

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALPAİN İNHİBİTÖRÜ OLAN AK295' İN SIÇANLARDA RENAL
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA KASPAZ 3' E OLAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MAHMUT BİNEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA

HAZİRAN 2011

Tezin Başlığı: Kalpain İnhibitörü olan AK295' in sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon hasarında Kaspaz-3' e olan etkisinin araştırılması

Tezi Hazırlayan: Mahmut BİNEN

Sınav Tarihi: 30.06.2011

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet Ümit ERDEMLİ

Yrd. Doç. Dr. Songül AYDEMİR

Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “ Kalpain İnhibitörü Olan AK295’in Sıçanlarda Renal İskemi-Reperfüzyon Hasarında Kaspaz 3’e Olan Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Mahmut BİNEN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALPAİN İNHİBİTÖRÜ OLAN AK295'İN SIÇANLARDA RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA KASPAZ 3'E OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mahmut BİNEN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

67+vii sayfa

2011

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Songül Aydemir

Kalpainler (Kalsiyumda aktive olan proteazlar) onarılamayacak derecede hasar görmüş hücrelerin hücre iskeletinin parçalanmasından sorumludur. Ayrıca kalpainlerin hücre iskeletinin şekillendirilmesinde ve subletal aksonal membran hasarını onarmayı kolaylaştırma gibi ek görevleri de vardır. Kalpainler, nekroz ve apoptoz gibi hücre ölümü ile sonuçlanan olaylarda kaspazlarla da ortak görevler yüklenebilirler. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda sıçan omurilik travma modellerinde kalpain inhibitörlerinin apoptozu yavaşlattığı veya durdurduğu, DNA fragmentasyon analizleri ile gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda oluşturulan deneysel böbrek iskemi-reperfüzyon modelinde bir kalpain inhibitörü olan AK295' i kaspaz-3 enzimi üzerindeki etkisini incelemektir.

28 adet erkek Wistar albino sıçan rasgele seçimle 4 gruba ayrıldı (n=7). Grup I (Kontrol grubu), Grup II (İskemi –reperfüzyon grubu), Grup III (İskemi –reperfüzyon + AK295 grubu) ve Grup IV (İskemi –reperfüzyon + DMSO grubu) olmak üzere 4 grup düzenlendi. Ksilazin (5 mg/kg) ve ketamin (75 mg/kg) anestezisi altında Grup I dışındaki sıçanlara sağ böbrek nefrektomisi uygulandı. Geri dönüşümlü genel anestezi altındaki sıçanlarda, 30 dakika total iskemi oluşturuldu. 24 saatlik reperfüzyon periyodu tamamlandıktan sonra yüksek doz anestezi uygulandı. Deney sonunda bütün gruplardan kan örnekleri (5cc) ve böbrek dokuları hızla alındı. Yaptığımız çalışmada böbrek dokularında aktif kaspaz 3 enzimi Western Blot tekniği ile bakıldı. Ayrıca serum kreatin ve üre değerleri, böbrek malondialdehit miktarı, hücresel antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerindeki önemli değişiklikler araştırıldı.

Çalışma sonunda kalpain inhibitörü AK295' in böbrek iskemi reperfüzyon hasarında apoptozu kısmen engelleyerek böbrek hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: AK295, Böbrek, İskemi-Reperfüzyon, Kaspaz 3

ABSTRACT

Master Thesis

AN INVESTIGATION ON THE EFFECTS OF THE CALPAIN INHIBITOR AK295 ON CASPASE 3 IN RENAL ISCHEMIA REPERFUSION DAMAGE IN RATS

Mahmut BİNEN

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

67+vii pages

2011

Supervisor: Assist. Prof. Songül AYDEMİR (PhD)

Calpains (Calcium activated proteases) are responsible for degradation of the cytoskeleton of the cells that are damaged irreparably. Calpains also have additional tasks such as facilitating the repair in forming the cytoskeleton and in sublethal axonal membrane damages. Calpains may take on common tasks with caspases in the cases such as necrosis and apoptosis that result in cell death. In the experimental studies done in recent years, it has been indicated by DNA fragmentation analyses that the calpain inhibitors slow down or stop apoptosis in the spinal cord trauma models in rats. Purpose of this study was to investigate the effect of AK295, which is a calpain inhibitor, on caspase-3 enzyme via an experimental kidney ischemia-reperfusion model generated on rats.

28 male Wistar Albino rats were divided into 4 random groups (n=7). These 4 groups were Group I (Control Group), Group II (Ischemia-reperfusion group), Group III (Ischemia-reperfusion + AK295 group), and Group IV (Ischemia-reperfusion + DMSO group). Right kidney nephrectomy under anesthesia of xylazine (5 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg) was performed to the rats except for Group I. The rats under reversible general anesthesia underwent 30-minute total ischemia. At the end of the test, blood samples (5 cc) and kidney tissues were taken from all the groups rapidly. Caspase 3 enzyme activity was detected in the kidney tissues by Western-Blot technique. Serum creatine and urea values, amount of kidney malondialdehyde, and changes in the cellular antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase were also analyzed.

As a result of the study, it was found that the calpain inhibitor AK295 partially inhibited apoptosis in kidney damage by ischemia-reperfusion, and had a protective effect against kidney damage.

Key Words: AK295, Kidney, Ischemia-Reperfusion, Caspase 3

TEŞEKKÜR

Biyoloji Bölüm Başkanlığına,

Eğitimimdeki katkılarından dolayı bölümdeki bütün hocalarıma,

Yüksek Lisans eğitimim sürecinde bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Songül AYDEMİR' e,

Bu tezin ortaya çıkmasında gerekli tüm teknik ve kimyasal malzeme desteğini esirgemeyen Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Nihat DİLSİZ' e,

Tez çalışmamın uygulama aşamasında benden bilgilerini, deneyimlerini, yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Hakan PARLAKPINAR' a,

Kalpain İnhibitörü Olan AK295' in Sıçanlarda Renal İskemi-Reperfüzyon Hasarında Kaspaz 3'e Olan Etkisinin Araştırılması (BAP 2009/48) konulu projemizi destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne,

Bu vesile ile yaşamım boyunca benden desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olduklarını bildiğim başta babam Yalçın BİNEN' e ve aileme,

minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı	2
1.2. Apoptoz.....	3
1.2.1. Apoptoz Mekanizmaları.....	4
1.2.2. Apoptoz ve Nekroz.....	7
1.2.3. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	8
1.2.4. Apoptozun Genetik Kontrolü.....	10
1.3. Kaspazlar.....	12
1.4. Kaspaz ve Kalpainlerin Apoptozdaki Rollerini.....	15
1.5. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	16
1.6. Kalpainler	17
1.6.1. Kalpainler ve Kalpastatin	20
1.6.2. Kalpain Aktivasyonunun Düzenlenmesi	22
1.6.3. Kalpain İnhibitörleri.....	23
1.7. Serbest Radikaller.....	25
1.8. Serbest Radikallerin Biyolojik Önemi.....	26
1.9. Antioksidanlar.....	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	35
3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....	35
3.2. Anestezi.....	36
3.3. İskemi Reperfüzyon Oluşturulması	36
3.4. AK295 Uygulanması.....	36
3.5. Western Blot Çalışması.....	36
3.6. Böbrek Doku Enzim Analizleri	38
3.6.1. SOD Aktivite Tayini.....	38
3.6.2. Katalaz Aktivite Tayini	39
3.6.3. MDA Analizi.....	40
3.7. Serum Biyokimya Analizleri.....	41
3.8. İstatistiksel Analiz.....	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
4.1. Western Blot Sonuçları.....	42
4.2. Böbrek Doku Enzim Sonuçları.....	43
4.2.1. Doku SOD Değerleri.....	43
4.2.2. Doku Katalaz Değerleri.....	44
4.2.3. Doku MDA Değerleri.....	45
4.3. Serum Üre ve Kreatinin Sonuçları	45
4.3.1. Üre Değerleri.....	46
4.3.2. Kreatinin Değerleri.....	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
6. KAYNAKLAR.....	54
7. ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Mitokondri/Sitokrom-c Aracılı Apoptoz Oluşturulması.....	4
Şekil 1.2.	Apoptozom.....	5
Şekil 1.3.	Mitokondri/Sitokrom-c Aracılı Apoptoz Oluşturulması.....	6
Şekil 1.4.	Apoptik ve Nekrotik Hücre Ölümünün Karşılaştırılması.....	8
Şekil 1.5.	Apoptozun Düzenlenmesi.....	12
Şekil 1.6.	Kaspazların Sınıflandırılması.....	14
Şekil 1.7.	Kaspaz Akış Döngüsü.....	15
Şekil 1.8.	Kalpain ve Kaspazların Apoptozdaki Rollerini.....	15
Şekil 1.9.	Tipik ve Atipik Kalpainler.....	19
Şekil 1.10.	Kalpainin Yapısı ve Kalsiyum ile İlişkisi.....	21
Şekil 1.11.	Kalpainin Şematik Yapısı.....	21
Şekil 1.12.	Kalpain İnhibitörleri.....	24
Şekil 1.13.	AK295.....	25
Şekil 1.14.	Hücrede SOR Oluşum Yolları.....	27
Şekil 4.1.	Western Blot Yöntemi ile Elde Edilen Kaspaz-3' ün Görüntüsü...	42
Şekil 4.2.	Ortalama SOD Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı.....	44
Şekil 4.3.	Ortalama Katalaz Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı.....	44
Şekil 4.4.	Ortalama MDA Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı.....	45
Şekil 4.5.	Ortalama BUN (Üre) Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı.....	46
Şekil 4.6.	Ortalama Kreatinin Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Apoptoz Mekanizmaları.....	4
Çizelge 1.2	Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	17
Çizelge 1.3	Kalpainlerin Sınıflandırılması ve Hastalıklarla İlişkisi.....	18
Çizelge 1.4	Oksidatif Stres ile Meydana Gelen Serbest Oksijen Radikalleri...	28
Çizelge 1.5	Antioksidan Savunma Sistemleri.....	29
Çizelge 4.1	Grupların Jeldeki Sıralaması.....	42
Çizelge 4.2	Böbrek Doku Enzim Sonuçları.....	43
Çizelge 4.3	Serum BUN ve Kreatinin Sonuçları.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

APAF-1	Apoptik proteazı etkinleştiren faktör
CAT	Katalaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ER	Endoplazmik retikulum
FADD	Fas bağımlı ölüm domain proteini
GR	Glutasyon redüktaz
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IAP	Apoptoz inhibitör proteini
ICE	İnterlökin 1β dönüştürücü enzim
İ	İskemi
İ/R	İskemi-Reperfüzyon
kDa	Kilodalton
MDA	Malondialdehit
NO	Nitrik oksit
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH [·]	Hidroksil radikali
OONO ⁻	Peroksinitrit radikali
p-53	Pro-apoptik protein
PIDD	p53 uyarıcı protein
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
R	Reperfüzyon
RNT	Reaktif nitrojen türevleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
XO	Ksantin oksidaz

1. GİRİŞ

Bir doku veya organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücresele ölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasının yeniden başlamasıdır [1,2,3,4,5].

Reaktif oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşı hücrede çok sayıda koruyucu enzim görev alır ve antioksidan maddeler ile radikal hasarlar azaltılır. Vücuttaki antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge oluşturmaktadır [1,2]. Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir [1,2,5].

Tüm organ ameliyatlarında olduğu gibi renal cerrahi girişimlerde de iskemi-reperfüzyon (İ/R) kaçınılmazdır. Böbrek iskemisi; böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi çeşitli klinik durumlarda görülür. Reperfüzyon sonrası ortama gelen nötrofiller ve bunlardan açığa çıkan mediatörlerin etkileri de eklenince organ veya doku ölümü kaçınılmaz olmaktadır [1,4,5].

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptoz). Apoptoz, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar [6]. Apoptik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu olay ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir [7].

Kaspazlar apoptik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresele ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir [8]. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. Böylece bir kaskad (şelale) şeklinde işlerler. Apoptoz hücreyi parçalayan yani apoptik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler sonucu ortaya çıkar [9].

Son zamanlarda ilginin giderek arttığı bir başka enzim grubu da kalpainlerdir. Kalpainler (Kalsiyumda aktive olan proteinler) onarılamayacak derecede hasar görmüş hücrelerin, hücre iskeletinin parçalanmasından sorumludur. Ayrıca kalpainlerin hücre iskeletinin şekillendirilmesinde ve subletal aksonal membran hasarında onarımı kolaylaştırma gibi ek görevleri de vardır. Kalpainlere, nekroz ve apoptoz gibi hücre ölümü ile sonuçlanan olaylarda kaspazlarla da ortak görevler yüklenebilirler [10,11]. Kalpain inhibitörleri ile yapılan çalışmalar henüz laboratuvar çalışmaları düzeyinde devam etmektedir [11].

Kalpainler hücre iskeleti, sinyal iletimi, hücre döngüsü düzenlenmesi, apoptoz, kas distrofileri, kataraktogenez, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi diğer fizyolojik ve patofizyolojik yollarda rol oynayan proteazlar olduğundan, kalpain inhibitörleri ile yapılan çalışmalar yukarıda bahsedilen hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalara öncülük edebilir. Hücre ölümünün istenmediği durumlarda kalpain inhibitörleri kullanılarak apoptoz engellenebilir.

Bu çalışmada kalpain inhibitörü olan AK295' in renal iskemi reperfüzyon hasarında kaspaz-3' e olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu alanda yapılacak çalışmalar hem ülke ekonomisine hem de evrensel bilgi havuzuna önemli katkılar sağlayabilir.

1.1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Arterlerde herhangi bir nedenle oluşan tıkanma sonucu, dokuya giden kan akışının bozulması iskemi (İ) olarak tanımlanır. İskemi sonucunda hücre ölümleri ve organ yetmezlikleri çok sık rastlanan bulgulardır [12,13,14]. İskemi sırasında kan akışının kesilmesi ve taşınan oksijen miktarındaki azalma anaerobik metabolizmayı devreye sokar. Dokuda laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi de hücre hasarına katkıda bulunur [15]. İskemik dokuda kan akışının normale dönmesiyle dokunun tekrar oksijenlenmesine ise reperfüzyon (R) denir. İskemik dokunun reperfüzyonu, dokunun hayatta kalabilmesi için çok önemlidir fakat reperfüzyon, iskemik dokuya reperfüzyon hasarı olarak da tanımlanan ek hasarlar getirir [13,14,16]. Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi ile O₂ kaynaklı serbest radikallerin İ/R hasarında önemli rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [12,15,17,18,19]. İskemi ve reperfüzyon hasarını açıklayan pek çok mekanizma bildirilmiştir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP' nin azalması, hücre içi Ca⁺² artışı ve hücre iskeleti ile zar

fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda SOR oluşarak, oksidatif strese neden olmaktadır [20]. Reperfüzyon sırasında hem SOR (hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları) hem de RNT (nitrik oksit ve onun peroksi nitrit gibi toksik metabolitleri) miktarlarında önemli artış olur [21].

