grafiğı

3.3.2. Superoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Kalp doku örneklerinde SOD aktivitesi Durak I. ve arkadaşları tarafından modifiye edilen metoda göre çalışıldı (137).

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

Kullanılan reaktifler:

- Ksantin (0,30mM)
- Nitroblue Tetrazolium (NBT) (150 μ M)
- Na₂CO₃ (400mM)
- BSA (1g/L)
- XO (167U/L)
- CuCl₂ (8mM)

Deneyin yapılışı:

Numune tüplerine ölçüm reaktifi, numune ve ksantin oksidaz enzimi; kör tüplerine ise ölçüm reaktifi ve ksantin oksidaz enzimi konuldu. Tüpler 25⁰C’de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numune tüplerine sadece CuCl₂, kör tüplerine ise CuCl₂ ile reaksiyon durdurulduktan sonra numune eklendi. İyiye 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 Aktivitesinin Ölçümü

GSH-Px aktivitesi Paglia DE ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (138).

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

Kullanılan Reaktifler:

- GSH (150mM)
- NADPH (3mM)
- H_2O_2 (100mM)
- NaN_3 (2M)
- Fosfat tampon (pH:7,0; 50mM) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$)
- GSH-redüktaz: Sıvı enzimden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile seyreltilerek

hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

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

3.3.4. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Kalp doku örneklerinde Katalaz aktivitesinin ölçümü Aebi H'nın metoduna göre yapıldı (139).

Metodun prensibi:

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

Kullanılan reaktifler:

- Fosfat tamponu(50mM,pH=7)
- Tamponlanmış H₂O₂ çözeltisi

Deneyin yapılışı:

Tampon çözelti ile sıfır ayarı yapılmış spektrofotometreye içerisinde tamponlanmış H₂O₂ çözeltisi (absorbans aralığı yaklaşık 0.5) bulunan küvet konuldu, absorbans değişimi 1 dakika boyunca takip edildi. Daha sonra numune ilave edildi, küvet 2-3 kez altüst edilip karıştırılarak numunenin absorbansı değişimi 5 dakika boyunca takip edildi. Lineer olan bölgeden $\Delta A/dak$ değeri bulunarak aktivite hesaplandı. Sonuçlar IU/mg protein olarak verildi.

3.3.5. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzim Ölçümü

NOS aktivitesi ölçümü Durak I. ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı (140).

NOS aktivitesinin ölçüm prensibi numunedeki NOS'un arginini sitrülline dönüştürmesi ve oluşan NO düzeyinin belirlenmesi esasına dayanır.

Kullanılan Reaktifler

- Arginin (20mM)
- Naftil Etilendiamin Hidroklorid (12,5 mM)
- Sulfanilik Asit (20 mM)
- HCl (4 mM)

Deneyin Yapılışı:

Numune tüplerine arginin ve numune, kör tüplerine ise sadece numune eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında hem numune hem de kör tüplerine Naftil Etilendiamin Hidroklorid , Sulfanilik Asit ve HCl eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonun ardından kör tüplerine arginin eklenip karıştırıldıktan sonra her bir tüpün absorbansı 540 nm'de distile suya karşı okundu. NOS aktivitesi hesaplanmasında Sodyum-nitroprussid $\text{Na}_2(\text{Fe}[\text{CN}]_5\text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ NO standardı olarak kullanılarak 1 Molarlık stok çözeltiden 50 mikromolar - 1 milimolar arasında standartlar hazırlanarak grafiğin eğiminden yararlanılıp hesaplandı. Sonuçlar IU/ mg Protein olarak verildi.

3.3.6. Malondialdehid (MDA) Miktarının Ölçümü

Kalp doku örneklerinde MDA miktarı Van Y. ve arkadaşları tarafından tarif edilen metoda göre çalışıldı (141).

Metodun prensibi: İki mol Tiyobarbitürik Asit (TBA) asidik ortamda ve 85-100 °C sıcaklıkta bir mol MDA ile birleşerek mor renkli TBA-MDA kompleksini oluşturur. Bu kompleksin verdiği absorbans 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan reaktifler:

- 1.Fosfat Tamponu: 100 mM, pH:6 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2.% 20’lik Triklorasteik Asit (TCA) çözeltisi
- 3.% 1’lik TBA çözeltisi
4. MDA standardı: 1,1,3,3-Tetraetoksi propan standart çözelti olarak kullanıldı.

1,1,3,3-Tetraetoksi propandan 10 mM stok çözelti hazırlandı, stok çözeltiden uygun seyreltmelerle 10, 25, 50, 75 ve 100 μM ’lık standart çözeltiler hazırlanarak standart grafik çizildi.

Absorbans= f (Konsantrasyon) grafiğinin eğiminden de numunelerdeki MDA miktarları nmol/ mg protein olarak hesaplandı.

Deneyin yapılışı: Numune tüplerine tampon çözelti, etanol, TBA, TCA ve numune konuldu. Kör tüplerine ise TBA hariç diğer reaktifler kondu. 90° C’de 30 dk. inkübasyon sonrasında kör tüplerine de TBA eklenerek 5000 devirde 10 dk.

santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı 532 nm’de distile suya karşı okundu. Sonuçlar nmol / mg protein olarak verildi.

3.4. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi

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

3.5. İstatistiksel Analiz

Araştırmanın verileri SPSS 15.0 istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerde tanımlayıcı istatistikler yüzde, ortalama, ortanca, standart sapma olarak belirtilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorow Smirnow ve Shapiro Wilks testleri ile kontrol edilmiştir. Normal dağılıma uyan bağımsız iki gruplu sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında Student t testi, normal dağılıma uymayan bağımsız iki gruplu sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Buna ek olarak normal dağılıma uyan ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında ANOVA, normal dağılıma uymayanlarda ise Kruskal Wallis Testi kullanılmıştır. Üçlü gruplar arasında saptanan farkın hangi gruptan olduğunu bulmak için gruplar ikili ikili karşılaştırılmış ve Bonferoni düzeltmesi yapılmıştır. İki sürekli değişken

arasındaki korelasyon incelenirken normal dağılıma uyan değişkenler için Pearson Korelasyonu, normal dağılıma uymayan değişkenler için Spearman korelasyonu kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için tip 1 hata değeri %5'in altında olan durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Ratların Sepsis Bulgularının Değerlendirilmesi

4.1.1. Ratların Gözlemsel Sepsis Bulguları

Yapılan gözlemde Sepsis ve D Vitamini + Sepsis gruplarındaki ratların tüylerinde kırmızılık, aktivitelerinde yavaşlama ve gözlerinde red tears bulguları görülürken, SHAM ve D Vitamini gruplarında bu bulgulara rastlanmadı. Ratların gözlemsel sepsis bulguları Tablo 2’de görülmektedir.

Tablo 2. Ratların gözlemsel sepsis bulguları

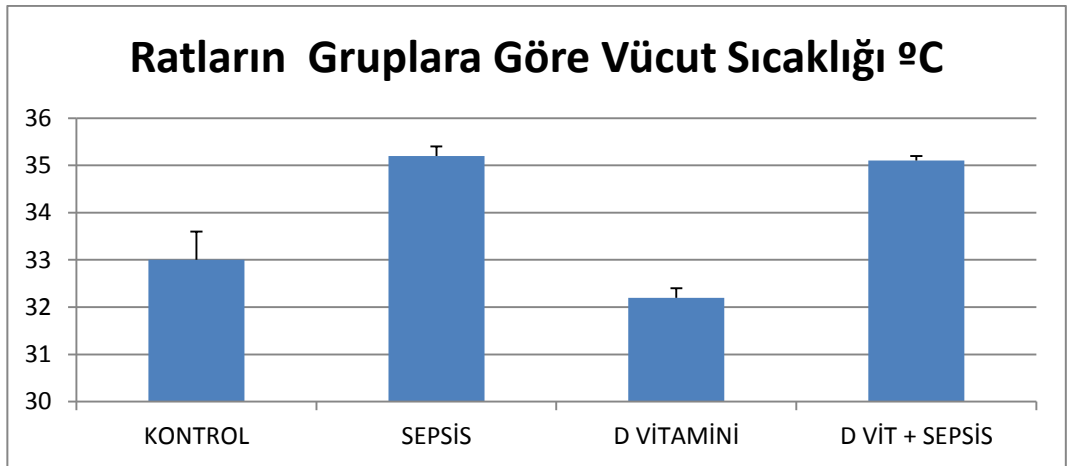
	Tüylerde Kırmızılık	Aktivitede Yavaşlama	Gözlerde Red Tears
SHAM	X	X	X
Sepsis	✓	✓	✓
D Vitamini	X	X	X
D Vitamini+Sepsis	✓	✓	✓

4.1.2. Ratların Rektal Yolla Ölçülen Vücut Sıcaklıkları

Ratların vücut sıcaklıkları rektal yolla ölçülmüştür. Ölçüm bütün ratlarda anestezi uygulandıktan hemen sonra yapılmıştır. Tüm grupların vücut sıcaklıkları Tablo 3 ve Grafik 2’de görülmektedir.

Tablo 3. Ratların rektal yolla ölçülen vücut sıcaklıkları

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



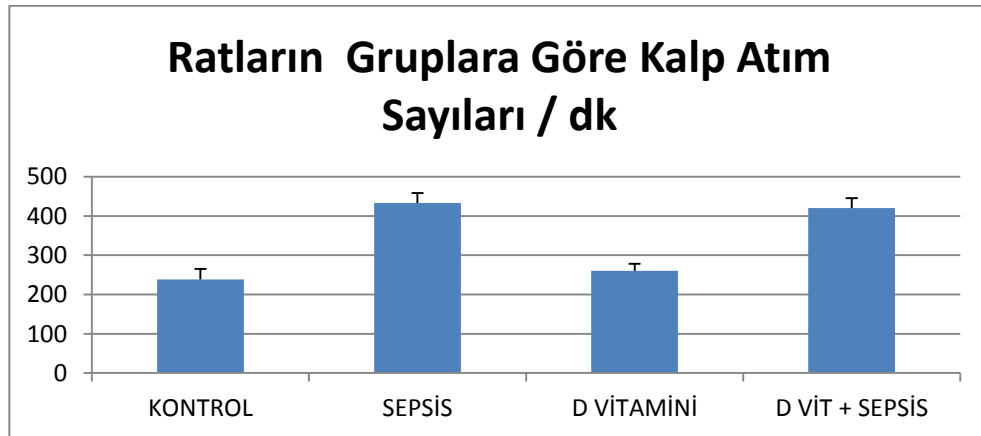
Grafik 2. Ratların tüm gruplarda rektal yolla ölçülen ortalama vücut sıcaklıkları.

4.1.3. Ratların Gruplara Göre Kalp Atım Sayıları

Ratların gruplara göre kalp atım sayıları Tablo 4 ve Grafik 3'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Ratların kalp atım sayıları

GRUP	Kalp Atım Sayıları $\pm$ Standart sapma
SHAM	238 $\pm$ 26,9 /dk
Sepsis	433 $\pm$ 25 /dk
D vitamini	260 $\pm$ 17,9 /dk
D Vitamini+Sepsis	420 $\pm$ 25,4 /dk
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	
1-2	$p < 0,005$
1-3	$p > 0,05$
1-4	$p < 0,0025$
2-3	$p < 0,005$
2-4	$p > 0,05$
3-4	$p < 0,005$



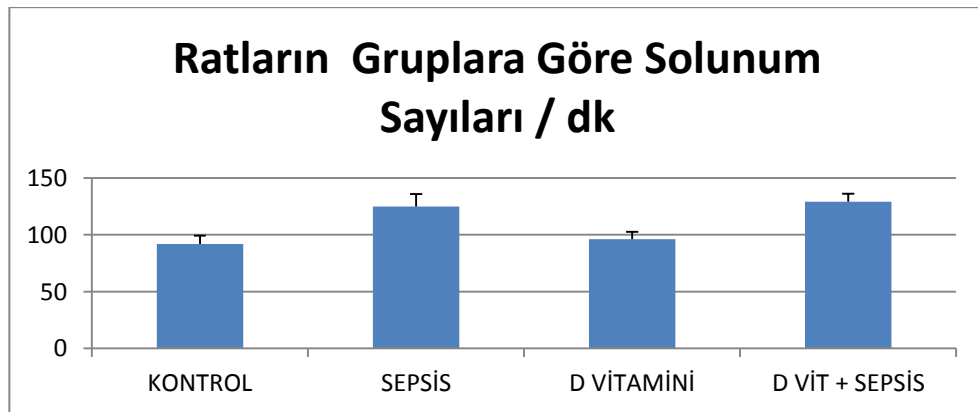
Grafik 3. Ratların tüm gruplarda kalp atım sayıları

4.1.4. Ratların Gruplara Göre Solunum Sayıları

Ratların gruplara göre solunum sayıları Tablo 5 ve Grafik 4’te gösterilmiştir.