1.2. APOPTOZ

İmmün sistemin hemostazının temel bir başlangıcı olan apoptoz, biyolojik görevini tamamlamış veya hasara uğramış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür [22,23].

Yunancada yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktif hale gelerek DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir [24,25].

Hücre çoğalması mitoz ile olmaktadır. Belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir [26,27].

Apoptoz ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptoz ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir [26,28,29].

1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timüs bezi hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timüs bezi hücrelerinin direkt olarak apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozu yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu anlaşılmıştır [30].

Apoptoz protein sentezi ve enerji gerektiren hücrenin aktif ölümüdür [31]. Nekroz esnasında hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona (yangı) neden olur.

Apoptoz sırasında ise plazma membranı yırtılmaz, yüksek ATP seviyeleri apoptoz için gerekli olur. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptoz veya nekroz ile öleceğine yön verir. ATP seviyesindeki değişme, mitokondrinin önemini apoptozun erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir [32].

Apoptoz, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA parçalanması ile karakterizedir [32, 33].

1.2.1 APOPTOZ MEKANİZMALARI

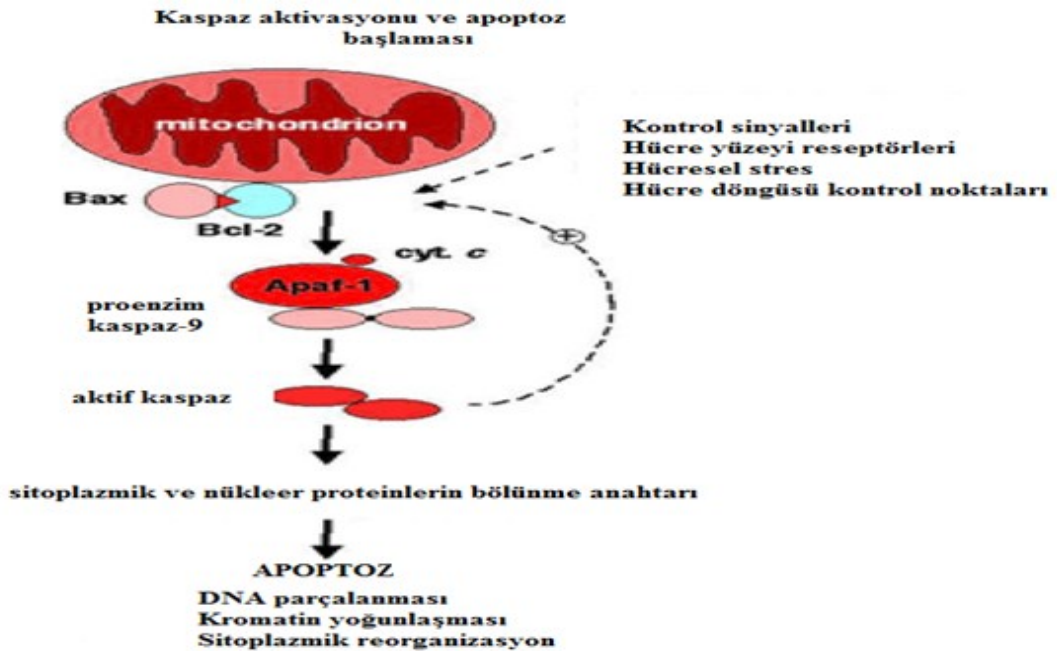
Apoptozun indüklenmesinde 3 farklı sinyal yolu gösterilmiştir [34].

Çizelge 1.1. Apoptoz mekanizmaları.

1. Mitokondri/Sitokrom-c aracılı apoptoz oluşturulması
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme
3. Endoplazmik Retikulum aracılı apoptoz oluşturulması

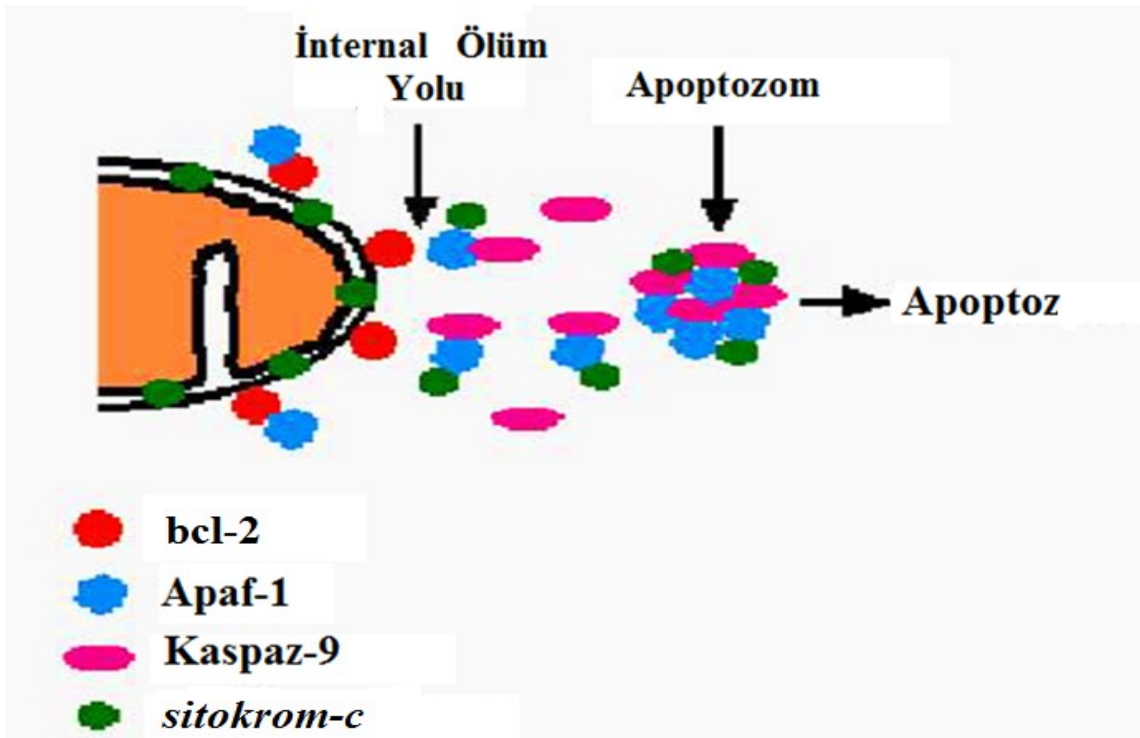
1. Mitokondri/Sitokrom-c Aracılı Apoptoz Oluşturulması:

Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere *sitokrom-c* ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbes kalan *sitokrom-c*, apoptik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder [32,35,36,37,38]. Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apoptik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır [39,40,41]. Kofaktör nükleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktive edilen *sitokrom-c* ve apaf-1 birleşerek prokaspaz-9' u aktive eder. Aktive kaspaz-9 da kaspaz-3' ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (Şekil 1.1)[34,41].



Şekil 1.1: Mitokondri/*sitokrom-c* aracılı apoptozun tetiklenmesi [41].

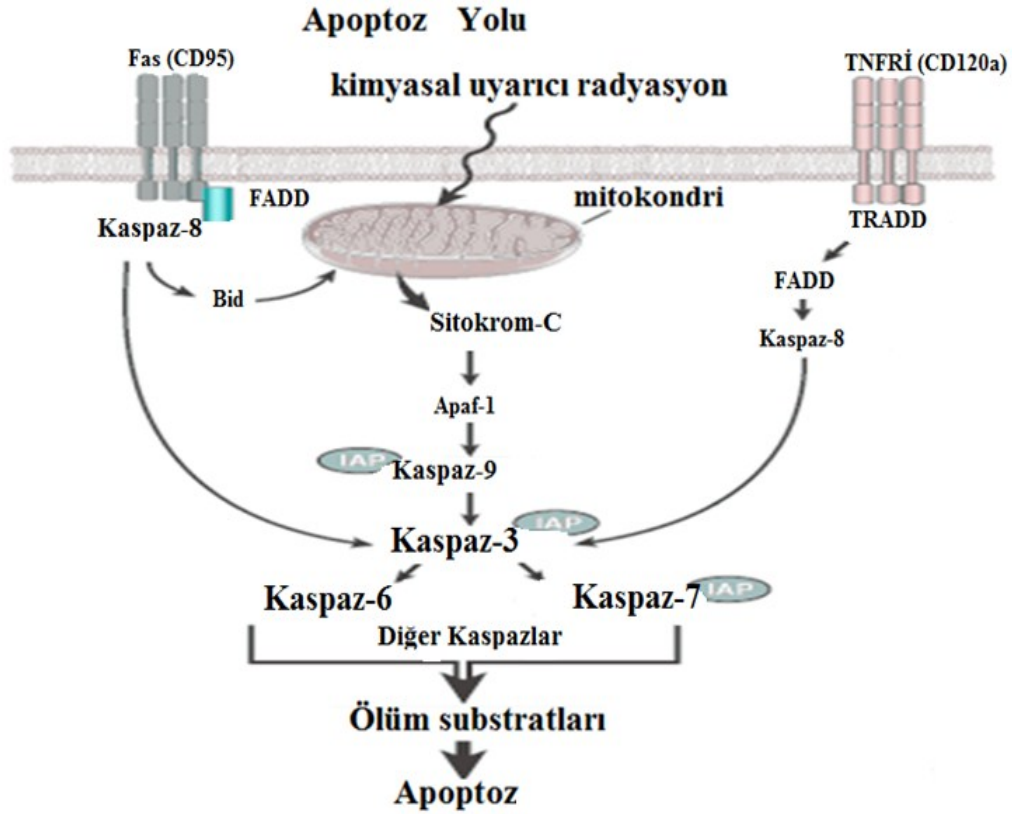
Sağlıklı bir hücre mitokondrisinin dış membranında bcl-2 proteini yer alır [42,43]. bcl-2, apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlar. bcl-2 neden olduğu internal hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak apaf-1 ve *sitokrom-c* salınımına yol açar. Bu iki protein kaspaz-9 molekülüne bağlanır (şekil 1.2) [40, 41, 44]. Bu proteolitik aktivitenin kaskadı kan pıhtılaşması ve kompleman aktivasyonuna benzer. Aktivasyon için terminal uç kaspaz-3' tür. Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA' nın parçalanması ve hücrenin fagositozu sağlanır [32,34,45].



Şekil 1.2: Apoptozom [41].

2. Dış Sinyallerle Apoptozun Tetiklenmesi:

Birbirini tamamlayan ölüm aktivatörlerinin (fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8' i aktive eden sinyaller yayılır. Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (Şekil 1.3)[34,36].



Şekil 1.3: Mitokondri/Sitokrom-c aracılı apoptoz oluşturulması [34].

SCI reseptörleri fas ve p-75 ile bağlantılıdır. Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bunların apoptik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir [46].

Diğer sistemlerde de oligodendrositlerde olduğu gibi apoptoz oluşumunda fas ve p-75' in sorumlu olduğu gösterilmiştir [46]. Fas reseptörünün, fas ligand (Fas-L) ile karşılıklı etkileşimi FADD (Fas bağımlı ölüm domain proteini) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptik döngü başlar [46,47].

3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz Oluşturulması:

Son zamanlarda amiloid β norotoksitesine katkıda bulunan kaspaz-12' ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptik yol tarif edilmiştir [34, 48]. Bu yol mitokondrial/*sitokrom-c* ve ölüm reseptör aracılı apoptozdan farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir [48]. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptoz için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki Ca^{+2} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile

prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder [49]. Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12' nin kaspaz-9' u aktive ettiğini göstermiştir [50].

1.2.2. APOPTOZ VE NEKROZ

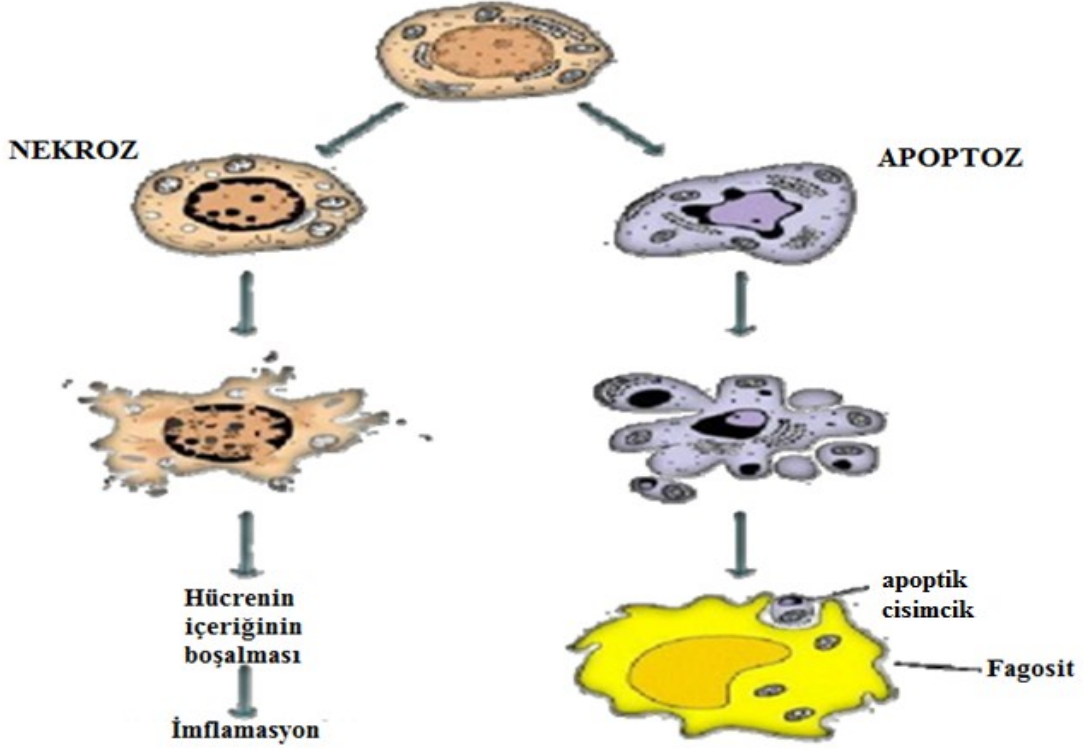
Nekroz esnasında hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek yangıya neden olur. Apoptoz sırasında ise plazma membranı yırtılmaz, yüksek ATP seviyeleri apoptoz için gerekli olur. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptoz veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozun erken fazında göstermektedir.

Hücreler nekroz ve apoptoz mekanizmaları ile ölürler. Nekroz' a kaza (accidental) hücre ölümü de denir. Apoptoz ise programlanmış hücre ölümü olarak bilinir [32]. Nekroz mekanizmaları pasif hücre şişmesi, enerji kaybı, mitokondri yaralanması, internal dengenin bozulması şeklindedir. Bunlarda membran lizisine ve hücre içi materyallerin ortama salınmasına bağlı olarak inflamatuvar reaksiyonların gelişimini tetikler [27,30,32,40,51,52,53,54]. Apoptoz hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendini aktif olarak yok eder. Bu olay nüklear büzülme ve DNA fragmantasyonu ile karakterizedir. Nekroza benzer olarak apoptoz da eksojen faktörlere bağlı olarak oluşur. Bu faktörler; radyasyon, hipertermi, eksitotoksinler ve serbest radikallerdir. Apoptoza giden hücre proteazlar tarafından otosindirime uğrar ve fagositler tarafından temizlenir. Bu olay inflamatuvar olay gelişmeksizin ortaya çıkar. Morfolojik olarak apoptozun nekroza göre ciddi farkları vardır. Bunlar; nükleusda kromatin yoğunlaşması, nüklear büzülme ve DNA parçalanmasıdır. Membran ve organel yapıları korunur. DNA parçalanmasını göstermek üzere TUNEL tekniği kullanılır [32]. İstenmeyen ve lüzensüz hücrelerin seçiliminde, sinir sisteminin sürekliliğini ve gelişimini sağlamada apoptoz fizyolojik bir yol teşkil eder. Yangıya sebep olmaksızın hücreler ortadan kaldırılır [32,35,55,56].

Apoptoz için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin, apoptik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür [56,57].

1.2.3.APOPTOZ VE NEKROZ ARASINDAKİ FARKLAR

Apoptoz, hücrede yarattığı değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekroza farkları şunlardır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4: Apoptik ve nekrotik hücre ölümünün karşılaştırılması [58].

Fiziksel Farklılıklar

1. Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptozda tek tek hücreler etkilenir [27,59].
2. Nekroz fizyolojik olmayan uyanlarla başlar, apoptoz fizyolojik uyanlarla da başlayabilir (örnek: hormonal dengenin bozulması) [26,60].
3. Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozda uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptozda ise yoktur [26,27,29].

Morfolojik Farklılıklar

1. Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptozda zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz [30,59].
2. Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptozda ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür [27,30].
3. Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptoz hücrenin daha ufak parçalara dönüşmesi ile sonlanır (apoptik cisimler) [27].
4. Nekrozda hücre zarında vezikül oluşumu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptozda zara bağlı veziküller oluşur [61].
5. Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptozda; apoptozu başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (Şekil 1.4) [30,61].

Biyokimyasal Farklılıklar

1. Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptozda ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur [60].
2. Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve 4°C’ de bile gerçekleşebilir. Apoptoz ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve 4°C’ de gerçekleşemez [61].
3. Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA’ nın rastgele sindirimi mevcuttur. Oysa apoptozda rastgele olmayan, monooligonükleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptoz için karakteristik “*ladder pattern*” denen merdiven şeklinde kırılmalar meydana getirir [60,62].
4. Nekroz sırasında hücre ölümünün geç bulgusu; postlitik DNA parçalanması vardır (DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır). Ayrıca apoptozda mitokondri tarafından sitoplazmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (*sitokrom-c* v.b.) [52,62].
5. Nekroz sırasında spesifik olmayan zar parçalanması olurken, apoptozda zar asimetrisinde değişiklikler olur (örn: fosfotidilserin zarın sitoplazmik yüzünden ekstraselüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptik hücrenin inflamatuvar reaksiyon oluşturmada lokal hücrelerce tanınıp, fagosite edilmesini sağlar [61].

1.2.4. APOPTOZUN GENETİK KONTROLÜ

ANTIAPOPTİK PROTEİNLER

Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir [63,64,65]. Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir [53]. Omurgalılarda apoptozu düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-xl) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır [31,42,43,66].

p-53:

Apoptozu düzenleyen bir diğer gen, tümör baskılayıcı p-53 genidir. Hipoksi ve serbest radikal oluşumu p-53 aracılı DNA onarımı ve apoptozu başlatır [46]. DNA hasarı olduğu zaman S fazına geçişi durdurur. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse hasarlanmış hücreler apoptoz ile yok edilir [59,66,67]. Normal p-53 proteinlerinin yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle histolojik kesitlerde saptanamaz. Mutasyona uğramış p-53 geni apoptozun indüklenmesinde etkisizdir ve kanserlerin yarısında saptanmıştır. [27,68].

c-myc:

Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin çoğalmasına ve apoptoza uğramasına neden olur [69]. c-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisi de yeterli ise çoğalma olur, c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptoz görülür [28,69,70].

bcl-2 ve bcl-xl:

bcl-2 ailesi apoptik kaskad kontrolünde en önemli gen ailesidir ve bir düzineden fazla üyesi vardır [32,42]. Bunlardan bazıları apoptik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapoptik (hücre koruyucu) proteinlerdir [42]. Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir.

bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür [42]. Antioksidan yolda mitokondriden *sitokrom-c* salınımını engellemede rol oynar. bcl-2 mitokondri membran dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunur. bcl-2 ayrıca raf 1 ve kalsinörine bağlanır [42,43,67,71].

bcl-xl mitokondri membran dışında lokalizedir. bcl-xl ve bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korurlar. Proapoptik proteinleri (bax ve bad) inhibe ederek apoptozu engeller [34]. bcl-xl kaspaz aktivasyonunu, apaf-1 üzerinden önler [32,40,42].

bax ve bad proteinleri etkilerini diğer bir protein ailesi; kaspazlar üzerinden gerçekleştirir. Bunların sayısı da bir düzineden fazladır. Kaspazlar sistein proteazlardır, aktiviteleri hücre ölüm yolunda ortaya çıkar. Kaspaz-9, bcl-2 ailesi tarafından stimüle veya inhibe edilir. Kaspaz-2 ve kaspaz-8, TNF- α gibi sitokinler tarafından aktive edilir.

XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP:

Antiapoptik protein ailesinden apoptoz protein inhibitörleri omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup, bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bunların çoğu hücre ölümünü kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9' a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler [34].

Apoptoz protein inhibitörleri kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler [34,37,50].

PROAPOPTİK PROTEİNLER

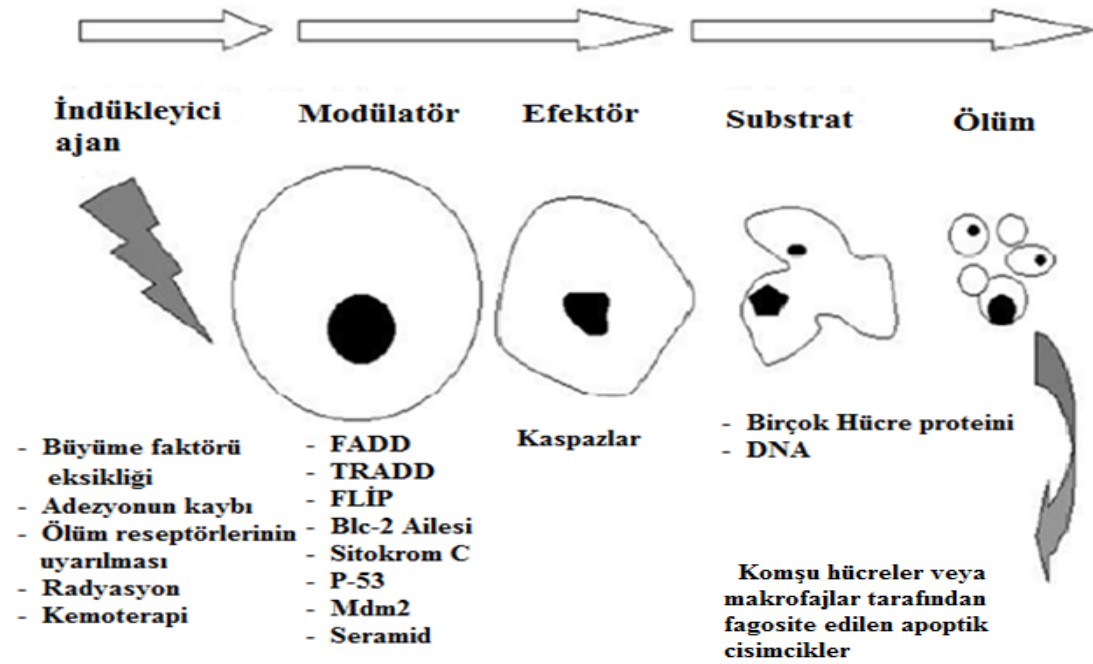
bax, bad ve bid:

Sağlıklı hücrede bax sitozolde bulunur. Apoptik uyarı ile sitozolik bax mitokondriye yönelir ve çeşitli değişimler sonucunda bax' in hidrofobik C terminal ucu

açığa çıkar ve *sitokrom-c* salınımına neden olur. Kalpain tarafından bax salınımı uyarılarak *sitokrom-c* açığa çıkar [67,72].

bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında bulunur. Apoptoz sırasında bax değişime uğrar ve N terminal uç açığa çıkarken bcl-xl bad' dan ayrılır [44,72].

bid, bcl-2' yi inaktive etmek veya bax' ı aktiflemek üzere mitokondriye yönelir [42]. Endojen bid' in yarısı sitozolde erir. Diğer yarısı ise hücre içi membranlarda özellikle de endoplazmik retikulumda bulunur [32,37,49].



Şekil 1.5. Apoptozun düzenlenmesi [73].

1.3. KASPAZLAR

Apoptoz mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar: Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar) [58,74]. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas' ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz aracılığı ile DNA yıkımına neden olur [74]. Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif öncüler olarak bulunur. Bu inaktif öncüler, bir proteaz aktivasyon

dizisi (şelalesi) başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadır, bu sırada nükleazlar da aktive olarak DNA parçalanmasını ve RNA yıkımını gerçekleştirmektedir [75]. *Sitokrom c*' nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur.

Şimdiye kadar sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır [76,77]. İnflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan ICE, prokaspaz-1 olarak isimlendirilmiştir. Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1, 4, 5, 13), proteolizisin "başlatıcıları" (kaspaz 2, 8, 10) ya da "uygulayıcıları" (kaspaz 3, 6, 7) olarak sınıflandırılırlar [74,78]. Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler ama infazı gerçekleştirmezler bunu yapacak olanları aktifleştirirler. İnfazı gerçekleştiren uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler [74].

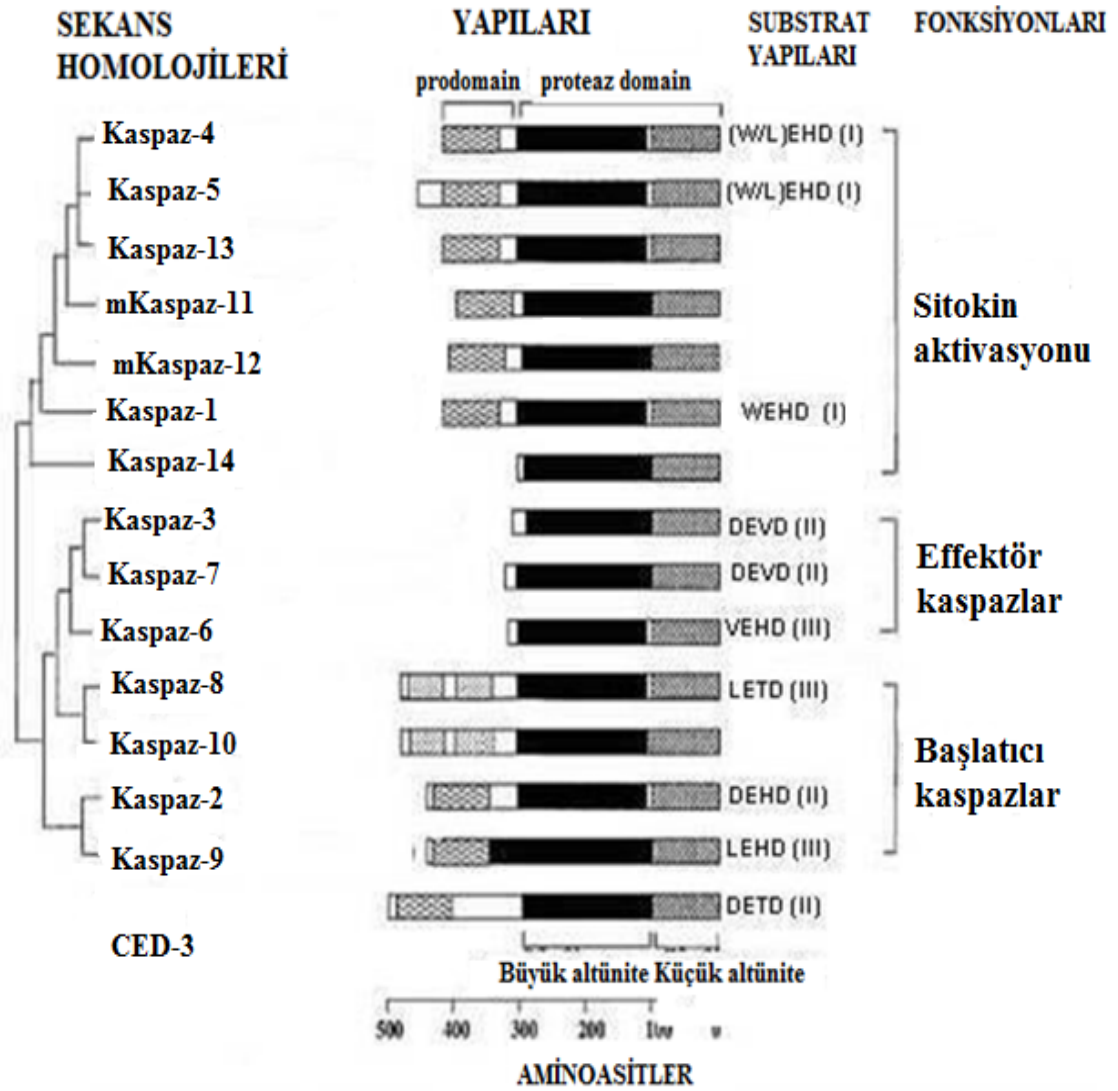
Apoptik programın merkezi bileşeni kaspazlardır [79]. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir [74]. Ayrıca IAP (Apoptoz inhibitörleri) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesinde ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenirler [73]. Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle *c-asp-ases* adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis şekillenmez ve apoptik cisimcikler oluşur [73,79].

Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana gruba ayrılırlar (Şekil 1.6).

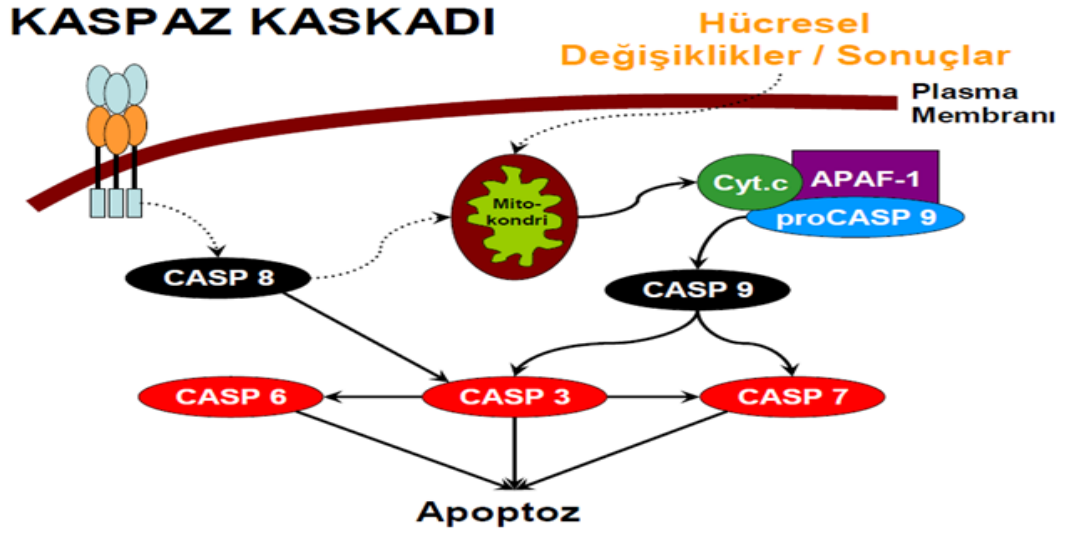
1- Başlatıcı kaspazlar (apoptozu başlatanlar): Kaspaz 2, 8, 9, 10' nu içermektedir. Bu kaspazlar proapoptik sinyalleri alarak, sinyalin alt kısmında kalan diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Her biri 100 aminoasitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran proteinleri veya sitotoksik etkiye sahip maddeler ile etkileşerek aktif hale geçerler. Bu kaspazlar, adaptör ve düzenleyici proteinlerin farklı kombinasyonları ile etkileşime girerek apoptik mekanizmanın hücre içerisinde farklı yönlerde devam etmesine neden olurlar. Kaspaz-2' nin aktivasyonu için ölüm bölgesi içeren PIDD ve adaptör protein olarak da RAIDD olması gerekir [80,81].

2- Efektör kaspazlar (apoptozu yürütenler): Kaspaz 3, 6, 7' yi içermektedir. Bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri enzimatik reaksiyonlarla parçalarlar ve apoptik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar [9,82].

3- Sitokinleri aktive eden kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14' ü içermektedir. Hücre sinyal iletiminde önemli role sahip olan sitokinlerin aktivasyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Kaspaz 1, 4, 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler [78,83].



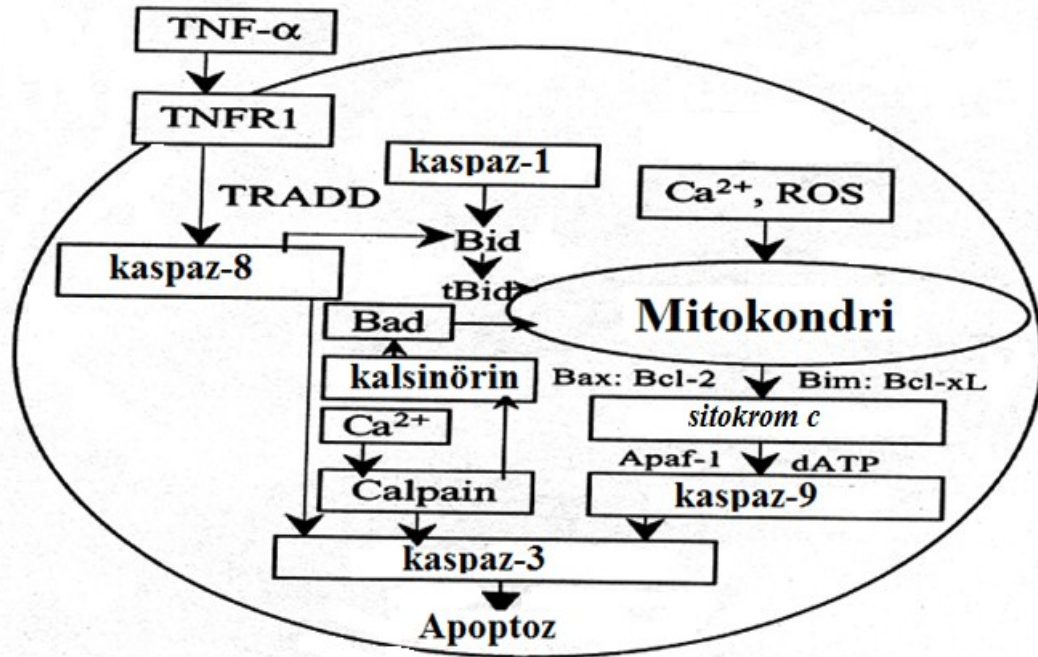
Şekil 1.6 Kaspazların sınıflandırılması



Şekil 1.7. Kaspaz Akış Döngüsü [73].

1.4. KASPAZ VE KALPAİNLERİN APOPTOZDAKİ ROLLERİ

Kalpainler, kaspaz-9 gibi prokaspaz 3' ün aktiflenmesini sağlar ve apoptoza katılır (Şekil 1.8) [84,85].



Şekil 1.8: Kalpain ve kaspazların apoptozdaki rolleri.

Kaspaz-3' ün m-kalpain ile aktivasyonu doza bağımlı bir şekilde in vitro olarak sitozolik bölümlere inkübasyonu, kaspaz-3 proformlarının kalpainlerle beraber aynı ortamda tutulması ile ortaya konmuştur. Bu bir miktar aktif kaspaz-3' ün olmasını gerektirir ve kalpain inhibitörü kalpastatin ile engellenebilir [86].

Kaspazlar değişik substrat özgüllüğüne sahip, P1 pozisyonunda aspartat nidusu bulunan apoptoza anahtar olan sistein proteazları olarak tanımlanmışlardır. Kalpainler başka bir sistein proteaz ailesinden olup kalsiyum ile aktive olurlar [86].

Blomgren ve arkadaşları kaspaz-3' ün, neonatal hipoksi-iskemi sonrası sinerjistik aktivasyonun m-kalpain vasıtasıyla olduğunu göstermiştir [86].

1.5. APOPTOZUN SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Apoptozu saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptoz terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn, aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir [9].

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz, 80' li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90' ların ortalarında ise apoptik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlarla saptanabilen apoptoz, 90' ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı, Apoptozun belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metotları, 2000' li yılların başlarında, sadece apoptik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18' in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir (Çizelge 1.2) [9].

Çizelge 1.2. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler

I. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
II. İmmunohistokimyasal yöntemler
III. Biyokimyasal yöntemler
IV. İmmünolojik yöntemler
V. Moleküler biyoloji yöntemleri

1.6. KALPAİNLER

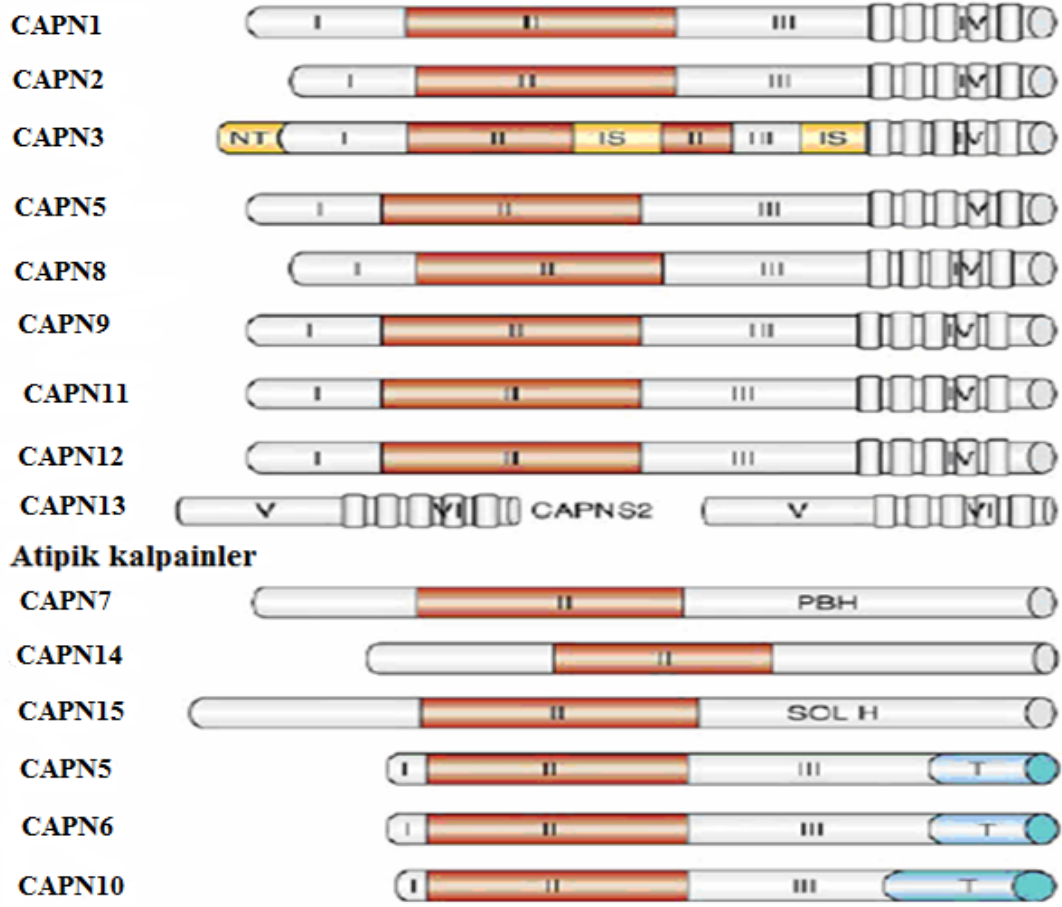
Kalpainler aktif merkezinde nükleofilik tiol grubu bulunduran sistein proteazlardır [87,88]. Kalpain adı kalsiyum bağlayıcı bölge olarak calmoduline sahip olduğundan “cal” ekini, papain benzeri sistein proteaz özelliği gösterdiğinden “pain” ekini alarak isimlendirilmiştir [89]. Kalpain ilk olarak 1964 yılında Guroff tarafından sıçan beyin extratında gözlemlenmiştir [90].

Memelilerden omurgasızlara, mantarlardan bakterilere kadar pek çok canlıda kalpainlerin izoformu tanımlanmıştır [88]. Bugüne kadar memelilerde 16 çeşit kalpain izoformu tanımlanmıştır (Çizelge 1.3) [91,92]. Bu tanımlanan kalpainlerin tipik ve atipik kalpainler olmak üzere 2 sınıfa ayrılması, karboksil uçta EF el motifine sahip olup olmamasına dayandırılmıştır [92,93]. Aktiflenmeleri için m-kalpainler milimol seviyelerinde Ca^{+2} konsantrasyonlarına ihtiyaç duyarken, μ kalpainler ise mikromol düzeylerinde Ca^{+2} konsantrasyonlarında aktiflenirler [89].

Çizelge 1.3. Kalpainlerin sınıflandırılması ve hastalıklarla ilişkisi

İsim	Tipik/Atipik	Bulunduğu Yerler	Hastalıklar
Calpain 1	Tipik	Yaygın	Huntington Hastalığı, Katarakt, Müsküler distrofi, Travmatik Beyin Hasarı, Spinal Kord Hasarı, Kanser, Alzheimer...
Calpain 2	Tipik	Yaygın	Katarakt, Müsküler distrofi, Travmatik Beyin Hasarı, Spinal Kord Hasarı, Alzheimer, Parkinson, Kanser...
Calpain 3	Tipik	Lens, Retina, İskelet kası	Katarakt.
Calpain 4	Tipik	Yaygın	
Calpain 5	Atipik		Huntington Hastalığı, Polikistik Ovaryum Sendromu, Metabolik Sendrom...
Calpain 6	Atipik	Plasenta	
Calpain 7	Atipik	Yaygın	Huntington Hastalığı
Calpain 8	Tipik	Mide mukozası	
Calpain 9	Tipik	Sindirim Sistemi	Mide Kanseri
Calpain 10	Tipik	Yaygın	Huntington Hastalığı, Katarakt, Diyabet...
Calpain 11	Tipik	Testis	
Calpain 12	Tipik	Yaygın	Alzheimer
Calpain 13	Atipik	Yaygın	
Calpain 14	Atipik	Yaygın	
Calpain 15	Atipik	Yaygın	
Küçük alt Ünite 2	Tipik		

Kalpainer; iskelet kası, kalp kası, beyin, böbrek, akciğer, karaciğer ve adipöz doku gibi çeşitli dokularda geniş bir yayılım gösterirler [94]. Bu dokularda kalpainlerin fizyolojik ve patolojik düzeni karışıktır fakat kalpainlerin, fizyolojik ve patolojik durumlarda önemli rol oynayan yapısal proteinlere ve hücre içi sinyallere ayrıldığı kabul edilmektedir. Hücre iskeleti ve yapısal proteinler (spektrin, α -aktinin, distrofin, tubulin) , membrana bağlı proteinler ve reseptörler (EGF reseptörü), kalmodulin bağlayıcı proteinler (kalsiyum pompası, inositol 1.4.5-trifosfat kinaz), miyofibril proteinleri (troponin I, troponin T, miyozin), transkripsiyon faktörleri (c-fos, c-jun) ve birkaç önemli enzimin (protein kinaz C, 3-hidroksil-3-metilglutaril-CoA redüktaz, cAMP-bağımlı kinaz) kalpain substratları içerdiği bilinir [95,96]. Kalpainler kas distrofisi, katarakt, felç, iskemi, beyin travması, Alzheimer, diyabet ve kanser gibi hastalıklarda rol oynamaktadır [95].