Tablo 5. Ratların solunum sayıları

GRUP	Solunum Sayıları $\pm$ Standart sapma
SHAM	92 $\pm$ 7,2 /dk
Sepsis	125 $\pm$ 10,9 /dk
D vitamini	96 $\pm$ 6,7 /dk
D Vitamini+Sepsis	129 $\pm$ 7 /dk
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	
1-2	$p < 0,0025$
1-3	$p > 0,05$
1-4	$p < 0,0025$
2-3	$p < 0,0025$
2-4	$p > 0,05$
3-4	$p < 0,0025$



Grafik 4. Ratların tüm gruplarda solunum sayıları

4.2. Rat Kalp Dokularında Enzim Aktiviteleri

Deney sonrası rat kalp dokularında enzim aktiviteleri ve MDA miktarlarına ait ortalama±standart sapma değerleri Tablo 6’da görülmektedir. Enzim aktiviteleri grafiklerde ortalama ± standart hata şeklinde görülmektedir (Grafik 3-6). Tüm gruplara ait enzim korelasyonları Tablo 6’da, grup içi enzim korelasyonları ise Tablo 7-10’da görülmektedir.

Tablo 6. Rat kalp dokularında enzim aktiviteleri ve MDA miktarlarına ait ortalama±standart sapma değerleri

GRUPLAR	SOD (U/mg pro)	CAT (IU/mg pro)	GSH-Px (IU/mg pro)	NOS (IU/mg pro)	MDA (nmol /mg pro)
SHAM (n=6)	17,4 ±2.4	4717 ±911	10,4 ±1.62	20,0 ±4.0	9,1 ±1.44
SEPSİS (n=6)	21,5 ±2.8	6029 ±1106	9,80 ±1.85	30,3 ±9,0	12,06 ±1.01
D VİTAMİNİ (n=6)	19,5 ±2.5	6779 ±1055	10,4 ±1.48	25,35 ±4,0	9,9 ±0.89
(D VİT + SEP) (n=6)	21,1 ±1.4	7029 ±346	9,19 ±1.22	29,4 ±3.29	10,13 ±1.40
İstatistiksel Değerlendirme (Mann Whitney U-test)					
K-S	p=0,027	p=0,0488	p=0,579	p=0,029	p=0,002
K-D vit	p=0,179	p=0,0047	p=0,944	p=0,045	p=0,273
K-(D vit+S)	p=0,008	p=0,0002	p=0,169	p=0,0013	p=0,236
S-D vit	p=0,231	p=0,0257	p=0,609	p=0,252	p=0,003
S-(D vit + S)	p=0,810	p=0,0372	p=0,490	p=0,833	p=0,02
D vit- (D vit+S)	p=0,191	p=0,594	p=0,169	p=0,084	p=0,736

Tablo 7. Tüm gruplara ait korelasyon analizi

			Katalaz	GPX	MDA	NOs	SO D
Spearman's rho	Katalaz	r	1				
		p	-				
		n	24				
	GPX	r	-0,544**	1			
		p	0,006	-			
		n	24	24			
	MDA	r	0,196	-0,194	1		
		p	0,360	0,364	-		
		n	24	24	24		
	NOs	r	0,528**	-0,387	0,476*	1	
		p	0,008	0,062	0,019	-	
		n	24	24	24	24	24
	SOD	R	0,652*	-0,490*	0,252	0,377	1
		p	0,001	0,015	0,235	0,069	-
		n	24	24	24	24	24
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).							
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).							

Tablo 8.SHAM grubuna ait korelasyon analizi

			Katalaz	GPX	MDA	NOS	SOD
SHAM	Katalaz	r	1				
		p	-				
	GPX	r	-0,600	1			
		p	0,208	-			
	MDA	r	0,029	-0,429	1		
		p	0,957	0,397	-		
	NOS	r	0,486	-0,143	0,143	1	
		p	0,329	0,787	0,787	-	
	SOD	r	0,429	-0,829*	0,257	0,371	1
		p	0,397	0,042	0,623	0,468	-

Tablo 9. D Vitamini grubuna ait korelasyon analizi

			Katalaz	GPX	MDA	NOS	SOD
D Vitamini	Katalaz	r	1				
		p	-				
	GPX	r	-0,886*	1			
		p	0,019	-			
	MDA	r	0,714	-0,657	1		
		p	0,111	0,156	-		
	NOs	r	0,371	-0,314	0,771	1	
		p	0,468	0,544	0,072	-	
	SOD	r	0,771	-0,771	0,371	0,257	1
		p	0,072	0,072	0,468	0,623	-

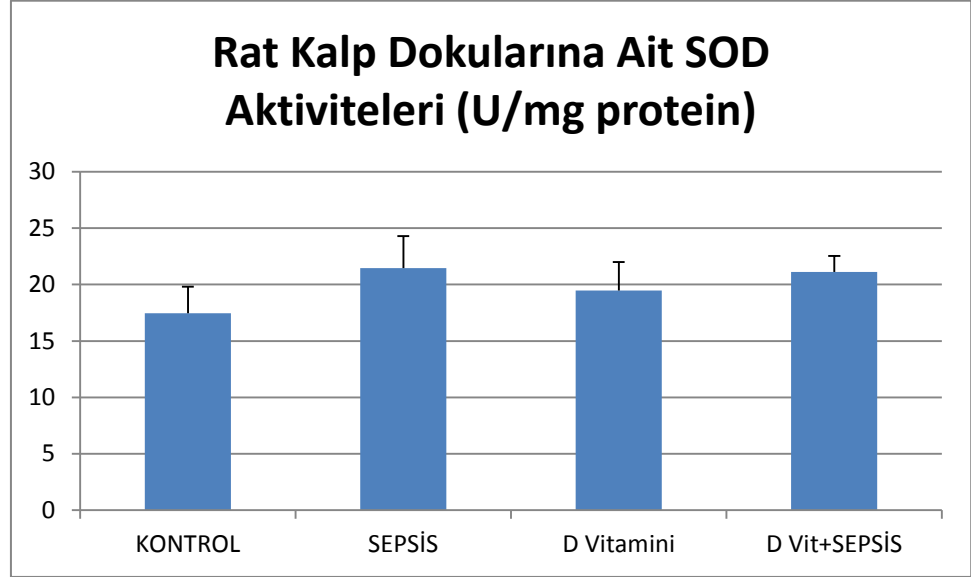
Tablo 10. Sepsis grubuna ait korelasyon analizi

			Katalaz	GPX	MDA	NOS	SOD
Sepsis	Katalaz	r	1				
		p	-				
	GPX	r	- 0,943**	1			
		p	0,005	-			
	MDA	r	-0,029	-0,257	1		
		p	0,957	0,623	-		
	NOs	r	0,657	-0,771	0,657	1	
		p	0,156	0,072	0,156	-	
	SOD	r	0,371	-0,086	-0,657	-0,143	1
		p	0,468	0,042	0,156	0,787	-

Tablo 11. D Vitamini + Sepsis grubuna ait korelasyon analizi

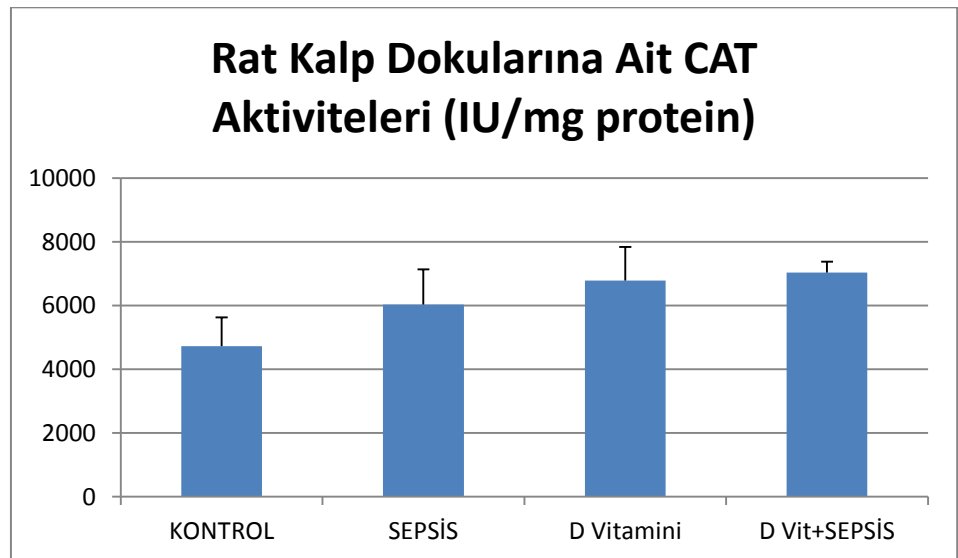
			Katalaz	GPX	MDA	NOS	SOD
D Vitamini + Sepsis	Katalaz	r	1				
		p	-				
	GPX	r	0,029	1			
		p	0,957	-			
	MDA	r	-0,829*	0,486	1		
		p	0,042	0,329	-		
	NOs	r	-0,143	0,314	0,143	1	
		p	0,787	0,544	0,787	-	
	SOD	r	0,714	-0,029	-0,543	-0,371	1
		p	0,111	0,957	0,266	0,468	-

4.2.1. Rat Kalp Dokularının SOD Aktiviteleri



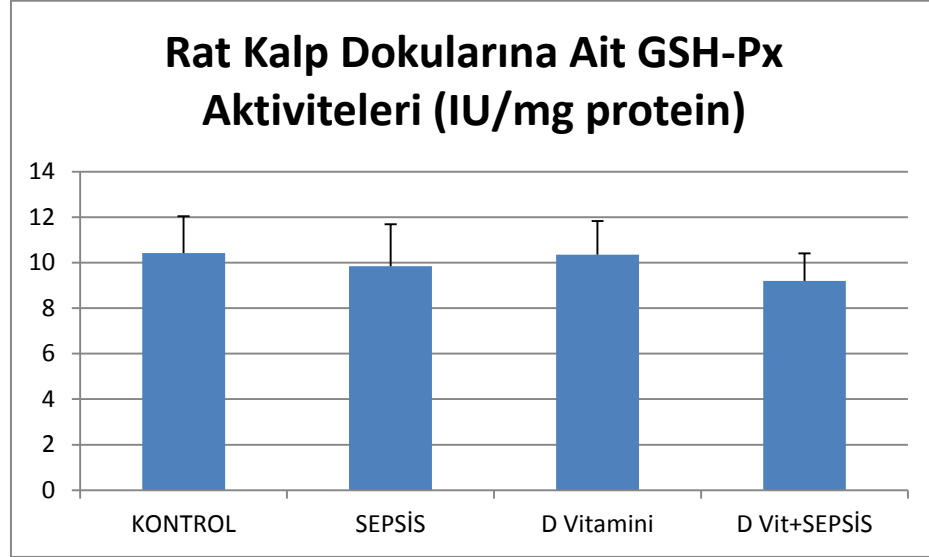
Grafik 5. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait SOD aktiviteleri

4.2.2. Rat Kalp Dokularının CAT Aktiviteleri



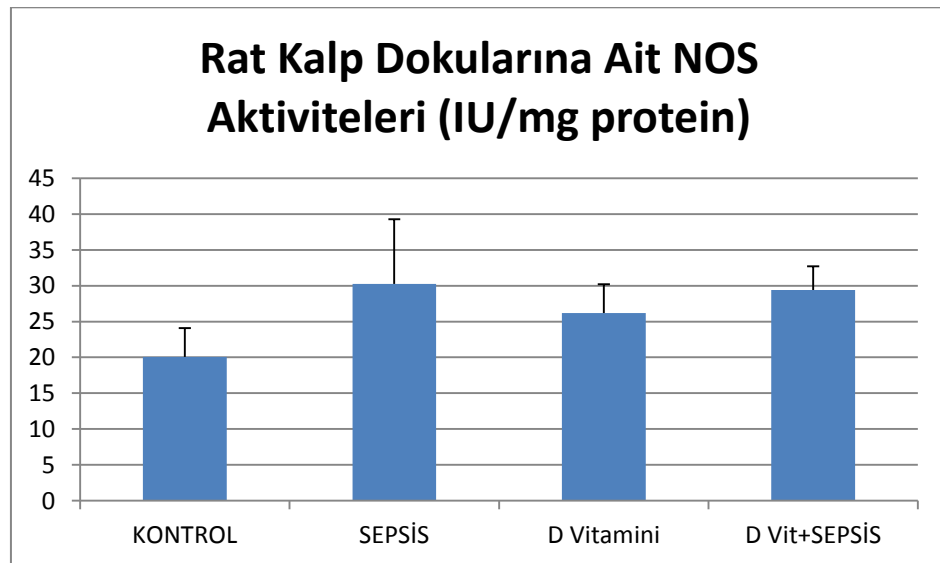
Grafik 6. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait CAT aktiviteleri