Şekil 1.9: Tipik ve Atipik kalpainler

TİPİK KALPAİNLER

Tipik kalpainler, kalpainlerin EF el motifine sahip alt ailesi olarak bilinir. Bu ailenin üyeleri kalpain 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13 ve küçük alt ünite II olmak üzere 10 farklı kalpайдen oluşur. Bu ailenin üyeleri karboksil uçta Ca^{+2} bağlayan EF el motifi yapısına sahiptir [93].

ATİPİK KALPAİNLER

Atipik kalpainler terminal uçta, 4. bölgedeki EF el motifine ve kalsiyum bağlayıcı bölgeye sahip değildirler. Bu ailenin üyeleri kalpain 5, 6, 7, 10, 14, 15 olmak üzere 6 kalpайдen oluşur. Atipik kalpainlerin aktiviteleri için kalsiyuma gerek duyup duymadıkları tam olarak bilinmemektedir.

1.6.1. KALPAINLER VE KALPASTATİN

Kalpainer, Guroff tarafından MSS' de bulunmuş, hücre içi proteazlardır [85, 97]. Enzimatik aktiviteleri kalsiyuma bağımlı sitozolik sistein proteazlardır. Kalpain ailesi üyeleri memelilerden *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans*' a kadar birçok organizmada bulunur. En iyi bilinenler; m-kalpainer ve μ -kalpainerdir. Aktiflenmeleri için m-kalpainer milimol seviyelerinde Ca^{+2} konsantrasyonlarına ihtiyaç duyarken, μ -kalpainer ise mikromol Ca^{+2} konsantrasyonlarında aktiflenir [85].

Kalpainer 80 kDa' lık katalitik ve 30 kDa' lık düzenleyici alt grupların karışımından meydana gelir. 80kDa' lık katalitik grup I-IV arası domainleri kapsar. 30kDa' lık düzenleyici alt grup ise V ve VI olmak üzere 2 domain içerir (Şekil 1.10), (Şekil 1.11) [85, 89].

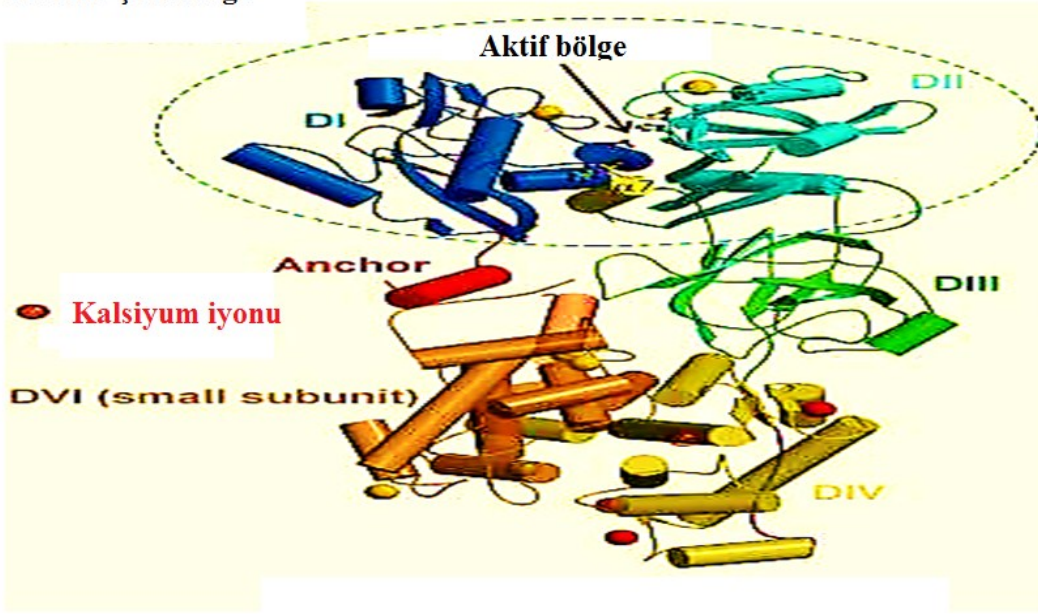
Kalpainer, sitoskeletal şekillenme, farklılaşma, hücre göçü, çoğalma ve apoptozdan gibi hücrel fonksiyonlarda görev alır. Kalpain eksikliği olan transgenik fareler embriyonik gelişim sırasında ölürlür [89].

m ve μ -kalpainerin substratları aynıdır ve bunlar; sitoskeletal proteinler, membran proteinleri, sitokinler, protein kinazlar, fosfatlar ve lens proteinleridir [98, 99].

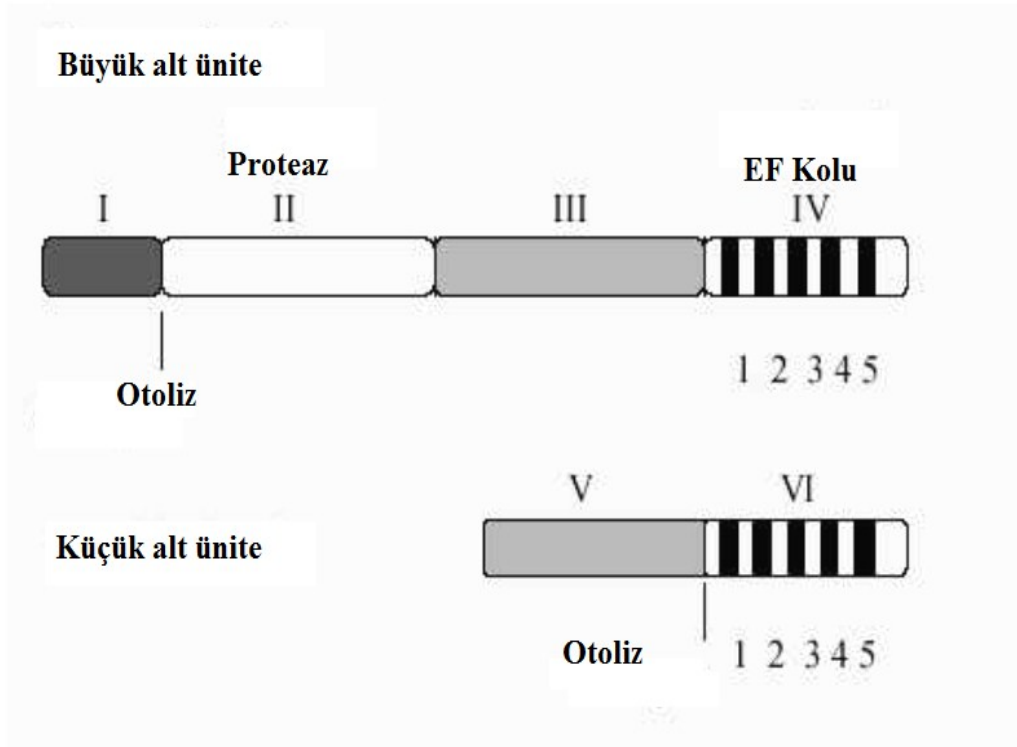
Kalpastatin (110 kDa), kalpainin endojen inhibitör proteindir. Kalpain haricinde diğer proteazları inhibe etmez. Kalpastatin, kalpain ile beraber sitozolde ve membranda bulunur. Kalpastatin dört adet inhibitör bölge içerir ve 1 molekül kalpastatin 4 molekül kalpaini inhibe eder [85].

Neonatal serebral hipoksi ve iskemide Blomgren ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kalpastatinin hipoksiye karşılık olarak upregüle olduğu ve kalpaine karşı bir intihar substratı olduğu tespit edilmiştir [100].

Proteaz Çekirdeği



Şekil 1.10: Kalpainin yapısı ve kalsiyum ile ilişkisi



Şekil 1.11: Kalpainin şematik yapısı

1.6.2. KALPAIN AKTİVASYONUNUN DÜZENLENMESİ

Kalpain aktivitesi, oto proteolitik salınım, fosforilasyon, Ca^{+2} konsantrasyonu ve endojen inhibitör kalpastatin ile düzenlenir [72, 101].

Kalpainler için gerekli olan kalsiyum konsantrasyonları μmol ' den mmol ' e kadar değişir. Bundan dolayı hücrelerde Ca^{+2} gereksinimini düşürecek veya kalsiyuma karşı kalpainlerin hassasiyetini arttıracak mekanizmalar vardır. Hücre içi kalsiyum seviyelerine kalpainlerin hassasiyeti membran fosfolipitleri sayesinde [72, 85, 101]. Kalpainlerin Ca^{+2} afinitesini arttıran aktivatör proteinlerin varlığında kalpain aktivasyonu başlar [102].

Aktif kalpain membranlarda bulunur. Kalpain aktivasyonunda membrandaki lokalizasyonları önemli rol oynar. Kalpainlerin aktivasyonlarında veya inaktivasyonlarında fosforilasyon uçları rol alır [85, 98, 99, 102].

Tipik kalpainlerden, kalpain-1 μ -kalpain olarak bilinirken kalpain-2 ise m-kalpain olarak bilinmektedir. Bu iki kalpain, kalpain süper ailesinin en çok bilinen ve karakterize edilen üyeleridir. Literatürdeki kalpainlerin büyük bir kısmı, kalpain inhibitörlerini, kalpainlerin yapılarını ve hayvan deneylerinde kullanılan iki izoformunu içermektedir. Bunların hepsi aynı zamanda memeli hücrelerinde de bulunmaktadır. Kalpain-1 aktiflenmesi için mikromol düzeyinde Ca^{+2} konsantrasyonuna ihtiyaç duyarken, kalpain-2 milimol seviyesinde Ca^{+2} konsantrasyonuna ihtiyaç duyar. Bunlar ortak düzenleyici alt ünite ve katalitik alt ünite benzeri heterodimerlerin oluşması ile işlev kazanır. Büyük alt ünite diğerlerinden farklıdır ama küçük alt ünite aynıdır. Kalpain-1, 82 kDa katalitik alt üniteye sahipken kalpain-2 ise 80 kDa katalitik alt üniteye sahiptir. Kalpain-1 ve kalpain-2 ile birlikte 28 kDa düzenleyici alt üniteye sahiptir. Kalpain-1 ve Kalpain-2 birbirlerine yaklaşık % 60 oranında benzerlik gösterirler [93].

Kalpain-1 ve kalpain-2' nin büyük alt üniteleri temel olarak 4 farklı aminoasit dizisi içeren bölgeye ayrılmıştır (Şekil 1.11) [93]. 1. Bölge otoliz bölgesi içermektedir ve Ca^{+2} ye duyarlılık artması durumunda otolitik aktivasyon gerçekleşir [91]. 2. Bölge substratları hidroliz etmek için katalitik üçlü (Cys-His-Asn) aminoasidi içeren katalitik proteaz bölgesidir. Üçlü yapı sistein(Cys), histidin (His) ve asparajin (Asn) aminoasitlerinden oluşur [103]. 3. Bölge katalitik bölge olarak bilinen 2. bölge ile Ca^{+2} bağlayıcı 4. bölgeyi birbirine bağlar [91]. 4. Bölge 5 EF el motifine sahip kalmodulin benzeri bölgedir. İlk 4 EF el motifi bölgesi Ca^{+2} bağlayıcı bölgedir. 5. EF el motifi

bölgesinin karboksil ucu 28 kDa küçük alt üniteyle (Kalpain 4) dimerizasyon yapabilir.

Kalpain-4, kalpain-1 ve 2' nin küçük alt ünitesi ya da düzenleyici alt ünitesi diye bilinir. Bu isim genelde kalpain küçük alt ünitesi I diye bilinir. Kalpain-4 bir ucunda NH₂ içeren 5. bölge diğer ucunda COOH içeren 6. bölgeden oluşmaktadır. (Şekil 1.11) [104]. 5. bölge glisin bakımından zengindir. Bu bölgenin yaklaşık % 30 glisinden oluşur ve hidrofobik bölge olarak adlandırılır. 5. bölgenin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir fakat membranla bağlantı sağladığı düşünülmektedir. Böyle düşünülmesinin nedeni ise membranın canlı dokularda enzimlerin aktivasyonunu sağlamasıdır [104, 105, 106]. 6. bölge 5. bölgeye poliprolin sayesinde bağlanır. 4. bölge ile % 50 oranında benzerlik gösterir. İlk 4 bölgesi Ca⁺² iyonlarını bağlayan, 5. bölgesi ise kalpain-1 ve kalpain-2 ile aynı olan katalitik EF el motifine sahiptir [93, 107, 108].

1.6.3. KALPAİN İNHİBİTÖRLERİ

Bir düzineden fazla kalpain inhibitörü bilinmesine karşın en çok kullanılanlar *leupeptin* gibi peptid aldehitlerdir. Enzimi aktiflemek için aldehit son grubu sülfhidrit grubuna bağlanır. Bu bağlanma kalsiyuma bağımlı ve geri dönüşümlüdür. Ancak *leupeptin* hücre geçirgenliği çok az olan bir kalpain inhibitörüdür. Diğer bir inhibitör ise *E64*; bu da kovalent bağlarla sülfhidrit gruplarına geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Uçankale ve arkadaşları tarafından yapılan bir tez çalışmasında kalpain VI inhibitörü olan *SJA 6017* ' in, deneysel travmatik spinal kord hasarlı sıçanlarda hem nöronal, hem de nöroglial apoptozisi engelleyerek sekonder yaralanmayı azaltmış ve fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir [109]. Bu çalışmada ise yine bu grupta yer alan bir kalpain inhibitörü olan AK295 kullanılmıştır.