4.2.3. Rat Kalp Dokularının GSH-Px Aktiviteleri



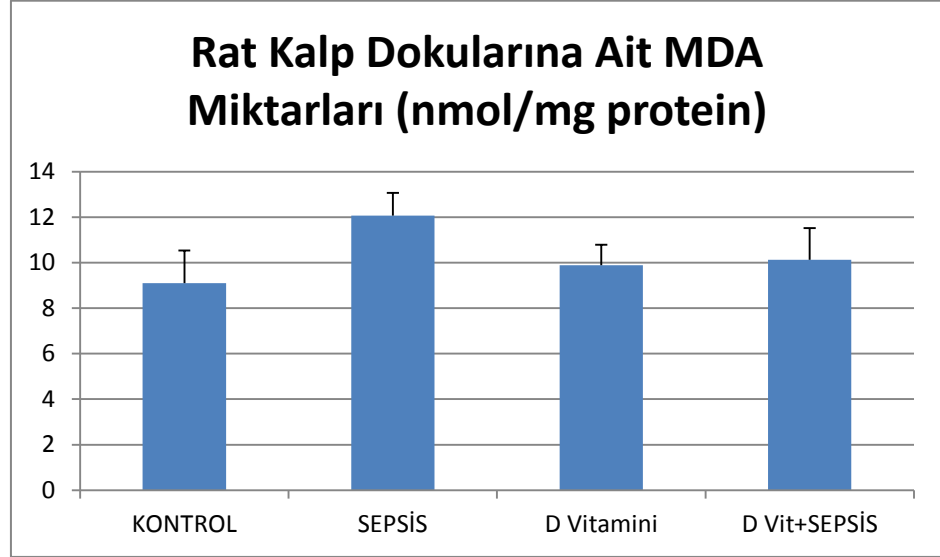
Grafik 7. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait GSH-Px aktiviteleri

4.2.4. Rat Kalp Dokularının NOS Aktiviteleri



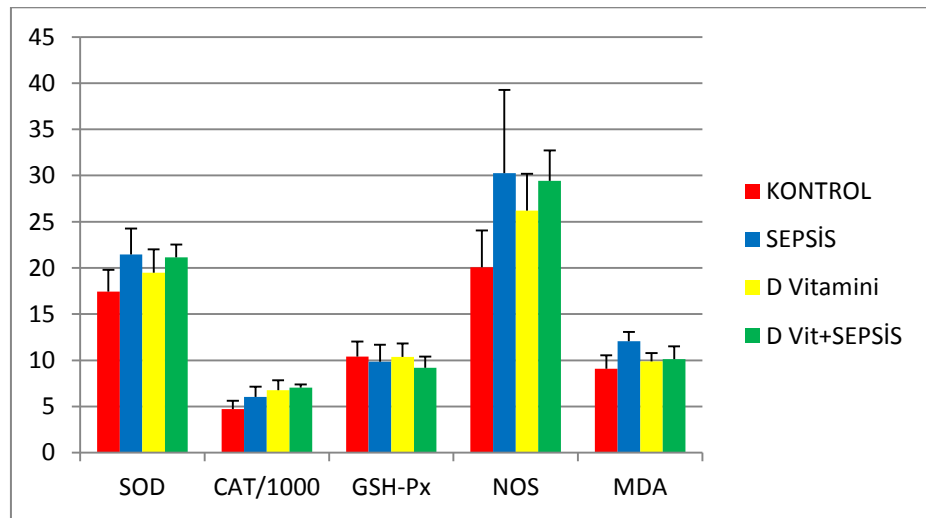
Grafik 8. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait NOS aktiviteleri

4.2.5. Rat Kalp Dokularının MDA miktarları



Grafik 9. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait MDA miktarları

4.2.6. Tüm Enzim Aktiviteleri ve MDA seviyeleri



Grafik 10. Tüm gruplarda rat kalp dokularına ait tüm enzim aktiviteleri ve MDA miktarları

Çalışmamızda SOD enzim aktivitesi Sepsis ve D Vitamini+Sepsis gruplarında SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzede artmışken (sırasıyla $p=0,027$ ve $p=0,008$) sadece D vitamini verilen grupta SHAM grubuna göre anlamlı değişiklik gözlenmemiştir ($p=0,179$).

Katalaz enzim aktiviteleri tüm gruplarda SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştır (sepsis $p=0,0488$, D Vitamini $p=0,0047$ ve D Vitamini + Sepsis $p= 0,0002$). Ayrıca D Vitamini ve D Vitamini + Sepsis gruplarında Sepsis grubuna göre katalaz aktivitelerinde anlamlı artışlar yaşanmıştır (sırasıyla $p=0,0257$ ve $p=0,0372$).

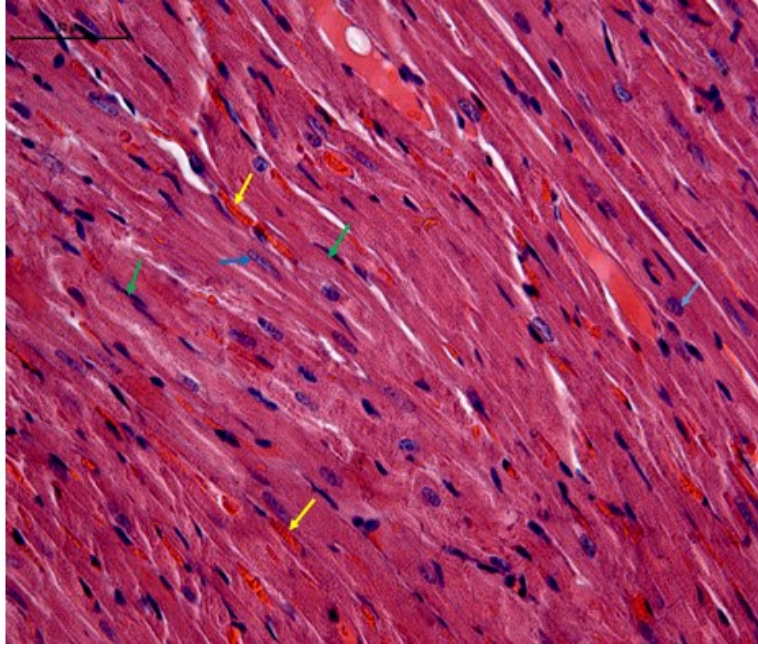
GSH-Px aktivitesi SHAM grubu ile karşılaştırıldığında ve gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (tüm gruplarda $p> 0,05$).

NOS aktivitesinde ise SHAM grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedilmiş (sepsis $p=0,029$, D Vitamini $p=0,045$ ve D Vitamini + Sepsis $p= 0,0013$), diğer gruplarda ise anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

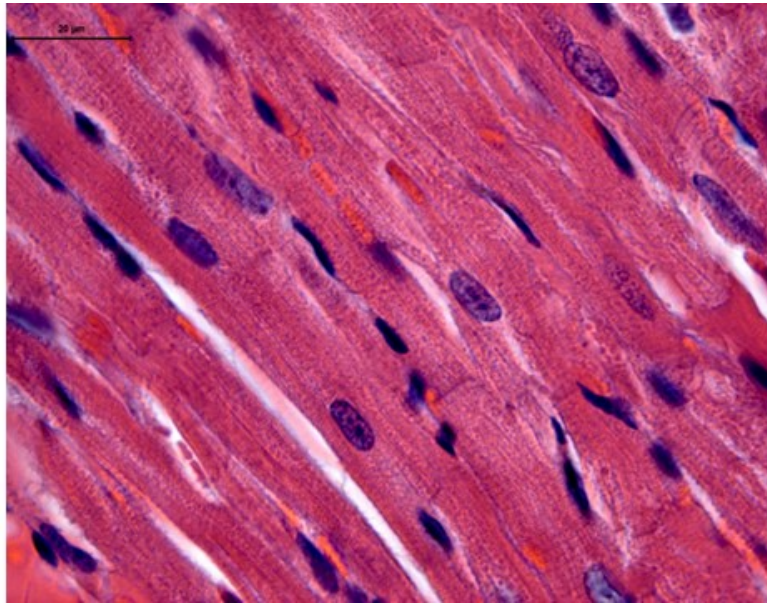
MDA miktarlarında ise SHAM grubuna göre sadece Sepsis grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedilmiş ($p=0,002$), diğer gruplarda ise anlamlı değişim gözlenmemiştir. Ayrıca Sepsis grubunda D vitamini ve D Vitamini + Sepsis grubuna göre istatistiksel anlamlı artış kaydedilmiştir (sırasıyla $p=0,003$ ve $p= 0,02$)

4.3. Histopatolojik Bulgular

SHAM grubu ışık mikroskopik olarak değerlendirildiğinde kardiyak myositlerin, kapiller yapısı ve dağılımının, fibroblastların organizasyonu yapısının normal histolojik karakterde olduğu gözlemlendi (Resim 1 ve 2).

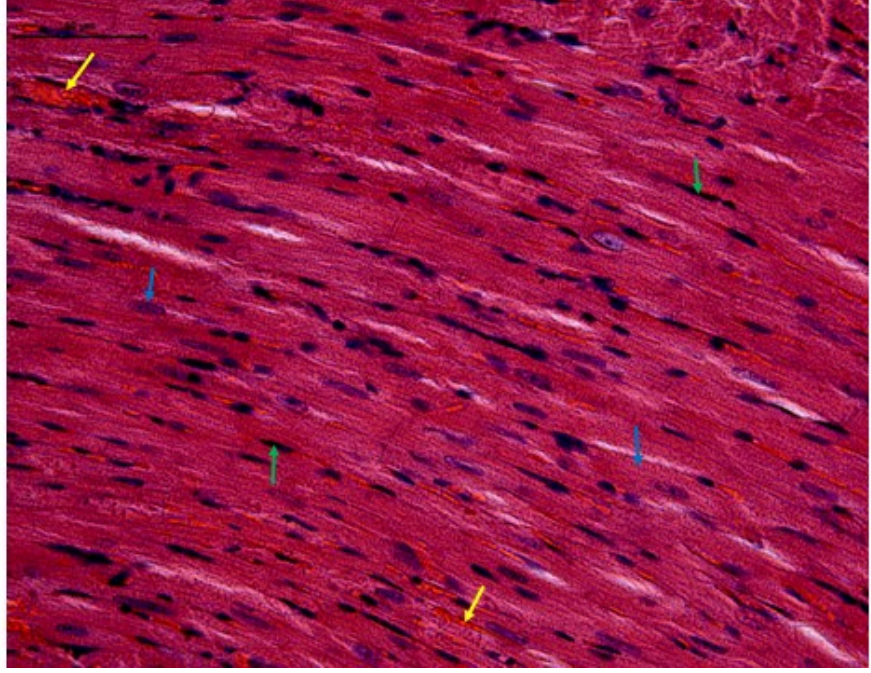


Resim 1: SHAM Grubu

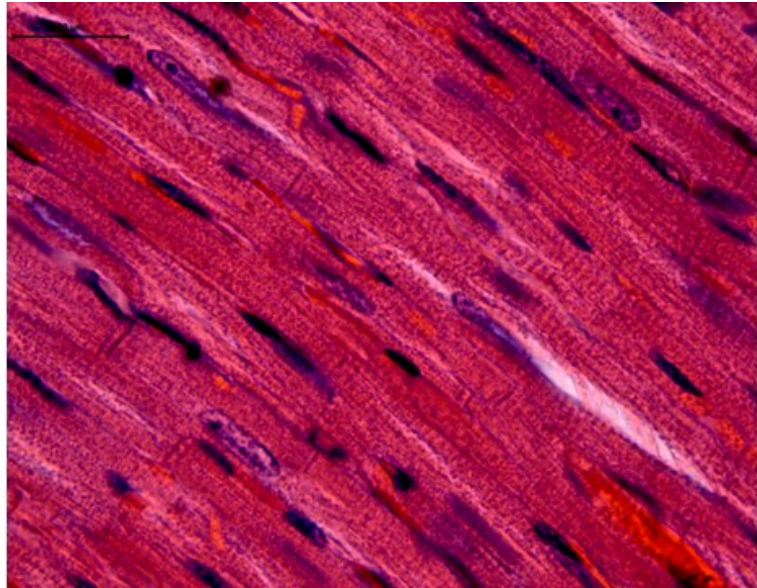


Resim 2: SHAM Grubu

D Vitamini grubunda ise kardiyak doku elemanları değerlendirildiğinde tüm histolojik yapıların bulgularının, SHAM grubu bulguları ile özdeş olduğu gözlendi (Resim 3 ve 4).