AK295

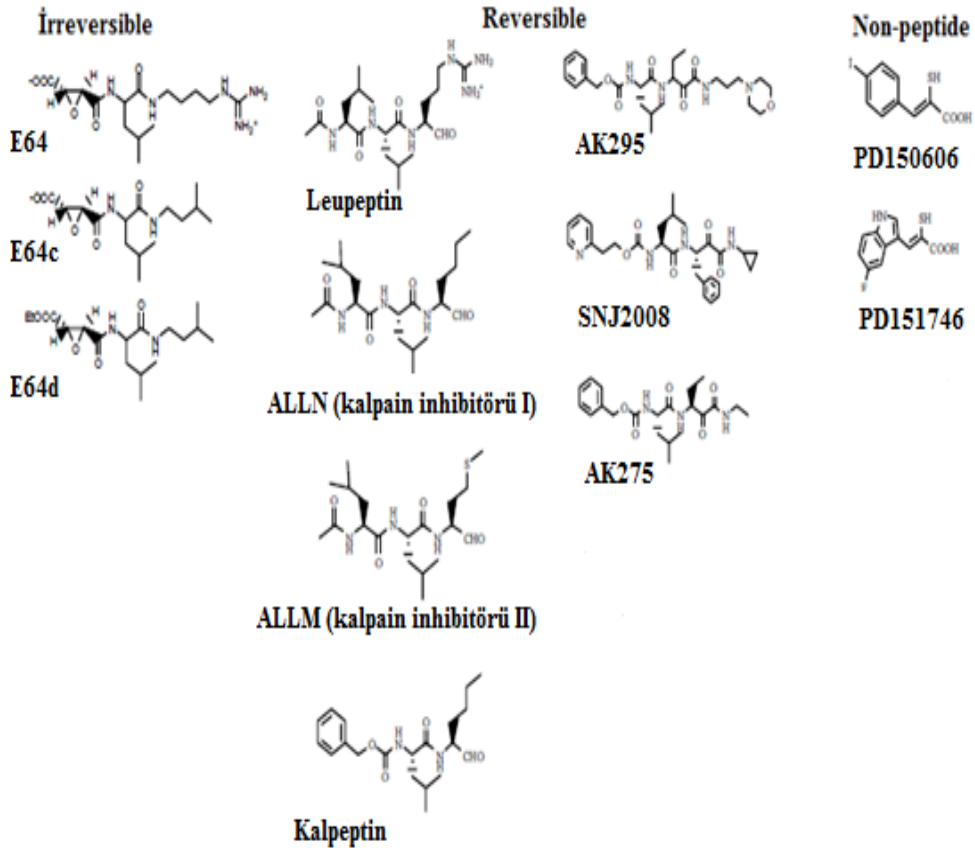
AK295 ketoamid kalpain inhibitörüdür (Z-Leu-aminobütirikasit-CONH (CH₂)₃-Morfolin). Kalpain inhibitörü AK295 sıçanlarda deneysel beyin hasarı sonrası motor ve kognitif defisitleri azalttığı gözlenmiştir [110]. AK295 ile tedavi edilen beyin hasarlı hayvanlar nörodavranışsal motor testlerde performans yükseltilmişler ve hasar görmemiş hayvanlar seviyesine ulaşmışlardır. Bu bulgular travma ile indüklenen kalsiyum bağımlı proteinaz olan kalpainin postravmatik morbiditeyi arttırdığını desteklemektedir. Nöral kalpainin inhibisyonu travma ile indüklenen kalsiyum artışını soma ve dendritlerde

azaltır. Bunun dışında glial kalpainin inhibisyonu post travmatik glial hipertrofi sırasındaki sitoskeletal değişikliklerle ilgilidir [110].

Bu ketoamid inhibitörü AK295 *leupeptin* veya kalpain inhibitör-I gibi sıklıkla kullanılmış inhibitörlere göre daha güçlüdür. AK295 aynı zamanda diğer sistein proteazlarına göre kalpain üzerinde daha seçicidir. AK295'in primer etkisi kalpainin selektif inhibisyonudur [110].

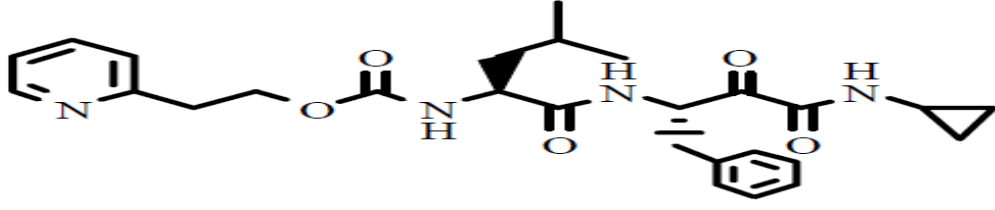
İntrasellüler Ca^{+2} artışı sellüler disfonksiyon ve santral sinir sistemi travmasını izleyen kalsiyum bağımlı nötral proteaz kalpain aktivasyonu ile rol oynar [100].

Kalpainler temel olarak eksitotoksik nöronal hasardan sorumlu tutulmuşlardır. [100]. Kalpain inhibitörlerinin en son üyesi olan AK295 lipofilik, selektif, reversibl kalpain-I ve II inhibitörüdür. Fokal iskemi sonrasında sinir sisteminde nöroprotektif rolü rapor edilmiştir [100].



Şekil 1.12. Kalpain İnhibitörleri

AK295



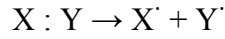
Şekil 1.13. AK295

1.7. Serbest Radikaller

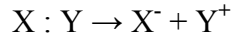
Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron içeren, aşırı derecede etkin ve kısa ömürlü moleküller serbest radikaller olarak adlandırılırlar. Serbest radikaller bu özelliklerinden dolayı tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptir [111]. Serbest radikaller canlılarda metabolizma yan ürünü olarak veya ilaçlar ve diğer zararlı kimyasal maddeler ile çevresel etkilerle meydana gelebilirler [112].

Serbest radikaller 3 farklı yol ile meydana gelebilirler [2].

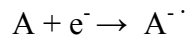
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmesi;



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı;



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.



Serbest radikallerin oluşum hızı ile inaktivasyon hızı denge halinde olduğu sürece serbest radikallerin canlı üzerinde herhangi bir etkisi olmamaktadır. Bu denge halindeki durum herhangi bir sebeple bozulur ya da bu bileşiklerin oluşum hızı inaktivasyon hızından yüksek olursa oksidatif stres meydana gelmekte ve serbest radikallere bağlı hücre hasarı ortaya çıkmaktadır [111].

1.8. Serbest radikallerin biyolojik önemi

Dünya üzerindeki yaşamın oksijen molekülüne bağlı aerobik yaşam olması çelişkili bir durumdur. Çünkü oksijen, enerji metabolizması ve solunum için çok önemli bir molekül olmasının yanında birçok hastalıkta ve dejeneratif bozuklukta önemli rol oynamaktadır.

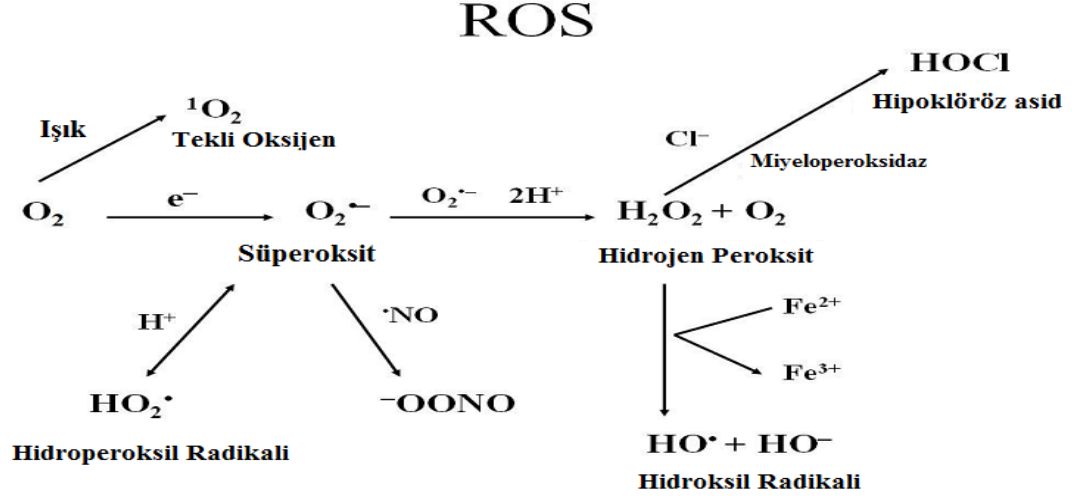
Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir [113]. Canlı içerisinde oluşan Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) sadece hücre içerisinde substrat ile birleşerek hasara neden olmaz, aynı zamanda bağlandıkları moleküllerin hücre içerisinde çeşitli yan metabolit oluşumuna sebep olarak da hasara neden olabilirler. Örneğin; oksijenin redüksiyonu ile negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit (O_2^-) radikali oluşur. Süperoksit radikalinden ise spontan ya da enzimatik dismutasyon ile ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ortaya çıkar. Hidrojen peroksitin bir dizi reaksiyonu sonucunda ise hidroksil radikali (OH^\cdot) oluşur [114].

SOR; nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlar ve lipitleri de kapsayan birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girme özelliğindedir [115].

Normalde hücrelerde oluşan SOR formlarının temel kaynağı elektron taşıma zincirinden sızan elektronlardır. Mitokondrilerde kullanılan oksijenin yaklaşık % 90-95' i son ürün olarak su ve moleküler oksijene dönüştürülürken, kalan % 5-10' u SOR meydana getirir [116]. SOR üretimi; elektron transferindeki yüksek verimlilik ve Metal iyonlarının SOR yakalama kabiliyetleri sayesinde minimum düzeyde tutulur. Hücre içerisindeki diğer SOR kaynakları arasında, endoplazmik retikulumlardaki *sitokrom P450*, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sayılabilir [117].

Canlıların yapıtaşlarını oluşturan tüm moleküller SOR hasarına yatkın olsalar da bu hasardan en çok etkilenen moleküller lipitlerdir. Bu durumun sebebinin, lipitlerin çift bağ yapma eğiliminde olmaları ve lipitlerin hücre zarının her yerinde bulunmaları olduğu düşünülmektedir [118]. Memeli hücreleri, oksidatif strese oldukça elverişli olan

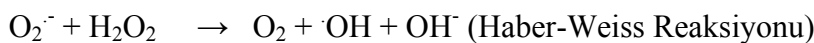
çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) miktarı açısından oldukça zengindir. Bu PUFA' lar trigliserit ve fosfolipitlerin yapı taşlarını oluşturan diğer yağ asitleri formu ile birlikte, linoleik ve araşidonik asiti de kapsar [119].



Şekil 1.14: Hücrede SOR oluşum yolları [120].

Başlangıç olarak SOR, ya diğer bir radikal ile reaksiyona girerek kovalent bir bağ kurar, ya da daha yaygın olarak, radikal olmayan bir başka molekülle reaksiyona girer (Şekil 1.14) [120]. Serbest radikaller radikal olmayan bir başka molekül ile reaksiyona girdiklerinde, radikal olmayan molekül bir elektron kaybederek serbest radikale dönüşür. Bu mekanizma hücre zarlarında meydana gelen yüksek miktardaki hasarı tetikleyen zincirleme reaksiyonların başlangıcı ya da temelidir. Bir radikal bir başka radikal ile birleştiğinde oluşan yeni ürün bir önceki radikalden daha fazla yıkıcı etkiye sahip olabilir. Örneğin; nitrik oksit (NO) süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ile birleştiğinde meydana gelen peroksinitrit radikali ($OONO\cdot$) hidrojen peroksitten (H_2O_2) 2000 kat daha fazla hasara neden olmaktadır. Bir başka deyiş ile iki radikalın birleşmesi zincirleme reaksiyonların başlamasına sebep olur. Lipitler ile SOR etkileşimi serbest demir atomu varlığında lipit peroksidasyonu ile sonuçlanır [121,122]. Serbest haldeki Fe^{+2} , H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur (Fenton reaksiyonu).

Hidroksil radikali bir başka şekilde, H_2O_2 ' nin, $O_2^{\cdot-}$ radikali ile birleşmesi ile meydana gelir ki, bu reaksiyon da Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılır [123].



Lipit peroksidasyonunu başlatan iki temel serbest radikal, hidroksil (OH \cdot) ve peroksinitrit radikalidir (OONO \cdot). Hidrojen peroksitin metallerle birleşmesi ile OH \cdot , O $_2^{\cdot-}$ 'nin NO ile birleşmesi ile de OONO \cdot oluşur. Peroksi radikal (RO $_2^{\cdot}$) formlarının oluşumu ile sonlanan lipit peroksidasyonu, OH \cdot ve OONO \cdot 'in PUFA' lardan bir proton çıkarılması ile başlatılır. RO $_2^{\cdot}$, hücre zarındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerine saldırarak lipit peroksidasyonundaki zincirleme reaksiyonları tetikler. Bu zincirleme reaksiyonlar, substrat tükeninceye (ör; hücre zarındaki lipitler) ya da RO $_2^{\cdot}$ 'nin bu zincirleme reaksiyonlarını kırabilecek (E vitamini gibi) bir antioksidan molekül ile karşılaşınca kadar devam eder [124].

Lipit peroksidasyonu, hücrelerdeki enzim sistemleri ve reseptörlerinin değişimine, iyon kanallarındaki değişimlere ve kalsiyum ile diğer iyonların zardan geçişinde artışa neden olarak, hücre zarlarında şiddetli hasara neden olur [119]. Bu olayın sonucunda lipit peroksidasyonu son ürünlerinin, inflamasyon ve apoptozu başlattığı, tiol içeren bileşikleri inaktive ettiği de düşünülmektedir [125,126].

Çizelge 1.4. Oksidatif stres ile meydana gelen Serbest Oksijen Radikalleri [127].

BİLEŞİK	ADI	ÖZELLİKLERİ
O $_2^{\cdot-}$	Süperoksit anyonu	Bir e $^-$ indirgenmiş form, birçok otooksidasyon reaksiyonunda oluşur.
HO $_2^{\cdot}$	Perhidroksi radikali	O $_2^{\cdot-}$ 'nin protonlanmış formu, lipitte çözünür.
H $_2$ O $_2$	Hidrojen peroksit	İki e $^-$ indirgenmiş form O $_2^{\cdot-}$. HO $_2^{\cdot}$ 'den dismutasyonla veya direkt O $_2^{\cdot}$ 'den oluşur.
HO \cdot	Hidroksil radikali	Üç e $^-$ indirgenmiş form. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile oluşur. Çok reaktiftir.
RO \cdot	Alkoksil radikali	Oksijen merkezli organik radikal, lipit alkoksi radikali.
ROO \cdot	Peroksil radikali	Organik hidroperoksitlerden oluşur.
ROOH \cdot	Organik hidroperoksit	Lipit hidroperoksit, timin hidroperoksit gibi.
1 O $_2$	Singlet oksijen	İlk uyarılmış form.

Hücre zarı, mitokondri, lizozom ve peroksizom gibi hücre organellerinin her birinde SOR meydana getiren sistemlerle bir arada yer alan antioksidan savunma mekanizmaları bulunur [128].

1.9. Antioksidanlar

Dokularda hasara yol açan ajanlardan birçoğu zararlı etkilerini serbest radikal diye adlandırılan reaktif türler aracılığı ile gerçekleştirirler. Serbest radikal, dış yörüngesinde bir veya birden fazla çiftlenmemiş elektron içeren atom veya organik ya da inorganik moleküllere verilen addır [129].

Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Bu sistemin düzenli işlemesi organizmanın sağlıklı yaşamını sürdürmesi bakımından oldukça önemlidir [130,131].

Normal koşullarda canlı organizmaların, serbest oksijen radikallerini metabolize edebilen enzimatik (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), sitokrom oksidaz gibi) ve non enzimatik (A, C ve E vitamini, glutatyon gibi) antioksidan savunma sistemleri vardır (Çizelge 1.5) [132].

Çizelge 1.5. Antioksidan Savunma sistemleri [32].

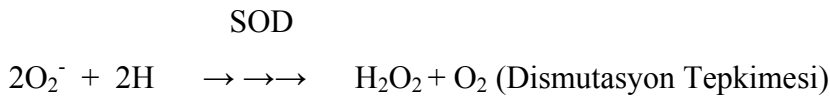
ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

<u>Enzim Sistemi</u>	<u>Radikal Tutucular</u>
Süperoksit Dismutaz	Suda Çözünenler Glutatyon
Glutatyon Peroksidaz	Vitamin C
Glutatyon Redüktaz	Sistein
Katalaz	Ürik asit
Glukoz 6-P-Dehidrogenaz	Yağda çözünenler Vitamin E
	Beta-karoten
	Bilurubin
	Flavonoidler
	Metal iyonu Bağlayanlar Transferin
	Seruloplazmin
	Haptoglobülin
	Albumin
	Hemopeksin
	Ferritin

Enzimatik antioksidanlar

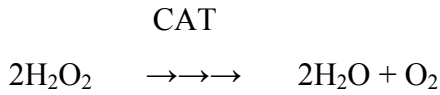
1. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD toksik süperoksit-radikalleri elimine eden, serbest radikallere karşı doğal bir defans sistemi olup, süperoksit anyonunun H_2O_2 ' ye dismutasyonunu katalizler [133,134].



2. Katalaz (CAT)

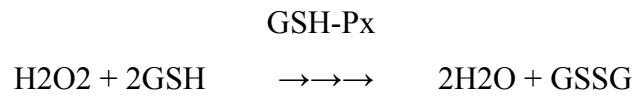
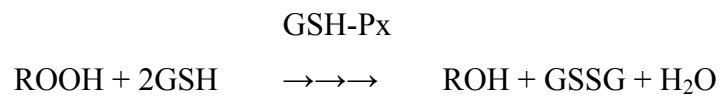
Katalaz; kanser, diyabet, katarakt, retinopati, ateroskleroz, İ-R hasarı, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir. Katalaz tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2), su ve moleküler oksijene dönüştürülerek metabolize edilmektedir [135].



Katalaz enzimi peroksizomlarda yerleşmiş olup yapısında dört tane hem grubu vardır. Peroksidaz aktivitesinde olan bu enzim hidrojen peroksit, metil peroksit gibi küçük moleküllere etki eder. Büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine etki etmez [136,137].

3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz primer enzimatik savunma sistemi olup, mitokondrilerde ve sitozolde bulunur. Hücreleri, organik hidroperoksitler ve hidrojen peroksitler tarafından oluşturulan oksidatif tahribata karşı korur. GSH-Px 2 adet glutasyon molekülünü 1 adet glutasyon disülfid'e okside etmektedir [137,138].



2.KAYNAK ÖZETLERİ

Yunancada yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir [24,25].

Baker ve arkadaşlar 1985 yılında iskemi ve reperfüzyona maruz kalan böbrekte serbest oksijen radikalleri hasarına karşı süperoksit dismutazın koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir [139].

Schumer M ve arkadaşları 1992 yılında morfolojik, biyokimyasal ve moleküler damgalı bir kombinasyonla doku hasarının değişik şekillerinde apoptozun ayırt edilebileceğini göstermişlerdir [140].

López-Neblina F ve arkadaşları 1994 yılında eksojen nitrik oksitin (NO) hasarlı sıçan böbreğini iyileştirici ve koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir [141].

Edelstein CL ve arkadaşları 1996 yılında sitoplazmik serbest kalsiyumun hipoksi ile indüklenen proksimal tübül hasarlarında rol oynadığını ileri sürmüşlerdir [142]. Yine Edelstein CL ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada sıçan proksimal tübüllerinde; 1) PD150606' in spesifik Kalpain inhibitörü olduğu 2) kalpainlerin aktif formunun izoenzim mu-kalpain olduğunu belirtmişlerdir [143].

Basile DP ve arkadaşları 1997 yılında iskemik hasardan sonra bax ve bcl-2' nin sıçan böbrek tübüllerindeki hasarı düzelttiğini gözlemlemişlerdir [144].

Kaushal GP ve arkadaşları 1998 yılında kaspazların birbiriyle uyumlu şekilde kademeli olarak hareket ettiklerini ve iskemik akut böbrek yetmezliğinde önemli rol oynadıklarını gözlemlemişlerdir [145].

Edelstein GP ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada kaspazların apoptik hücre ölümünden ayrı olarak nekrotik hücre ölümüne de katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir [146].

Shi Y ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmalarda; iskemi reperfüzyon hasarı esnasında kalpain aktivasyonunun kalpastatin' in aktivitesindeki azalma, kalpastatin proteininin baskılanması ve kaspaz-3' ün aktivasyonu ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir[147].

Chatterjee PK ve arkadaşları 2001 yılında kalpain inhibitörü-1' in sıçanlarda böbrek iskemi reperfüzyon hasarını azalttığını belirtmişlerdir. McDonald MC ve

arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada kalpain inhibitörü-1' in nükleer faktör-kappaB aktivasyonunu ve hemorajik şokta organ hasarını azalttığını belirtmişlerdir [148].

Zhang C ve arkadaşları 2002 yılında erişkin sıçan beyinde küresel beyin iskemisinden sonra kalpain ve kaspaz faaliyetlerin karşılaştırmışlar ve küresel beyin iskemisinde proteaz aracılı yaralanmaları azaltmak için önemli bilgiler elde etmişlerdir [149].

Kelly KJ ve arkadaşları 2003' te GTP' nin azalması sırasında p53' ün apoptozda önemli aracı olduğunu ve p53 inhibitörlerinin iskemik böbrek hasarının tedavisinde düşünülmesi gerektiğini bildirmişlerdir [150]. Perin C ve arkadaşları 2003' te kalpain ve kaspaz-3 inhibitörleri ile apoptozun azalması sonucunda iskemi reperfüzyon ile indüklenen hücre ölümünün gelişmesinden kalbi korunabileceğini bildirmişlerdir [151].

Sola A ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada adenozinin nitrik oksit üzerinden kaspaz-3 etkinliğini arttırdığını gözlemlemişlerdir [152].

Chatterjee PK ve arkadaşları 2005' te kalpain inhibitörlerinin böbrek fonksiyon bozukluğunu ve böbrek iskemi reperfüzyona neden olan yaralanmaların azalttığını bildirmişlerdir [153]. Tao Y ve arkadaşları 2005' te kaspaz inhibisyonunun tübüler apoptozunu ve çoğalmasını azalttığını ve polikistik böbrek hasarının ilerlemesini yavaşlattığını bildirmişlerdir [154]. Qiao X ve arkadaşları 2005' te mitokondriyal yolun renal iskemi reperfüzyon hasarındaki tübüler hücre apoptozunun yaşlanma ile artışından sorumlu olduğunu belirtmişlerdir. Renal iskemi reperfüzyon modelinde tübüler hücre apoptozu ile yaşlanmada artış olduğunu gözlemlemişlerdir [155]. Kher A ve arkadaşları 2005' te aprotininin böbrek iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruma sağladığını gözlemlemişlerdir [156].

Dingman A ve arkadaşları 2006' da aminoguanidin' in doku yaralanmalarında kalpain ve kaspaz 3 aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir [157]. Frangié C ve arkadaşları 2006' da yaptıkları çalışmada dışsallaştırılmış kalpainlerin akut böbrek yetmezliğinde tübül onarım süreci için kritik öneme sahip olduğunu bildirmişlerdir [158].

Chen LN ve arkadaşları 2008' de yeni doğan sıçanlarda hipoksik-iskemik beyin hasarı üzerine Kalpain inhibitörü-3' ün koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir [159]. Wu D ve arkadaşları 2008' de iskemi reperfüzyon sonrasında inositol 1,4,5-trifosfat reseptörleri ve L tipi kalsiyum kanallarının açılmasının renal tübüllerde apoptozu neden olduğunu bildirmişlerdir [160]. Chen H ve arkadaşları 2008' de yaptıkları çalışmada

Ozon oksidatif önkoşullamanın güçlü antiapoptik ve anti-enflamatuar özelliklere sahip olduğunu ve insan iskemik akut böbrek yetmezliği tedavisinde önemli sonuçlar doğurabileceğini belirtmişlerdir [161]. Sun M ve Xu C 2008' de Taurin' in iskekiye karşı koruyucu mekanizmasının m-kalpain ve kaspaz-3 aracılığı ile apoptik hücre ölümü yollarını engelliyor olabileceğini belirtmişlerdir [162]. Chaitanya ve arkadaşları 2008' de sıçan modelinde geçici fokal serebral iskei sırasında kalpain, katepsin-b ve kaspaz-3' ün aktif hale geldiğini gözlemlemişlerdir [163].

Covington MD ve arkadaşları 2009' da yaptıkları çalışmada kalpain-10' un hücre canlılığı için gerekli olduğunu ve böbrek yaşlanmasını azalttığını bildirmişlerdir [164]. Küçük A ve arkadaşları 2009' da yaptıkları çalışmada böbrek iskei-reperfüzyon hasarında Doksisiklin' in koruyucu etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir [165]. Kumar S ve arkadaşları 2009' da deksametazonun böbrek iskei-reperfüzyon hasarını düzelttiğini bildirmişlerdir [166].

Korkmaz A ve Kolankaya D 2010' da yaptıkları çalışmada reaktif oksijen türlerinin böbrek hasarına neden olan iskei reperfüzyonda önemli rol oynadıklarını ve rutin uygulamaların reaktif oksijen türlerinin inhibisyonu ve antioksidan aktivitesiyle böbreği koruyucu etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir [167]. Chok MK ve arkadaşları 2010' da Amifostinin reperfüzyon sonrasında serbest oksijen radikallerini temizleyerek ve tübüler hasar derecesini azalttığını bildirmişlerdir [168]. Hayashi T ve arkadaşları 2010' da yaptıkları çalışmada Karvedilol' ün iskei reperfüzyon hasarını düzelttiğini bildirmişlerdir [169].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Deneyde ağırlıkları 250 - 350 gr arasında değişen 32 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı.

3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Çalışmada 32 adet Wistar Albino cinsi, ağırlıkları 200-250 gr arasında, erkek ve sağlıklı sıçanlar kullanıldı. Denekler; 24 °C oda sıcaklığı, havalandırılmalı oda, % 70-80 nemli ortamı olan şartlarda, polikarbon kafeslerde su ve standart sıçan yemi ile beslenerek 1 hafta gözlemlenip çalışmaya başlandı. Çalışmaya kadar su ve yiyecek kısıtlaması yapılmadı. Sıçanlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda tutuldu.

- 1. Grup (Kontrol Grubu):** Bu grupta 6 sıçan kullanıldı. Genel anestezi altında karın bölgesinden sadece açma kapama yapıldı. 24 saat sonra böbrek doku örnekleri alındı.
- 2. Grup (Renal İskemi-Reperfüzyon Grubu):** Bu grupta 7 sıçan kullanıldı. Uygulanan iskemi modelini karşılaştırılmak için oluşturuldu. Deneklere sağ nefrektomi uygulanıp sol böbrek 30 dk iskemi ve 24 saat reperfüzyona maruz bırakıldı. 24 saat sonra böbrek dokuları alındı.
- 3. Grup (Renal İskemi-Reperfüzyon+AK295 Grubu):** Bu grupta 8 sıçan kullanıldı. İskemiden 30 dakika önce 2 mg/kg olacak şekilde tek doz AK295 kalpain inhibitörü intraperitoneal olarak uygulandı ve grup 2' ye uygulanan iskemi reperfüzyon yöntemi aynen uygulandı. AK295 DMSO solüsyonu içinde çözülerek verildi. 24 saat sonra böbrek dokuları alındı.
- 4. Grup (DMSO+ Renal İskemi - Reperfüzyon Grubu):** Bu grupta 6 sıçan kullanıldı. İskemi öncesi 2 mg/ kg DMSO solüsyonu uygulanıp grup 2' ye uygulanan iskemi reperfüzyon yöntemi aynen uygulandı. 24 saat sonra böbrek dokuları alındı.

3.2 Anestezi

Yapılan deneyde; anestezi için, Ketamin hidroklorür (Ketalar, Parke- Davis. Eczacıbaşı, İstanbul) 75 mg/kg ve 5 mg/kg Ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer İlaç) intramüsküler uygulandı.

3.3 İskemi – reperfüzyonun oluşturulması

Steril şartlarda, hayvanın vücut ısısı korunarak karın bölgesi traş edildi ve steril delikli örtüyle kapatıldı. Orta hat kesiyle karın içine ulaşıldı ve eksplorasyonda sağ ve sol renal arter ve ven bulundu ve askıya alındı. Sağ nefrektomi yapıldı. Ardından sol renal pedikül, mikrovasküler klemple oklüze edildi ve pulsasyon olmayışı ile arteriel kan akımının durduğu teyit edildi. İşlemler sonlanıncaya kadar sıvı kaybını önlemek için intraperitoneal izotonik verildi. 30 dakikalık iskemi sonrası mikrovasküler klemp açılarak arteriovenöz akımın tekrar başladığı, böbreğin renginin açılması ve pulsasyonun başlaması ile teyit edildi. 24 saat reperfüzyon sonunda sol nefrektomiyle biyokimyasal inceleme için doku örneği ile intrakardiyak ponksiyonla biyokimyasal inceleme için 5 cc kan örneği alındı ve deney sakrifikasyonla sonlandırıldı.