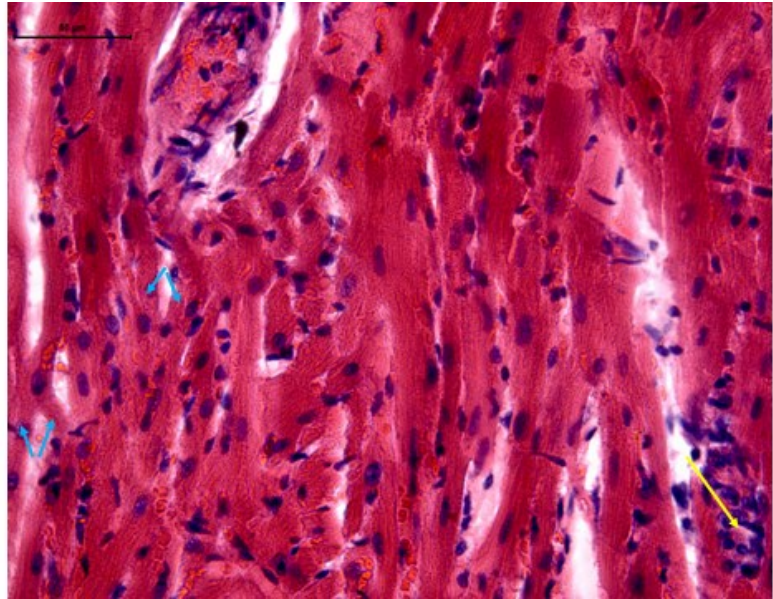


Resim 3: D Vitamini Grubu

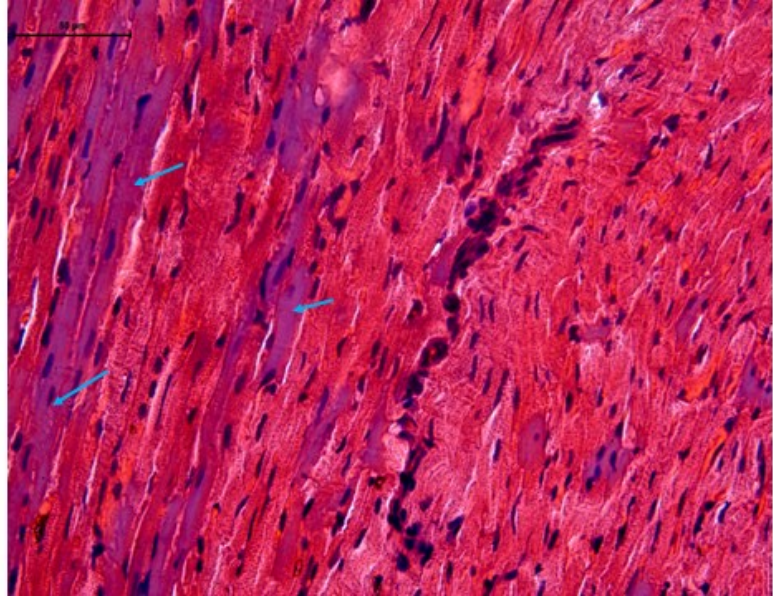


Resim 4: D Vitamini Grubu

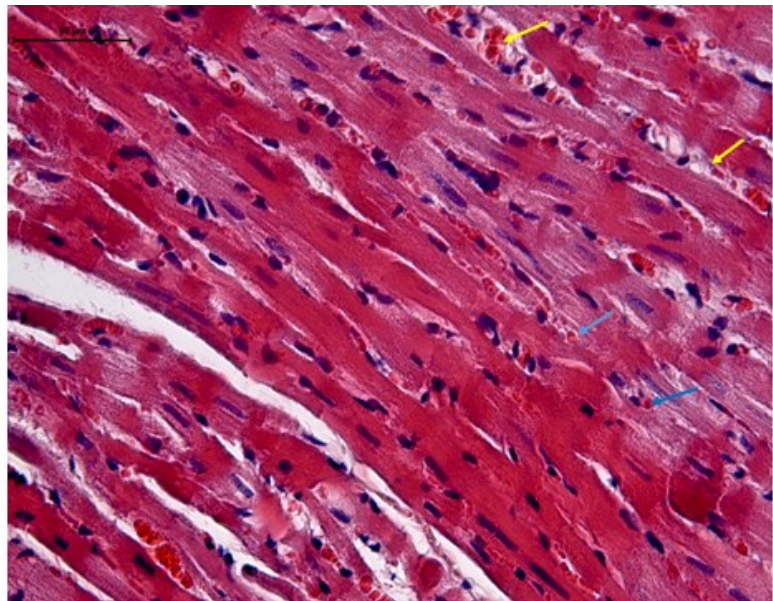
Sepsis grubunda ise küçük büyültmede, kardiyomyositlerin normal histolojik oryantasyonunun bozulmuş olduğu, kollaterallerde artış belirgin olarak gözlemlendi. Ayrıca fibroblastlarda yaygın proliferasyon ve inflamatuvar hücre kümeleri dikkati çekti. Bu grupta, yaygın vaskülarizasyon gelişirken, kapiller dilatasyonu dikkati çekti. Ayrıca yaygın eritrosit infiltrasyonu vardı. Sepsis grubunda büyük büyültmelerde dikkati çeken en önemli bulgu kardiyomyositlerde gözlenen myofibril kaybıydı. Bu bulgu hücre içinde açık eozinofilik alanların yaygın olması ile belirgindi. Ayrıca bazı kardiyomyositlerin bazofilik boyanma özelliği gösterdiği saptandı (Resim 5-8).



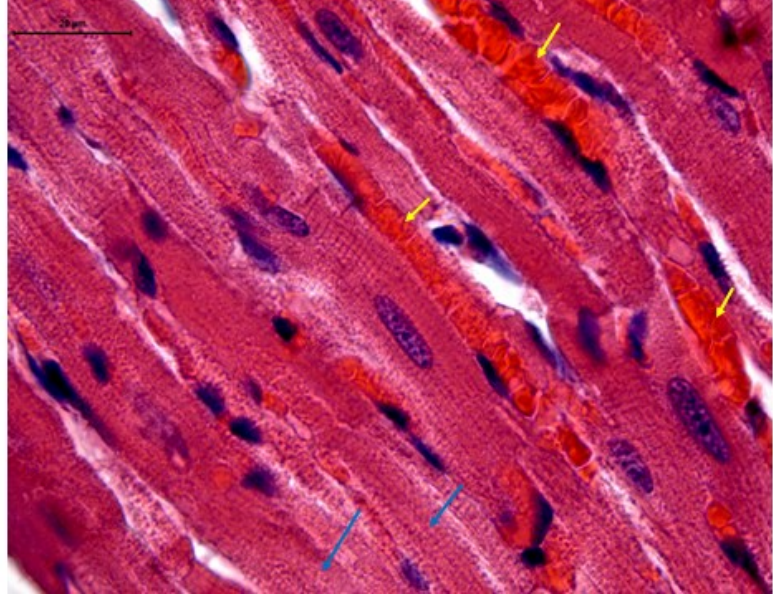
Resim 5: Sepsis Grubu



Resim 6: Sepsis Grubu

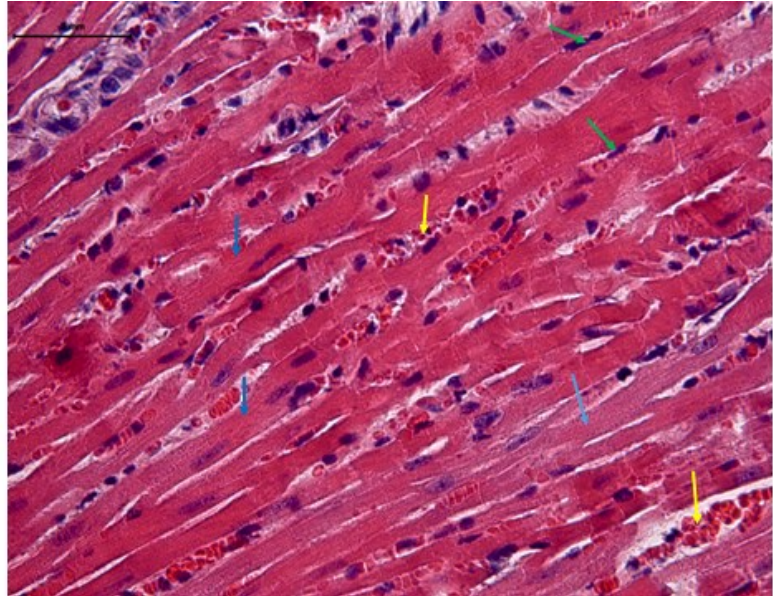


Resim 7: Sepsis Grubu

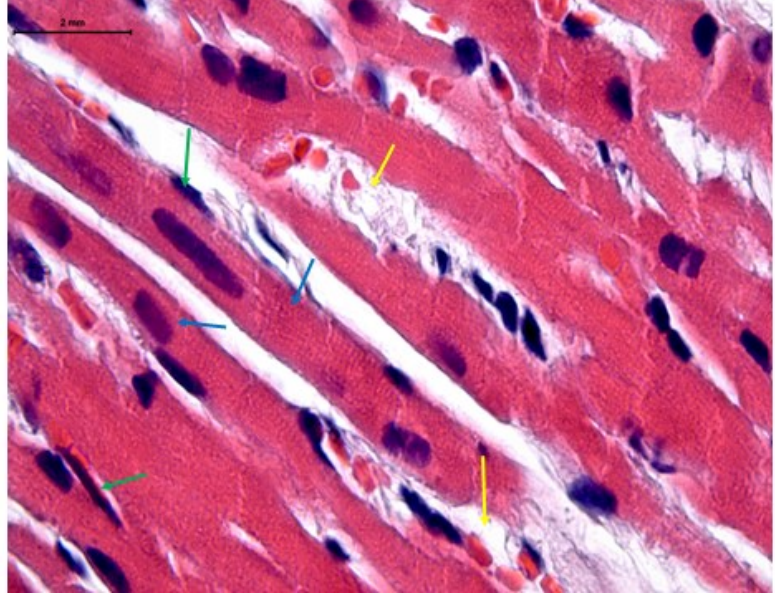


Resim 8: Sepsis Grubu

D Vitamini+Sepsis grubunda ise kardiyak dokuda kapiller dilatasyonu devam ederken diğer tüm doku elemanlarının SHAM ve D Vitamini grubu ile özdeş özellikte olduğu gözlemlendi (Resim 9 ve 10).



Resim 9: Sepsis Grubu



Resim 10: Sepsis Grubu

5. TARTIŞMA

Sepsis, mortalitesi çok yüksek olan ciddi bir klinik problemdir. Lipopolisakkaridler ile indüklenen sepsis durumunda kardiyak hücrelerde kontraksiyon kabiliyetlerinde azalma ve ROT'ne bağlı kardiyak hücrelerde otofaji görülmektedir (142).

Turdi ve ark. yaptığı çalışmada katalaz enziminin aşırı üretiminin otofajik mekanizmaları düzenleyerek ROT bağımlı kardiyak hücre ölümlerini ve buna bağlı olarak mortalite oranını da %51,8 oranında azalttığını belirtmişlerdir (143). Aynı şekilde ekstrasellüler SOD enzim aktivitesindeki artışın kalp dokusunda iskemi reperfüzyon sonrasında oluşan hasarı azalttığını belirtilmiştir (144).

Sepsiste kalp dokusundaki antioksidan enzim aktiviteleri incelendiğinde birbiriyle çelişen sonuçlara rastlanmaktadır.

Rozenberg ve ark. Sepsiste miyokard hasarının yaşla ilgisi olup olmadığını araştırdıkları çalışmada, 0,5 mg/kg LPS verilip sepsis oluşturulan ratların kalp dokularında SHAM grubuna göre SOD ve CAT enzim aktivitelerinde hem genç hem de yaşlı ratlarda bir artışın söz konusu olduğunu, ancak genç ratların kalp dokularındaki TBARS seviyelerinin azalmasına rağmen yaşlı olanlarda ise arttığını kaydetmişlerdir. Oluşan bu durumun yaşlanmayla kalp dokusunda artan NO'e bağlı olduğunu ve yaşlı dokularda daha çok peroksinitrit oluştuğunu ileri sürmektedirler (145). Çalışmamızda da sepsis grubunun kalp dokularında SHAM grubuna göre anlamlı düzeyde MDA miktarı ve NOS aktivite artışı gerçekleşmiştir (sırasıyla $p=0,002$ ve $p=0,029$). MDA seviyelerinin anlamlı artışından, NOS aktivitesi artışı sonucu kalp dokusunda artan NO ve $O_2\bullet^-$ artışına

bağlı olarak ortamda biriken yüksek miktardaki peroksinitritin sebep olduğu düşünülebilir. Öte yandan sepsis grubundaki SOD ve CAT aktivite artışı, sepsiste oksidatif yükün artışına karşın enzimatik antioksidan mekanizmaların tetiklendiğini düşündürürken, aynı zamanda MDA miktarının artışının da gerçekleşmesi antioksidan savunma mekanizmaların yetersiz kalması şeklinde de yorumlanabilir. Histolojik incelemelerde sepsis grubundaki kardiyomiyositlerin histolojik oryantasyonlarının bozulmuş olması ve myofibril kaybı, sepsis grubunda SHAM grubuna göre oksidatif stresin arttığını ve antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığını desteklemektedir.

Ritter ve ark. Çekal ligasyon-perforasyon yöntemiyle sepsis yapılan ratlarda oksidatif parametreler ve mortalitelerini araştırdıkları çalışmada kalp dokusundaki SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış bulmalarına rağmen bu artışın orantılı olmadığını ve SOD aktivitesinin CAT aktivitesine göre daha fazla arttığını tespit etmişlerdir. Kalp dokusundaki TBARS miktarı artışını ve hücresel hasarını SOD/CAT imbalansına, dolayısıyla da ortamda artan H_2O_2 'in yaptığı selüler hasara bağlamışlardır (146). Çalışmamızda da sepsis grubunda SOD ve CAT aktivitesi artışı gerçekleşmiş ve bu artış Ritter ve ark. yaptıkları çalışmanın aksine orantılı, hatta bir miktar da CAT lehine gerçekleşmiştir. Bu nedenle ortamda SOD/CAT imbalansı nedeniyle oluşan H_2O_2 artışından bahsedilemez. Buna rağmen MDA miktarı artışının yaşanması, sepsiste oksidatif stresin artması ve bu artışı antioksidan savunma sistemlerinin kompanze edememesiyle açıklanabilir.

Ben-Shaul ve ark. Doğal antioksidanlar ve apocynin tedavisinin LPS ile sepsis yapılan rat kalp dokusundaki etkisini araştırdıkları çalışmada sepsis yapılan grupta kalp dokusunda SHAM grubuna göre SOD ve CAT enzim aktivite artışıyla beraber TBARS miktarı artışı varken GSH-Px enziminde ise değişime olmamıştır. Bu çalışmada dikkat çeken en önemli husus NADPH oksidaz enzim aktivitesinin aşırı miktarda artmasıdır. NADPH oksidaz enzim aktivitesi artışı, ortamda bulunan LPS ile savaş için üretilen yüksek miktarda H_2O_2 oluşumuna sebep olmakta, sonuç olarak da hücresel hasar oluşmaktadır. Sepsis grubuna göre doğal antioksidanlar ve apocynin tedavisi sonrası sepsis gelişen ratların kalp dokularında TBARS miktarlarında kayda değer azalma görülmüş ve bu azalma NADPH oksidaz enziminin antioksidan tedavi sonrası ciddi oranda azalması ve CAT aktivitesinin hafifçe yükselmesi sonucu ortamdaki H_2O_2 birikiminin engellenmesi ile açıklanmıştır (147). Yaptığımız çalışmada da sepsis grubunda SOD, CAT enzim aktiviteleri ve MDA miktarlarında artış kaydedilmiş, GSH-Px enzim aktivitesinde ise anlamlı değişiklik görülmemiştir. D vitamini tedavisi sonrası sepsis oluşturulan grupta da CAT aktivitesi artışının anlamlı seviyede ve SOD/CAT oranının CAT lehine gerçekleşmesi ortamda bulunan H_2O_2 birikiminin engellenmesi ve sonucunda hücresel hasarın azalmasına yol açtığı şeklinde yorumlanabilir ve sonuçlarımız bu açıdan Ben-Shaul ve ark. yaptıkları çalışma ile uyumludur. Sepsis grubu ile D Vitamini+Sepsis grubu karşılaştırıldığında SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir değişim kaydedilmezken, CAT ise D Vitamini+Sepsis yapılan grupta anlamlı düzeyde artmıştır. Bunun sonucunda SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 'in CAT tarafından H_2O ve O_2 'e parçalanması,

D Vitamini+Sepsis grubunda daha fazla gerçekleşmektedir. TBARS miktarının da sepsis grubuna göre D Vitamini+Sepsis grubunda anlamlı düzeyde azalması D vitamininin antioksidan özellik gösterdiğini düşündürmektedir.

Zang ve ark. Sepsiste mitokondriyal hasar ve inflamatuvar cevabı inceledikleri çalışmada sepsis yapılan gruptaki ratların kalp dokularında mitokondriyal SOD ve GSH-Px enzim aktivitesinde azalma, MDA miktarında ise artma olduğunu belirtmektedirler. Bu durumu sepsisin miyokardiyal mitokondrideki antioksidan kapasiteyi azaltıp oksidatif stresin artışına katkıda bulunmasıyla açıklamışlardır (148). Yaptığımız çalışmada Sepsis grubunun kalp dokusundaki total SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir artış tespit ettik ($p=0,027$). Bu durum Zang ve ark.nın yaptıkları çalışmayla çelişmekle beraber sepsiste artan süperoksit radikallerinin etkisiyle gerçekleşmiştir. GSH-Px açısından bakıldığında ise Zang ve ark. ile benzer azalma bulmamıza rağmen bu azalma anlamlı düzeylere ulaşamamıştır ($p=0,579$). Ortamda SOD tarafından oluşturulan aşırı miktardaki H_2O_2 'i substrat olarak kullanan GSH-Px'ın yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında baskılanması ve yüksek konsantrasyonlarda CAT enzim aktivitesi artışı bu durumu açıklamaktadır.

Leon ve ark. çekal ligasyon-perforasyon yöntemiyle sepsis yapılan ratlarda hipotermimin oksidatif parametreler üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada sepsis gelişen ratların serumlarında NO ve OH radikallerinde artış tespit etmişler ve bunu sepsisin oksidatif yükü artırmasına bağlamışlardır. Kalp dokularında ise SOD ve CAT enzimlerinin sepsis olmayan gruba göre arttığını, bu artışın orantılı olmayıp CAT lehine olduğunu tespit etmişlerdir. (149). MDA'da

anlamli değişim olmadığı göz önünde bulundurulduğunda SOD/CAT imbalansının CAT lehine olması ortamda oluşan H_2O_2 'nin zararsız hale getirilmesine ve lipid peroksidasyonunun kompanze edilmesine sebep olduğu düşünölebilir. Ancak yaptığımız çalışmada sepsis grubunda SOD ve CAT enzim aktiviteleri artmasına rağmen Leon ve ark yaptıkları çalışmanın aksine SOD/CAT oranı değişmemiş ve MDA artışı görölmüşür. Bu durum oluşan oksidatif yükün artan SOD ve CAT tarafından yeterince kompanze edilemediğini, buna ek olarak artan NOS'ın etkisiyle oluşan NO ve nihayetinde de peroksinitritin doku hasarı gerçekteşirerek MDA artışına sebep olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Yapılan pek çok çalışmada Sepsiste görölen kardiyovasküler bozukluklar NO artışına bağlanmış ve NO artışından da NOS sorumlu tutulmuştur. Sepsiste meydana gelen pro-inflamatuar cevap hızlı bir şekilde NO artışını tetiklemesine rağmen ROT'lerinin lokal olarak artışı, oluşan NO'ın tüketilmesine yol açmakta ve sepsisteki dokular arası heterojeniteyi açıklamaktadır (150-153).

Cunha ve ar. Yaptıkları çalışmada LPS enjeksiyonu sonrasında sepsis gelişen farelerin plazmalarında anlamli derecede nitrit ve nitrat artışı gözlenmiştir. NOS enzim aktivitesi akciğer, dalak ve kalp dokularında incelenmiş ve tüm bu dokularda arttığı sonucuna varılmıştır. Nitrit ve Nitrat artışından NOS enzim aktivitesinin artışı sorumlu tutulmaktadır. Endotoksemi tablosunda dokuların perfüzyonunun artırılması için NO artışına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak sepsis tablosunda interferon gama'daki artış ile beraber LPS bulunması, IL 1 β ve TNF- α ile sinerjistik etki oluşturarak aşırı miktarda NOS aktivasyonuna sebep olmakta ve sonuçta da bol miktarda NO açığa çıkmaktadır (154). NO ile süperoksit

anyonunun spontan reaksiyonundan peroksinitrit açığa çıkar. Bu reaksiyon çok hızlı gerçekleşmektedir ve sadece radikallerin difüzyon kapasiteleri ile sınırlıdır. Peroksinitrit pasif difüzyon yoluyla hücrelerin içine kolayca girebilir ve birçok biyomolekülle reaksiyona girip protein, lipid ve DNA hasarı yapabilir (155). Yaptığımız çalışmada sepsis grubundaki NOS aktivitelerinin ve MDA miktarlarının SHAM grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını tespit ettik (sırasıyla $p=0,029$ ve $p=0,002$). Sepsiste artan NOS enzimi NO oluşumunu tetiklemekte ve sonuçta peroksinitrit açığa çıkarmıştır. Oluşan peroksinitrit kalp dokusunda lipid hasarı meydana getirerek MDA artışını gerçekleştirmiştir. Ayrıca histolojik incelemelerde sepsis grubunda SHAM grubuna göre artmış kapiller dilatasyon görülmesi ortamda artmış NO miktarını ve NOS enzim aktivitesini desteklemektedir.

D Vitamininin iskelet kasları üzerinde birçok biyolojik rolü olduğu bilinmektedir (156). D Vitamini eksikliği insan kaslarında atrofiye sebep olmaktadır (157). Yapılan hem in vivo hem in vitro çalışmalar D Vitamininin fizyolojik konsantrasyonlarda bulunmasının hücreleri oksidatif strese karşı koruduğunu göstermiştir (158, 159).

D Vitamininin kalp dokusundaki antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkisi ile ilgili literatür taraması yapıldığında da birbiriyle çelişen sonuçlar görmek mümkündür.

Bhat ve ark. 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada D Vitamini eksikliğinin Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) yoluyla kaslarda intraselüler protein bozunmasına yol açarak kas erimesine sebep olduğunu tespit etmişlerdir. D

Vitamini tedavisi verilen ratlarda ise UPP aktivasyonunda azalma gözlemlenmiştir (160). UPP'nin sepsis, diyabet, üremi, AIDS ve kanser gibi birçok hastalıkla da ilişkili olduğu gösterilmiştir (161).

Yine Bhat ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada ise D Vitamini eksikliği olan grupta kas hücrelerinde SOD ve CAT enzimlerinin kayda değer bir şekilde azaldığı, GSH-Px enziminin ise arttığını gözlemlenmiştir. Ayrıca kas nitrat seviyelerinin D Vitamini eksikliğinde arttığı gözlemlenmiştir. D Vitamini eksikliği olan hücrelere D vitamini verildiğinde ise SOD enziminde artış tespit edilmiştir. D Vitamini eksikliği oksidatif dengeyi bozmakta ve kas proteolizisine sebep olmaktadır (162). Yaptığımız çalışmada D vitamini verilen grupta SOD aktivitesi artışı gerçekleşmesine rağmen bu artış anlamlı seviyelerde olmamış ancak anlamlı düzeyde CAT aktivitesi artışı gerçekleşmiştir (sırasıyla $p=0,179$ ve $p=0,0047$). Bu açıdan bakıldığında SOD/CAT oranı CAT lehine gerçekleşmiş ve D vitamini antioksidan özellik göstermiştir. MDA düzeyinde SHAM grubuna göre anlamlı artışın gerçekleşmemiş olması bu durumu desteklemektedir (MDA için $p=0,279$).

Abd Allah ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada ferröz sülfat yüklemesi ile kardiyak demir birikimi yaptıkları ratların kalp dokusunda oksidatif stresin arttığını ve sonucunda da lipid peroksidasyonu ve kardiyomiyositlerde dejenerasyon olduğunu gözlemlenmiştir. Ferröz Sülfat ile birlikte verilen D Vitamininin ise serum Total Antioksidan Kapasiteyi artırdığı, Oksidatif Stres İndeksini ise azalttığını bulmuşlardır. Ancak histolojik olarak incelenen kalp dokusunda ferröz sülfat kaynaklı kardiyak dejenerasyonu anlamlı derecede

azaltmadığını bulmuşlar ve bunu da ferröz sülfatın oksidatif kapasitesinin D Vitamininin antioksidan kapasitesinin çok üzerinde olduğuna bağlamışlardır (163). Yaptığımız çalışmada sepsis durumunda oksidatif stresin ve lipid peroksidasyonunun arttığını, kardiyomiyositlerin histolojik oryantasyonlarının bozulduğunu ve bu hücrelerde miyofibril kaybının yaşandığını ve kapiller dilatasyon tespit ettik. D vitamini ile tedavi edilip sonrasında sepsis yapılan grubun histolojik görüntüleri incelendiğinde ise sadece kapiller dilatasyonun devam ettiğini, diğer tüm doku elemanlarının SHAM grubuyla özdeş özellikte olduğunu gözlemledik. Abd Allah ve ark. yaptıkları çalışmada D Vitaminini, ferröz sülfatın oksidatif etkisini tam olarak kompanze edememesine karşın çalışmamızda sepsisteki oksidan hasarı büyük ölçüde engellemiştir.

Noyan ve ark. Yaptığı çalışmada insülin tedavisi verilen diabetik ratlara yapılan D vitamini tedavisinin kalp dokusunda CAT ve SOD enzim aktivitelerini azaltırken TBARS seviyesi ve GSH-Px enzmin aktivitesinde ise anlamlı değişikliğe sebep olmadığını tespit etmişlerdir. Bu durumu lipid peroksidasyonunun değişmeyip CAT ve SOD aktivitelerinin azalması ile ortamda azalan süperoksit radikali ve hidrojen peroksit miktarına bağlamışlardır (164). Çalışmamızda ise bu çalışmanın aksine D Vitamininin SHAM grubuna göre SOD ve CAT enzim aktivitelerini artırdığını tespit ettik. Bu artışlar SOD için istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte CAT için anlamlı seviyedeydi (sırasıyla $p=0,179$ ve $p=0,0047$). Bu açıdan bakıldığında CAT lehine bir artış, H_2O_2 'nin zararsız hale getirilmesi adına önem teşkil etmektedir. SHAM grubuna göre D vitamini verilen grupta NOS aktivitesinin artışına ve GSH-Px aktivitesinin

değişmemesine rağmen MDA'da anlamlı değişikliğin gözlenmemesi D Vitamininin antioksidan özelliğini desteklemektedir (sırasıyla $p=0,045$, $p=0,944$ ve $p=0,273$). Çalışmamızda D Vitamini+Sepsis grubunda sepsis grubuna göre anlamlı düzeyde CAT aktivitesi artışı yaşanmış, MDA seviyelerinde ise anlamlı düzeyde azalma yaşanmıştır (sırasıyla $p=0,0372$ ve $p=0,02$). Ayrıca D Vitamini + NOS aktivitesinde ise bir miktar azalma olmasına rağmen bu azalma anlamlı seviyelere ulaşamamıştır $p=0,833$). CAT aktivitesi artışının daha fazla olması, H_2O_2 'nin yıkımı ile zararsız hale getirilmesini hızlandırarak lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerini azaltmıştır. Sepsis + D Vitamini grubunda MDA ve CAT arasında güçlü bir negatif korelasyon bulunması ($p= 0,042$ ve $r=-0,829$) fakat sepsis grubunda korelasyon olmaması ($p=0,957$ ve $r=-0,029$), katalazın MDA oluşumunu önlediğini desteklemektedir. Bu nedenlerle sepsis tablosunda D vitamininin antioksidan öneme sahip olduğu yorumu yapılabilir.

Assalin ve ark. D Vitamini eksikliğinin süresinin kardiyak remodelling ile ilişkisini inceledikleri çalışmada D Vitamini diyeti yaptırılan ratların kalp dokularında D Vitamini takviyesi yapılanlara göre CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin anlamlı düzeyde azaldığını tespit etmişlerdir. D Vitamini eksikliği olan ratların kalp dokularında oksidatif stres artışına bağlı apoptoz ve fibrozis indüklenmiş ve kardiyak remodelling görülmüştür (165). Yaptığımız çalışmada D Vitamini verilen grupta CAT enzim aktivitesindeki artış Assalin ve ark. teyit etmekle beraber çalışmamızda GSH-Px düzeyinde değişim olmaması ortamda bulunan H_2O_2 'nin CAT tarafından yıkılmasıyla ve ekstra GSH-Px enzim artışına

ihtiyaç duyulmamasıyla açıklanabilir. SHAM grubuna göre D vitamini grubunda ve Sepsis grubuna göre D Vitamini+Sepsis grubunda CAT seviyelerindeki anlamlı artışın gerçekleşmiş olması, H_2O_2 'nin zararlı etkilerinin önlenmesi adına, D vitamininin önemini ortaya koymaktadır (sırasıyla $p=0,0047$ vep= $0,0372$).

Wang ve ark. İsoptenerol ile miyokardiyal hasar yaptıkları rat kalp dokusunda SOD ve CAT enzim aktivitelerinin sırasıyla %18 ve %22 oranında azaldığını ancak D Vitamini uygulamasının ise bu azalmayı %16 ve %20 artırarak SHAM grubu seviyelerine getirdiğini bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre D Vitamini uygulamasının antiperoksidasyon etki ile kalp dokusunu koruduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca kalp dokusundaki hidrojen peroksit miktarlarına bakıldığında ise isoproterenol verilen ratlarda artış varken D Vitamini uygulamasında ise azalma gözlenmiştir. Anjiotensin II, Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz yolu ile ROS oluşumunu başlatmaktadır. D Vitamininin anjiotensin II'nin oluşumunu inhibe etmesi, hidrojen peroksit oluşumunun azalmasını açıklamaktadır (166). Çalışmamızda hem D vitamini verilen grupta hem de D vitamini tedavisi sonrasında Sepsis yapılan grupta SHAM grubuna göre SOD ve CAT enzim düzeylerinde artış gerçekleşmekle beraber bu artış CAT lehine gerçekleşmiştir. Bu durum, H_2O_2 eliminasyonunu artırarak ortamda H_2O_2 birikimini engellemiş ve lipid peroksidasyonunun sepsis grubuna göre azalmasını sağlamıştır. D vitamininin H_2O_2 oluşumunu Anjiotensin II oluşumunu inhibe etmesi yolu ile azalttığı da düşünülürse D vitamininin hem primer hem de sekonder olarak antioksidan bir madde özelliği gösterdiği yorumu yapılabilir.

Andrukhova ve ark. D Vitamininin NOS ve damar sertliği ile ilgisini araştırdıkları çalışmada VDR mutant farelerde düşük NOS'a bağlı azalmış NO biyoyararlanımı ve bu azalmaya bağlı endotel disfonksiyonu, damar sertliğinde artış, artmış aortik direnç, aortada yapısal remodelling ve bozulmuş sistolik ve diastolik kalp fonksiyonu bulmuşlardır. VDR sinyallerinin kaybı Renin Anjiotensin Aldosteron Sisteminden bağımsız olarak damar sertliğini artırmakta ve bu artışın sonucu olarak da sistolik ve diastolik kardiyak bozulmaya sebep olmaktadır. VDR uyarısının artması, eNOS transkripsiyonunu artırarak NO oluşumunu düzenlemektedir. Buna ek olarak D Vitamini, VDR bağımlı fosforilasyon kaskadı ile eNOS'un nongenomik aktivasyonunu sağlayarak NO sentezini artırır (167). Çalışmamızdaki bulgular da bu çalışmayı teyit eder durumda olup hem D vitamini verilen grupta hem de D Vitamini sonrasında sepsis yapılan grupta SHAM grubuna göre anlamlı düzeyde NOS aktivitesi artışı tespit edilmiştir ($p=0,045$ ve $p=0,0013$).

Reynolds ve ark. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) hastarında endotelial fonksiyon ve onarımında D vitamininin etkisini araştırdıkları çalışmada TNF- α 'nın eNOS oluşumunu downregüle ettiğini, D Vitamininin ise TNF- α Induced Protein-10 (IP-10) ekspresyonunu azaltarak eNOS oluşumunu artırdığını göstermişlerdir (168). Sepsiste TNF- α artışı gerçekleştiği göz önünde bulunduşulduğunda çalışmamızdaki sepsis grubunda NOS aktivitesi artışının anlamlı düzeyde artması Reynolds ve ark. yaptığı çalışma ile çelişmekte ancak D Vitamini verilen gruptaki NOS aktivitesi artışı ile uyumlu olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızdan, sepsis durumunda kalp dokusunda oksidatif stres artışına bağlı olarak lipid peroksidasyonu seviyelerinde yükselmelerin olduğu görülmektedir.

D vitamininin, kalp dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerini pozitif yönde indüklediği tespit edilmiştir.

D Vitamini grubunda, NOS aktivitesinde artış olmasına rağmen, lipid peroksidasyonu seviyelerinde anlamlı oranda artışın olmaması, D vitamininin, diğer antioksidan enzim aktivitelerini artırmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Sepsis grubuna göre D Vitamini + Sepsis grubunda istatistiksel anlamlı düzeydeki katalaz aktivite artışı ve lipid peroksidasyonundaki azalış; sepsisin sebep olduğu oksidatif stresi D Vitamininin azalttığını düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-54. Epub 2003/04/18.
2. 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. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303-10. Epub 2001/07/11.
3. Skirecki T, Borkowska-Zielinska U, Zlotowicz M, Hoser G. Sepsis immunopathology: perspectives of monitoring and modulation of the immune disturbances. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2012;60(2):123-35. Epub 2012/02/04.
4. 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. Epub 2012/03/21.
5. 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. Epub 1991/05/01.
6. 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. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009;55(3):215-22. Epub 2009/07/16.
7. Majno G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *The Journal of infectious diseases*. 1991;163(5):937-45. Epub 1991/05/01.
8. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Critical care clinics*. 2009;25(1):83-101, viii. Epub 2009/03/10.
9. Baron RM, Baron MJ, Perrella MA. Pathobiology of sepsis: are we still asking the same questions? *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;34(2):129-34. Epub 2006/01/20.
10. Syed, Ibrahim B. (2002). "Islamic Medicine: 1000 years ahead of its times". *Journal of the Islamic Medical Association* 2: 2–9.
11. Thurston AJ. Of blood, inflammation and gunshot wounds: the history of the control of sepsis. *The Australian and New Zealand journal of surgery*. 2000;70(12):855-61. Epub 2001/02/13.
12. Francoeur JR. Joseph Lister: surgeon scientist (1827-1912). *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2000;13(3):129-32. Epub 2000/08/10.
13. Hurlbert R. Chapter 1: a brief history of microbiology. *Microbiology* 101/102internet text [online]. 1999; Available at. <http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/Chap1.html>. Accessed December 10, 2008.
14. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use

of innovative therapies in sepsis. *Critical care medicine*. 1992;20(6):864-74. Epub 1992/06/01.

15. 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. Epub 2003/04/12.

16. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Critical care medicine*. 2001;29(7 Suppl):S109-16. Epub 2001/07/11.

17. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112(1):235-43. Epub 1997/07/01.

18. Niederman MS, Fein AM. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. *Clinics in chest medicine*. 1990;11(4):633-56. Epub 1990/12/01.

19. 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. Epub 2006/01/21.

20. Basak M, Cosansel S, Çankır Z, Keskin O, Yazgan Y, Koçak N. Sepsis, septik sok ve tedavide son yaklaşımlar. *Sendrom* 1998;10:54-61.

21. 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. Epub 2004/11/16.

22. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 2013;369(21):2063. Epub 2013/11/22.

23. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Seminars in immunology*. 1998;10(5):349-50. Epub 1998/11/04.

24. Heine H, Rietschel ET, Ulmer AJ. The biology of endotoxin. *Molecular biotechnology*. 2001;19(3):279-96. Epub 2001/11/28.

25. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91. Epub 2002/12/20.

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

27. 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. Epub 1995/03/01.

28. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7. Epub 2000/08/30.

29. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infection and immunity*. 2002;70(3):1033-41. Epub 2002/02/21.

30. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England journal of medicine*. 2003;348(2):138-50. Epub 2003/01/10.

31. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *The New England journal of medicine*. 1999;340(3):207-14. Epub 1999/01/23.

32. 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. Epub 1999/07/10.

33. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Annals of internal medicine*. 1991;115(6):457-69. Epub 1991/09/15.

34. Levy RJ. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock*. 2007;28(1):24-8. Epub 2007/05/08.
35. Rabuel C, Renaud E, Brealey D, Ratajczak P, Damy T, Alves A, et al. Human septic myopathy: induction of cyclooxygenase, heme oxygenase and activation of the ubiquitin proteolytic pathway. *Anesthesiology*. 2004;101(3):583-90. Epub 2004/08/27.
36. Doganay M. Sepsis:Yeni Tanımlar ve Patogenez. *Flora infeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 1996.
37. 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. Epub 1996/03/01.
38. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet*. 1991;338(8769):732-6. Epub 1991/09/21.
39. Rıdvan KARAALİ FT. Sepsis Patogenezi.Klinik Gelişim.2009;22(3):71-7.
40. 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. Epub 1999/08/14.
41. Sookhai S, Wang JJ, McCourt M, Kirwan W, Bouchier-Hayes D, Redmond P. A novel therapeutic strategy for attenuating neutrophil-mediated lung injury in vivo. *Annals of surgery*. 2002;235(2):285-91. Epub 2002/01/25.
42. Altinoz HC, Gokbudak R, Bayraktar A, Belli S. A pilot study of measurement of the frequency of sounds emitted by high-speed dental air turbines. *Journal of oral science*. 2001;43(3):189-92. Epub 2001/12/06.
43. Fatehi-Hassanabad Z, Furman BL, Parratt JR. The effect of endotoxin on sympathetic responses in the rat isolated perfused mesenteric bed; involvement of nitric oxide and cyclo-oxygenase products. *British journal of pharmacology*. 1995;116(8):3316-22. Epub 1995/12/01.
44. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Jr., Seo S, D'Alessandro D, et al. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation*. 1997;95(5):1122-5. Epub 1997/03/04.
45. Landow L, Andersen LW. Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 1994;38(7):626-39. Epub 1994/10/01.
46. Luce JM. Pathogenesis and management of septic shock. *Chest*. 1987;91(6):883-8. Epub 1987/06/01.
47. Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A. Endotoxin-induced organ injury. *Critical care medicine*. 1993;21(2 Suppl):S19-24. Epub 1993/02/01.
48. Hess ML, Hastillo A, Greenfield LJ. Spectrum of cardiovascular function during gram-negative sepsis. *Progress in cardiovascular diseases*. 1981;23(4):279-98. Epub 1981/01/01.
49. Neviere R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P. Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(1):218-25. Epub 2001/02/24.
50. Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM. Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans. *Circulation*. 1995;92(8):2119-26. Epub 1995/10/15.
51. Hewett JA, Schultze AE, VanCise S, Roth RA. Neutrophil depletion protects against liver injury from bacterial endotoxin. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1992;66(3):347-61. Epub 1992/03/01.

52. Tsuji C, Minhaz MU, Shioya S, Fukahori M, Tanigaki T, Nakazawa H. The importance of polymorphonuclear leukocytes in lipopolysaccharide-induced superoxide anion production and lung injury: ex vivo observation in rat lungs. *Lung*. 1998;176(1):1-13. Epub 1998/01/22.
53. Raeburn CD, Calkins CM, Zimmerman MA, Song Y, Ao L, Banerjee A, et al. ICAM-1 and VCAM-1 mediate endotoxemic myocardial dysfunction independent of neutrophil accumulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2002;283(2):R477-86. Epub 2002/07/18.
54. 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. *Critical care medicine*. 2008;36(1):296-327. Epub 2007/12/26.
55. 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. Epub 1992/09/01.
56. 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. Epub 2011/06/28.
57. REINHARDT RLHATA. Vitamin D Metabolism. Brown University, Department of Chemistry, Providence, Rhode Island.
58. 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. Epub 2012/09/26.
59. 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. Epub 2012/06/06.
60. Bikle DD. Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010;21(6):375-84. Epub 2010/02/13.
61. Behzat Özkan HD. D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2011;54(2):99-119.
62. David Feldman PJM, Aruna V. Krishnan, and Eva Balint. Vitamin D: Biology, Action, and Clinical Implications 2008.
63. Holick MF. Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. *Southern medical journal*. 2005;98(10):1024-7. Epub 2005/11/22.
64. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(6 Suppl):1689S-96S. Epub 2004/12/09.
65. 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. Epub 2010/03/17.
66. 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. Epub 2011/07/23.

67. 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. Epub 2012/02/07.
68. 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. Epub 2009/01/28.
69. Grant WB. Solar ultraviolet-B irradiance and vitamin D may reduce the risk of septicemia. *Dermato-endocrinology*. 2009;1(1):37-42. Epub 2010/01/05.
70. 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. Epub 2007/07/28.
71. 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. Epub 2001/03/15.
72. 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. Epub 2005/12/22.
73. 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. Epub 2007/11/01.
74. 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. Epub 2006/05/04.
75. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(9):684-700. Epub 2007/08/28.
76. 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. Epub 2007/06/09.
77. van den Bemd GJ, Pols HA, van Leeuwen JP. Anti-tumor effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and vitamin D analogs. *Current pharmaceutical design*. 2000;6(7):717-32. Epub 2000/06/01.
78. Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2011;51:311-36. Epub 2010/10/13.
79. Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(2):327-31. Epub 2003/01/10.
80. Park CW, Oh YS, Shin YS, Kim CM, Kim YS, Kim SY, et al. Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1999;33(1):73-81. Epub 1999/01/23.
81. Krause R, Buhring M, Hopfenmuller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure. *Lancet*. 1998;352(9129):709-10. Epub 1998/09/05.

82. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation*. 1997;96(6):1755-60. Epub 1997/10/10.
83. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(8):978-83. Epub 1996/08/01.
84. Zittermann A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2006;92(1):39-48. Epub 2006/04/08.
85. Mathieu C, van Etten E, Decallonne B, Guilletti A, Gysemans C, Bouillon R, et al. Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ as modulators in the immune system. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2004;89-90(1-5):449-52. Epub 2004/07/01.
86. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs as immunomodulatory agents. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(4):174-9. Epub 2002/04/03.
87. Sooy K, Schermerhorn T, Noda M, Surana M, Rhoten WB, Meyer M, et al. Calbindin-D(28k) controls [Ca(2+)](i) and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(48):34343-9. Epub 1999/11/24.
88. Gregori S, Giarratana N, Smirolto S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2002;51(5):1367-74. Epub 2002/04/30.
89. Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D₃. *Diabetologia*. 1994;37(6):552-8. Epub 1994/06/01.
90. Hyponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001;358(9292):1500-3. Epub 2001/11/14.
91. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah JM, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K, et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes*. 2002;51(7):2294-300. Epub 2002/06/28.
92. Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism: clinical and experimental*. 2002;51(3):356-9. Epub 2002/03/12.
93. Tai K, Need AG, Horowitz M, Chapman IM. Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. *Nutrition*. 2008;24(3):279-85. Epub 2008/01/12.
94. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):820-5. Epub 2004/04/29.
95. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D₃ on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *International journal of clinical practice*. 2003;57(4):258-61. Epub 2003/06/13.

96. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of epidemiology*. 2009;19(2):73-8. Epub 2008/03/11.
97. 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. Epub 2011/06/08.
98. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clinic proceedings*. 2006;81(3):353-73. Epub 2006/03/15.
99. Ankara Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesine Başvuran Hastalarda 25-OH Vitamin D Düzeyleri. Uçar F., Taşlıpınar, M., Soydaş, A. *Eur J Basic Med Sci* 2012;2(1):12-15.
100. 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. Epub 1993/01/01.
101. Akkus İ. Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri. Konya: Mimoza Basım, 1995.
102. 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. Epub 1991/09/30.
103. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Annals of internal medicine*. 1980;93(3):480-9. Epub 1980/09/01.
104. Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. Güzin Özelçi Kavas. *Türkiye Klinikleri*. 1989;9(1).
105. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic proceedings*. 1988;63(4):381-9. Epub 1988/04/01.
106. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *The American journal of medicine*. 1991;91(3C):23S-30S. Epub 1991/09/30.
107. Champe P.C, Harvey R.A. Lippincot's illustrated reviews: Biochemistry second edition, J B Lippincot Company, Philadelphia. 1994.
108. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*. 1994;74(1):139-62. Epub 1994/01/01.
109. 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. Epub 1982/11/01.
110. Aksoy Y. Antioksidan Mekanizmada Glutasyonun Rolü. *T Klin J Med Sci* 2002; 22: 442-448.
111. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic. Res.* 1996;25:439-54.
112. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American journal of medicine*. 1991;91(3C):2S-13S.
113. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants in nutrition, health and disease. 1st ed. New York. Oxford University Press, 1994.
114. Kılınç K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. *Biyokimya Dergisi* 1986; 11: 59-76.
115. Turrens J.F. *Comprehensive Toxicology*, second edition, Volume 4. p 219-229, 2010 Available from URL: <http://store.elsevier.com/Comprehensive-Toxicology/isbn-9780080468846/>.

116. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
117. C.Andersson, M. Soderstrom, B. Mannervik. J. Biochem.. 1988, 249, 819-823.
118. BOYER, T.D.The Glutathione S-transferases:An Update Hepatology, 9 (3),486-96.
119. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. The American journal of medicine. 1991;91(3C):2S-13S. Epub 1991/09/30.
120. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. The American journal of medicine. 1994;97(3A):5S-13S; discussion 22S-8S. Epub 1994/09/26.
121. Saedisomeolia A, Taheri E, Djalali M, Djazayeri A, Qorbani M, Rajab A, et al. Vitamin D status and its association with antioxidant profiles in diabetic patients: A cross-sectional study in Iran. Indian journal of medical sciences. 2013;67(1-2):29-37. Epub 2013/11/02.
122. Asemi Z, Samimi M, Tabassi Z, Shakeri H, Esmailzadeh A. Vitamin D supplementation affects serum high-sensitivity C-reactive protein, insulin resistance, and biomarkers of oxidative stress in pregnant women. The Journal of nutrition. 2013;143(9):1432-8. Epub 2013/07/26.
123. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Ayadi F, Garmazi F, Mezgenni N, et al. Inhibitory effects of 1alpha, 25dihydroxyvitamin D3 and Ajuga iva extract on oxidative stress, toxicity and hypo-fertility in diabetic rat testes. Journal of physiology and biochemistry. 2008;64(3):231-9. Epub 2009/02/28.
124. 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. Epub 2008/02/23.
125. Izquierdo MJ, Cavia M, Muniz P, de Francisco AL, Arias M, Santos J, et al. Paricalcitol reduces oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. BMC nephrology. 2012;13:159. Epub 2012/11/29.
126. Tukaj S, Trzonkowski P, Tukaj C. Regulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on vascular smooth muscle cells. Acta biochimica Polonica. 2012;59(3):395-400. Epub 2012/08/23.
127. 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. Epub 2010/01/01.
128. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague--Dawley rats. International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition. 1996;66(1):39-45. Epub 1996/01/01.
129. Nemere I, Wilson C, Jensen W, Steinbeck M, Rohe B, Farach-Carson MC. Mechanism of 24,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of rapid, 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced responses: role of reactive oxygen species. Journal of cellular biochemistry. 2006;99(6):1572-81. Epub 2006/07/04.
130. Hur E, Garip A, Camyar A, Ilgun S, Ozisik M, Tuna S, et al. The effects of vitamin d on gentamicin-induced acute kidney injury in experimental rat model. International journal of endocrinology. 2013;2013:313528. Epub 2013/07/12.

131. Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;437(1):7-11. Epub 2013/06/19.
132. 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. Epub 2001/03/14.
133. Somjen D, Katzburg S, Grafi-Cohen M, Knoll E, Sharon O, Posner GH. Vitamin D metabolites and analogs induce lipoxygenase mRNA expression and activity as well as reactive oxygen species (ROS) production in human bone cell line. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;123(1-2):85-9. Epub 2010/11/30.
134. 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. Epub 2011/03/23.
135. 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. Epub 2011/08/23.
136. 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. Epub 1951/11/01.
137. 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. Epub 1996/01/01.
138. 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. Epub 1967/07/01.
139. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6. Epub 1984/01/01.
140. Durak I, Kavutcu M, Kacmaz M, Avci A, Horasanli E, Dikmen B, et al. Effects of isoflurane on nitric oxide metabolism and oxidant status of guinea pig myocardium. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2001;45(1):119-22. Epub 2001/01/11.
141. Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J, Jr., Johnson CP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *The Journal of surgical research*. 1993;55(5):553-8. Epub 1993/11/01.
142. Niederbichler AD, Westfall MV, Su GL, Donnerberg J, Usman A, Vogt PM, et al. Cardiomyocyte function after burn injury and lipopolysaccharide exposure: single-cell contraction analysis and cytokine secretion profile. *Shock*. 2006;25(2):176-83. Epub 2006/03/10.
143. Turdi S, Han X, Huff AF, Roe ND, Hu N, Gao F, et al. Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. *Free radical biology & medicine*. 2012;53(6):1327-38. Epub 2012/08/21.
144. Obal D, Dai S, Keith R, Dimova N, Kingery J, Zheng YT, et al. Cardiomyocyte-restricted overexpression of extracellular superoxide dismutase increases nitric oxide

- bioavailability and reduces infarct size after ischemia/reperfusion. *Basic research in cardiology*. 2012;107(6):305. Epub 2012/10/27.
145. Rozenberg S, Besse S, Brisson H, Jozefowicz E, Kandoussi A, Mebazaa A, et al. Endotoxin-induced myocardial dysfunction in senescent rats. *Crit Care*. 2006;10(4):R124. Epub 2006/09/01.
 146. Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive care medicine*. 2003;29(10):1782-9. Epub 2003/06/05.
 147. Ben-Shaul V, Lomnitski L, Nyska A, Zurovsky Y, Bergman M, Grossman S. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicology letters*. 2001;123(1):1-10. Epub 2001/08/22.
 148. Zang Q, Maass DL, Tsai SJ, Horton JW. Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis. *Surgical infections*. 2007;8(1):41-54. Epub 2007/03/27.
 149. Leon K, Moisan C, Amerand A, Poupon G, L'Her E. Effect of induced mild hypothermia on two pro-inflammatory cytokines and oxidative parameters during experimental acute sepsis. *Redox report : communications in free radical research*. 2013;18(3):120-6. Epub 2013/06/12.
 150. Trzeciak S, Cinel I, Phillip Dellinger R, Shapiro NI, Arnold RC, Parrillo JE, et al. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*. 2008;15(5):399-413. Epub 2008/04/29.
 151. Cauwels A, Brouckaert P. Nitrite regulation of shock. *Cardiovascular research*. 2011;89(3):553-9. Epub 2010/10/05.
 152. Hollenberg SM, Broussard M, Osman J, Parrillo JE. Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circulation research*. 2000;86(7):774-8. Epub 2000/04/14.
 153. Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(6):773-5. Epub 2003/02/15.
 154. Cunha FQ, Assreuy J, Moss DW, Rees D, Leal LM, Moncada S, et al. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF-alpha and IL-1-beta. *Immunology*. 1994;81(2):211-5. Epub 1994/02/01.
 155. Liaudet L, Rosenblatt-Velin N, Pacher P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock. *Current vascular pharmacology*. 2013;11(2):196-207. Epub 2013/03/20.
 156. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *The New England journal of medicine*. 1989;320(15):980-91. Epub 1989/04/13.
 157. Visser M, Deeg DJ, Lips P. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(12):5766-72. Epub 2003/12/13.

158. Buck M, Chojkier M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *The EMBO journal*. 1996;15(8):1753-65. Epub 1996/04/15.
159. Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free radical biology & medicine*. 2001;31(11):1405-16. Epub 2001/12/01.
160. Bhat M, Kalam R, Qadri SS, Madabushi S, Ismail A. Vitamin D deficiency-induced muscle wasting occurs through the ubiquitin proteasome pathway and is partially corrected by calcium in male rats. *Endocrinology*. 2013;154(11):4018-29. Epub 2013/08/10.
161. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *The Journal of nutrition*. 1999;129(1S Suppl):227S-37S. Epub 1999/01/23.
162. Bhat M, Ismail A. Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;152:171-9. Epub 2015/06/07.
163. Abd Allah ES, Ahmed MA, Abdel Mola AF. Comparative study of the effect of verapamil and vitamin D on iron overload-induced oxidative stress and cardiac structural changes in adult male rats. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*. 2014;21(4):293-300. Epub 2014/08/06.
164. 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. Epub 2005/06/02.
165. Assalin HB, Rafacho BP, dos Santos PP, Ardisson LP, Roscani MG, Chiuso-Minicucci F, et al. Impact of the length of vitamin D deficiency on cardiac remodeling. *Circulation Heart failure*. 2013;6(4):809-16. Epub 2013/05/28.
166. Wang X, Zhu Y, Yang Y, Cheng S. Cardioprotective effect of calcitriol on myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2013;18(4):386-91. Epub 2013/03/30.
167. Andrukhova O, Slavic S, Zeitz U, Riesen SC, Heppelmann MS, Ambrisko TD, et al. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol Endocrinol*. 2014;28(1):53-64. Epub 2013/11/29.
168. Reynolds J, Ray D, Alexander MY, Bruce I. Role of vitamin D in endothelial function and endothelial repair in clinically stable systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2015;385 Suppl 1:S83. Epub 2015/08/28.

8. ÖZET

LİPOPOLİSAKKARİT İLE SEPSİS OLUŞTURULAN RATLARIN KALP DOKULARINDA SERBEST RADİKAL METABOLİZMASININ İNCELENMESİ; D VİTAMİNİNİN ETKİSİ

Sepsiste enfeksiyon ajanları ile uyarım sonucu proinflamatuvar sitokinlerin salınımı artmaktadır. Salınan proinflamatuvar mediyatörler serbest radikal oluşumunu tetiklemekte, oluşan serbest radikaller de oksidatif strese neden olmaktadır. Endotoksik şok tablosunun oksidatif stresle beraber seyretmesi de sepsis tablosunu ağırlaştırmaktadır.

D Vitamininin ise antioksidan enzimleri artırarak oksidatif stresi azalttığı kaydedilmiştir.

Çalışmamızda, deneysel sepsis oluşturulmuş ratların kalp dokularında serbest radikal metabolizmasını ve bu metabolizma üzerine D Vitamininin etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada ağırlıkları yaklaşık 250-350 gr olan 24 adet dişi wistar albino rat kullanıldı. Ratlar SHAM grubu, sepsis grubu, D vitamini grubu, sepsis + D vitamini 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 kalp dokularındaki serbest radikal enzimleri ve lipid peroksidasyonu seviyeleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Sepsis grubunda SOD, CAT ve NOS enzim aktiviteleriyle beraber lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA'da artış tespit edildi (sırasıyla $p=0,027$; $p=0,0488$; $p=0,029$ ve $p=0,002$). D vitamini grubunda bir miktar SOD enzim aktivite artışı olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,179$). Buna karşın istatistiksel olarak anlamlı CAT aktivite artışı görüldü ($p=0,0047$). Bu grupta lipid peroksidasyonu seviyelerinin göstergesi olan MDA'nın artışı da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,273$). D Vitamini + Sepsis grubunda ise Sepsis grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı CAT aktivite artışıyla beraber MDA'da istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi (sırasıyla $p=0,0372$ ve $p=0,02$).

Bu sonuçlardan da anlaşılmaktadır ki sepsis tablosunda kalp dokusunda antioksidan enzimlerin artışı yetersiz kalmakta ve lipid peroksidasyonu artmaktadır. Sepsiste D vitamininin kullanılması ise kalpte antioksidan enzimlerin aktivitelerinin artışı sağlayıp ve lipid peroksidasyonu seviyesini düşürebilir.

9. SUMMARY

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

Sepsis is a common cause of morbidity and mortality in the intensive care unit. As a result of stimulation with infectious agent, proinflammatory cytokines increase in sepsis. Secreted proinflammatory mediators triggers the formation of free radicals and oxidative stress. Endotoxin shock, along with oxidative stress, exacerbates sepsis.

On the other hand vitamin D increases the activity of antioxidant enzymes and reduces oxidative stress.

We aimed to investigate the free radical metabolism and the effect of vitamin D on free radical metabolism in heart tissue of rats which are experimental sepsis model.

24 female wistar albino rats (weight 250-350 g.) were divided into 4 groups randomly. 1) SHAM , 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. 25(OH) Vitamin D₃ was given 2 mg/kg dose via gavage (in sunflower oil) for 3 days. Rectal body temperature was measured in rats. Antioxydant enzymes and lipid peroxidation levels in rats' heart tissue were measured by spectrophotometry. Additionally rat heart tissues were analysed histopathologically.

SOD, CAT and NOS enzyme activity and MDA level was significantly higher in the Sepsis Group than SHAM Group (respectively $p=0,027$; $p=0,0488$; $p=0,029$ ve $p=0,002$). CAT enzyme activity was significantly higher in the Vitamin D group than SHAM group ($p=0,0047$). CAT enzyme activity was significantly higher and MDA was significantly lower in the Vitamin D+ Sepsis Group than Sepsis Group (respectively $p=0,0372$ ve $p=0,02$).

It is also understood from these results that increase of antioxidant enzymes activity is insufficient and lipid peroxidation increases in sepsis. Vitamin D treatment in sepsis can provide an increase of antioxidant enzyme activities and may reduce the level of lipid peroxidation in heart tissue.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Murat

Soyadı: KOCABIYIK

Doğum Yeri: SENİRKENT

Doğum Tarihi: 01.01.1985

e-mail : kcbyx@hotmail.com

Görev/ Unvan: Tıp Doktoru / Araş. Gör. Dr.

Eğitimi: 1991-1996 Yedişehitler İlköğretim Okulu

1996-2000 Isparta Anadolu Lisesi

2000-2003 Isparta Süleyman Demirel Fen Lisesi

2003-2009 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

2011-Halen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi

Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Eğitimi

Yabancı Dili: İngilizce

İş Deneyimi: 2009-2011 Senirkent Toplum Sağlığı Merkezi Sorumlu

Hekimi

2011- Halen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi

Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Doktor

Yurt Dışı Deneyimi: Eylül-Aralık 2014 Erasmus Değişim Programı

Kapsamında Wellcome Trust Center for Mitochondrial Research, Newcastle

University, Newcastle upon Tyne, Birleşik Krallık

Üyesi Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği

Türk Klinik Biyokimya Derneği

Türk Biyokimya Derneği

Aldığı Akademik Görevler

1. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mezuniyet Sonrası Eğitim Kurulu
Tıpta Uzmanlık Öğrencileri Temsilciliği. Aralık 2012 – Aralık 2015

Bilimsel Etkinlikleri:

Yurt dışı yayınlar:

1. Arhan M, Yilmaz H, Onal IK, Kocabiyik M, Erdal H, Ibis M. DR-70 as a novel diagnostic biomarker for gastric cancer. The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology. 2015;26(6):480-3. Epub 2015/11/18.
2. Cengiz M, Ozenirler S, Kocabiyik M. Serum beta-trophin level as a new marker for noninvasive assessment of nonalcoholic fatty liver disease and liver fibrosis. European journal of gastroenterology & hepatology. 2016;28(1):57-63. Epub 2015/10/30.

Ulusal Kongrelerdeki Poster Sunumları:

1. Gülbahar Ö, Çıracı MZ, Gönül İl, 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
2. 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
3. Gülbahar Ö, Kocabıyık M, Çıracı MZ, Demirtaş C, Elbeg Ş, Paşaoğlu H. Aynı Laboratuvarda Bulunan Aynı Marka ve Model 3 Farklı Cihazın Performanslarının Süreç Sigma Değerleri Kullanılarak Kıyaslanması. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 9. Ulusal Kongresi. 24-28 Eylül 2013 / Antalya
4. Köklü H, Karakan T, Ekinci Ö, Yüksel O, Kocabıyık M, Şakalar T, Civelek R, Çınar H. Helikobakter Piloninin Kan Lipid Düzeyleri Üzerine Etkisi. XV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 23-26 Nisan 2015 /Fethiye
5. Gülbahar Ö, Çingirt M, Şen B, Kocabıyık M, Demirtaş C, Elbeg Ş. FT3, FT4, TSH Hasta Sonuçları Kullanılarak İki Farklı İmmünassay Cihazın Karşılaştırılması. XV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 23-26 Nisan 2015 /Fethiye
6. Demirtaş C, Sen B, Kocabıyık M, Elbeg S, Gülbahar Ö. Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi Cihazının Performansının Değerlendirilmesi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi 3-6 Kasım 2015

Uluslararası Kongrelerdeki Poster Sunumları

1. 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
2. Gucl F, Kocabiyik M, Demirtas C. Determination of Process Sigma Value for Vitros Fusion Clinical Chemistry Autoanalyser. 22th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Wordlab 2014). 22-26 Haziran 2014 İstanbul, TÜRKİYE
3. Gulbahar O, Kocabiyik M, Zorlu E, Sen B, Cingirt M, Demirtas C, Elbeg S. Comparison of Analytic Performance for Two Urinalysis Systems. 22th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Wordlab 2014). 22-26 Haziran 2014 İstanbul, TÜRKİYE
4. Gulbahar O, Zorlu E, Kocabiyik M, Sen B, Cingirt M, Demirtas C, Elbeg S. Verification of Performance for Precision and Trueness for Cardiac Biomarkers. . 22th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Wordlab 2014). 22-26 Haziran 2014 İstanbul, TÜRKİYE
5. Demirtas CY, Kocabiyik M, Gucl F, Elbeg S, Gulbahar O. Performance Evaluation of Olympus AU2700 Plus by Six-Sigma Using Three Different Internal Quality Control Materials. AACC 2014 Annual Meeting and Clinical Lab Expo. 27-31 Temmuz 2014. Chicago, USA

6. Koklu H, Karakan T, Ekinci O, Yüksel O, Kocabiyik M, Sakalar T, Civelek R, Cinar H. The effect of Helicobacter Pylori on serum lipid profile. 40th Congress of the Federation of the European Biochemical. 4-9 Temmuz 2015 Berlin/ ALMANYA

Katıldığı Ulusal Kongreler:

1. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 8. Ulusal Kongresi. 18-22 Eylül 2012 / Bodrum
2. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 9. Ulusal Kongresi. 24-28 Eylül 2013 / Antalya
3. XV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 23-26 Nisan 2015 /Fethiye

Katıldığı Uluslararası Kongreler

1. 20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 19-23 Mayıs 2013 Milano/İTALYA
2. 22th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Wordlab 2014). 22-26 Haziran 2014 İstanbul/TÜRKİYE
3. 40th Congress of the Federation of the European Biochemical. 4-9 Temmuz 2015 Berlin/ ALMANYA

Katıldığı Kurslar:

1. Türk Biyokimya Derneği, Kalite Kılavuzları Temelinde Laboratuvar Hesaplamaları ve Değerlendirmeleri Kursu, 11-12 Mayıs 2012 / Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara
2. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, Bilimsel Araştırmalarda Temel İlkeler Sağlık Bilimlerinde SPSS Kullanım Kursu, 18-22 Eylül 2012 / Bodrum
3. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi, XII. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu. 10-20 Aralık 2012 / Ankara
4. Türk Klinik Biyokimya Derneği, Klinik Laboratuvarlarda LC-MS/MS Deneyimleri Paylaşımı ve LC-MS/MS Uygulamaları Kursu. 10-11 Nisan 2015 / Ankara
5. Türk Klinik Biyokimya Derneği, Klinik Laboratuvarlarda Moleküler Teknikler Kursu. 23 Nisan 2015 / Fethiye

Katıldığı Sempozyumlar

1. Türk Biyokimya Derneği, Hasta ve Çalışan Güvenliği Sempozyumu, 11 Mayıs 2013 / Ankara

Aldığı Ödüller

1. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 8. Ulusal Kongresi Poster
Ödülü. 18-22 Eylül 2012 / Bodrum
2. Türk Biyokimya Derneği 27. Ulusal Biyokimya Kongresi Poster
Ödülü 3-6 Kasım 2015