3.4 AK295 Uygulanması

Bu çalışmada kullanılan AK295 Calbiochem GmGH (Kimeks Kimya, İstanbul) sağlandı. Sıçanların 8 tanesine iskemiden 30 dk önce tek dozda 2 mg/kg AK295 intraperitoneal olarak verildi. 5 mg AK295, 10 ml DMSO' da çözünecek şekilde (1 ml DMSO solüsyonunda 0,5 mg AK295) hazırlandı ve intraperitoneal olarak uygulandı.

3.5 Western Blot Çalışması

Western blotlama ya da immunoblotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir [170].

Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (blc-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (kaspaz-3) saptanması mümkündür [171].

Deney protokolü

1. İmmunoblot için böbrek dokusu 1:20 oranında PBS içerisinde homojenize edildi (MP Fast Prep24).
2. Homojenatlar 10 000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi (Thermo Scientific) .
3. Süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı.
4. Örnekler için süpernatantlar SDS-PAGE' de 100 V' de 75 dk yürdürüldü (Bio Rad).
5. SDS-PAGE jeli kuru ortamda PVDF membrana aktarıldı (Nu-Page 4-12% Bis-Tris Gel 1,00mm X 10 Well) .
6. PVDF membran bloklama solüsyonunda 30 dk bekletildi (WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection) .

<i>Bloklama solüsyonu</i>	Ultra saf su	5 ml
	Bloke edici/ Seyreltici A	2 ml
	<u>Bloke edici/ Seyreltici B</u>	<u>3 ml</u>
	Toplam Hacim	10 ml

7. 20 ml su ile membran 5 dk yıkandı. Yıkama işleminden sonra aktif kaspaz 3 proteinine bağlanabilecek 10 ml primer antikor (1:1000) solüsyonu ilave edilip 1 saat inkübe edildi.

<i>Birincil Antikor Seyreltici</i>	Ultra saf su	7 ml
	Bloke edici/ Seyreltici A	2 ml
	<u>Bloke edici/ Seyreltici B</u>	<u>1 ml</u>
	Toplam Hacim	10 ml
	Birincil antikor konsantrasyonu 1:1000	

8. İnkübasyon sonunda membran 20 ml antikor yıkama solüsyonu ile 5 dk yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu işlem 3 kere tekrar edildi.

<i>Antikor Yıkama</i>	Ultra saf su	150 ml
	<u>Antikor yıkama solüsyonu (16X)</u>	<u>10 ml</u>
	Toplam Hacim	160 ml

9. 10 ml ikinci antikor solüsyonu ilave edilip 30dk inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonunda membran 20 ml antikor yıkama solüsyonu ile 5 dk yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu işlem 3 kere tekrar edildi.
11. 20 ml su ile membran 2 dk yıkandı. Bu işlem 2 kere tekrar edildi.
12. Yıkama işleminden sonra invitrogen boya ayırıcı (% 10 Etanol % 7,5 Asetik asit) ilave edilerek hedef protein aktif kaspaz 3'ün varlığı belirlendi.
13. Kodak İmage Station 4000mm Pro ile görüntü alındı.

3.6. Böbrek Doku Enzim Analizleri

Dondurulmuş böbrek doku örneklerinin ağırlıkları ölçüldü ve böbrek dokuları 1/5 w/v oranında PBS tamponu (pH 7,4) eklenerek buz izolasyonu altında tüm dokular parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenattan 1 mL MDA ölçümü için ayrıldı. Kalan homojenatlar, sonifikatörde 30 saniyelik aralıklar ile 4 kere tekrarlanmak üzere 15 saniye sonifiye edildi. Sonifiye işlemlerinin ardından 10.000 g' de 4 °C' de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Böylece enzim aktiviteleri ve protein tayinin yapılacağı süpernatant elde edildi. Süpernatant örnekleri ölçüm işlemleri yapıncaya kadar -70 °C' de derin dondurucuda saklandı. Süpernatantın protein içeriği Bradford yöntemi ile saptandı [172].

3.6.1.Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev alan SOD enziminin aktivite tayini McCord J.M, Fridovich I yöntemine göre yapılmış olup yöntemin esası ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin *sitokrom-c'* yi indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanır [173].

Süperoksit dismutaz çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksit (O_2^-) radikalinin hidrojen peroksit (H_2O_2) dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. SOD enzim aktivitesi

ksantin – ksantin oksidaz (XO) sistemi ile üretilen O_2^- radikallerinin *sitokrom-c'* yi okside etmesi sonucu oluşan renk değişimi 550 nm' de takip edilerek belirlendi. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi. Bu reaksiyonu % 50 inhibe eden örneklerdeki SOD miktarı 1 Unite (U) olarak kabul edildi ve sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

Gerekli çözeltiler:

A çözeltisi:

- 5 µmol ksantin 0.001 N NaOH' daki çözeltisi: 10 hacim
- 2 µmol *sitokrom-c'* nin 50 mM pH 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi: 100 hacim

A çözeltisi belirtilen hacim oranlarında karıştırılarak hazırlanır. Bu çözelti 4°C ' de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi:

- Ksantin oksidazın 0.1 mM EDTA' daki çözeltisi 0.2U/mL

B çözeltisi deneyden önce taze olarak hazırlanır.

Yöntem:

3 mL' lik spektrofotometre küvetine 2.9 mL A çözeltisi eklendi. 50 µL örnek ilave edildi. Tepkime 50 µL B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı. Daha sonra Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 550 nm'deki absorbans değişimi (1dk.) okundu. Kör okuması yapılırken örnek yerine 50µL distile su eklendi. Örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplandı.

3.6.2. Katalaz Aktivite Tayini

Katalaz aktivitesi tayininde kullanılan ve Beers ve Sizer tarafından geliştirilen ve Luck tarafından modifiye edilen yöntem, H_2O_2 ' nin Katalaz tarafından O_2 ve H_2O ' ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorbans değişiminin ölçümü esasına dayanmaktadır [174,175].

Gerekli çözeltiler:

- 1/15 M konsantrasyonda Na, K-fosfat tamponu (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) pH: 7
- Derişik H_2O_2

Yöntem:

Spektrofotometrede 240 nm' de absorbans 0.7–0.9 oluncaya kadar Na-K-fosfat tampon çözeltisine derişik (% 35' lik) H₂O₂ ilave edildi. Numunelerin katalaz içeriğini belirlemek için hazırlanan bu karışımdan 1000 µl alınıp küvete kondu ve üzerine çalışma aralığına bağı olarak 30 µl başlayarak gittikçe artan konsantrasyonlarda süpernatant eklendi ve bir kez karıştırılıp Shimadzu 1601-UV visible spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 sn süreyle H₂O₂' nin ($\epsilon = 0,0396 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$) absorbans değışimi okundu. Okunan bu optik dansite farkından yola çıkarak örneklerdeki mg protein içindeki enzim ünite sayısı hesaplandı.

3.6.3. Malondialdehit Ölçümü

Reperfüzyon süreci sonunda artan serbest radikal yapımının bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri Beuge J.A yöntemine göre belirlenmesiyle bulundu [176].

Gerekli çözeltiler:

- % 15' lik TCA çözeltisi: 1 hacim
- % 0.375' lik TBA çözeltisi: 1 hacim
- 0.25 N' lik HCl çözeltisi: 1 hacim

Yukarıdaki üç çözeltinin hassas bir şekilde hazırlanıp belirtilen hacim oranlarında karıştırılmasıyla bir solüsyon hazırlandı.

Yöntem:

10 mL' lik santrifüj tüpleri alındı ve bütün tüplere hazırladığımız solüsyondan 4 mL konuldu. Kör tüpleri hariç tutularak örnek tüplerine 1 mL homojenat konuldu. Bir kez şiddetli şekilde karıştırıldı. Kaynar suda (95–100 °C' de) 30 dk bekletildi. Daha sonra tüpler soğutuldu ve 3500 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanın Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometresinde 535 nm' deki MDA-TBA kompleksi 'nin absorbansı okunarak malondialdehit miktarı hesaplandı.

3.7. Serum Biyokimya Analizleri

BUN, kreatinin çalışılmak üzere portal venden alınan 5 cc' lik kan örnekleri biyokimya tüpü içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. 3000 devir/dakika hızda 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Ayrılan serumlar analiz gününe kadar -70°C' de dondurularak saklandı. Serum Üre ve Cr seviyeleri OLYMPUS AU-640 model analizatörde ölçüldü. Üre ve Cr renal fonksiyon tespiti için kullanıldı.

3.8. İstatiksel analiz

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS.15 paket programı yardımı ile değerlendirilmiştir. Biyokimyasal verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında gruplar arasında ki farkların incelenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Anlamlılık seviyesi olarak 0.05 alınmış olup, $p>0.05$ olması durumunda gruplar arasında anlamlı farklılığın olmadığı, $p<0.05$ olması durumunda gruplar arasında anlamlı farklılığın olduğu belirtilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

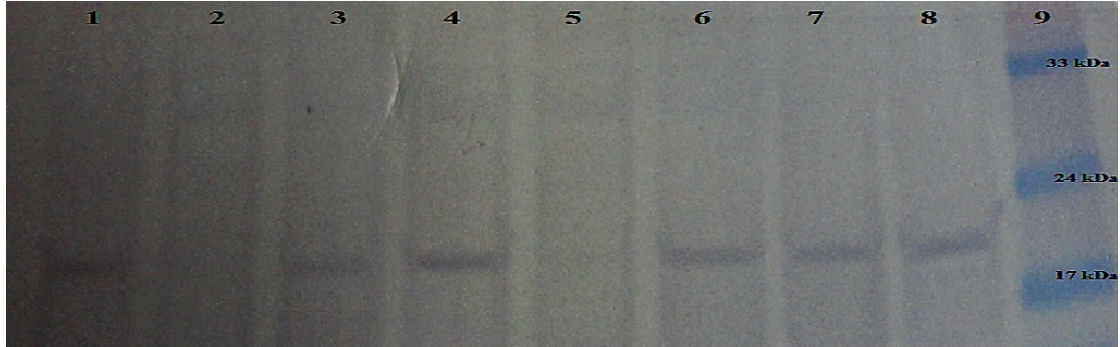
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Western Blot Sonuçları:

Western-Blot uygulaması ile kaspaz-3' e özgü antikorlar kullanılarak, SDS-PAGE yapılan jelde kaspaz-3 enziminin varlığı, oluşan bantlara bakılarak tespit edildi.

Çizelge 4.1. Grupların Jeldeki Sıralaması

1-2	3-4	5-6	7-8	9
Kontrol	İskemi Reperfüzyon	İskemi Reperfüzyon + AK295	İskemi Reperfüzyon + DMSO	Standart



Şekil 4.1. Western Blot yöntemi ile elde edilen Kaspaz-3' ün görüntüsü

Şekilde görüldüğü gibi kontrol grubunda (2) herhangi bir hasar olmadığından dolayı, kaspaz-3 enzimi için belirleyici olan standartta 17 kDa' ya karşılık gelen bölgede herhangi bir bant gözlenmemiştir. Böbrek iskemisi yapılan grupta (3-4) ise belirgin bantlar oluşmuştur. Bu bant kaspaz-3 (17 kDa) enziminin varlığını ve dolayısıyla apoptozun gerçekleştiğini gösterir. İskemi + Ak295 grubunda (5) ise kalpain inhibitörü olan AK295' in oluşan iskemik hasarı önlemesi nedeniyle bant görülmemektedir. İskemi + DMSO grubunda (7-8) ise apoptoz nedeniyle belirgin bantlar oluşmuştur.

4.2. Böbrek Doku Enzim Sonuçları

Yapılan çalışmalar sonucunda kontrol ve uygulama gruplarına ait böbrek dokusunda SOD, Katalaz ve MDA değerleri çizelge 4.2 ve şekil 4.2-4'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Böbrek Doku Enzim Sonuçları

Gruplar	Katalaz	SOD	MDA
Kontrol (n=6)	132 ± 6.82 ^{a,b}	25 ± 2.61	0.24 ± 0.03 ^{a,b,c}
İskemi – Reperfüzyon (n=7)	143 ± 20.83	28 ± 6.01	0.42 ± 0.15 ^a
İskemi – Reperfüzyon + AK295 (n=8)	163 ± 11.43 ^a	27 ± 3.61	0.38 ± 0.03 ^b
İskemi – Reperfüzyon + DMSO (n=6)	149 ± 10.58 ^b	25 ± 4.95	0.48 ± 0.12 ^c

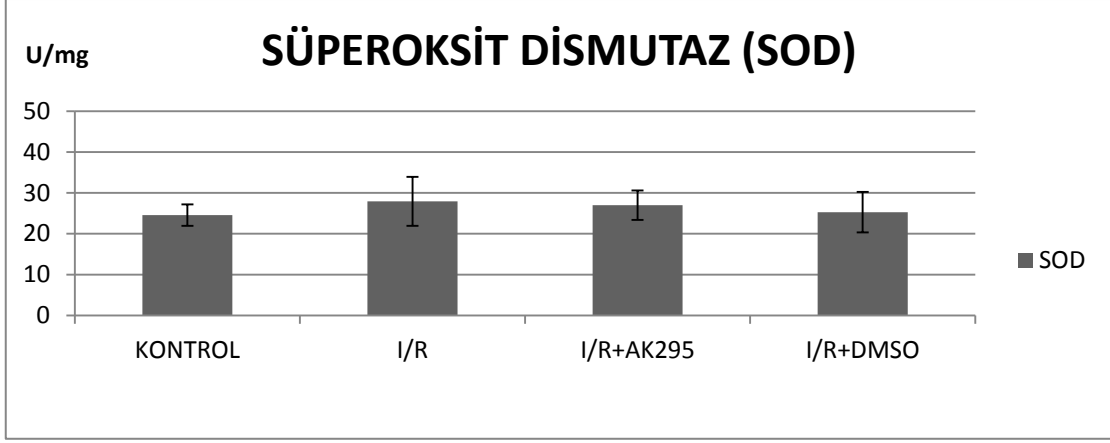
p < 0.05 için;

Kontrol ile İ/R = a Kontrol ile İ/R + AK295 = b Kontrol ile İ/R + DMSO = c

4.2.1. Doku SOD Değerleri

Böbrek SOD enzim aktiviteleri (±SD) ; kontrol grubunda ortalama 25 ± 2.61, I/R grubunda 28 ± 6.01, I/R + AK295 grubunda 27 ± 3.61, I/R + DMSO grubunda ise 25 ± 4.95 U/mg protein olarak hesaplandı.

Böbrek dokusu SOD enzim aktivitesi bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

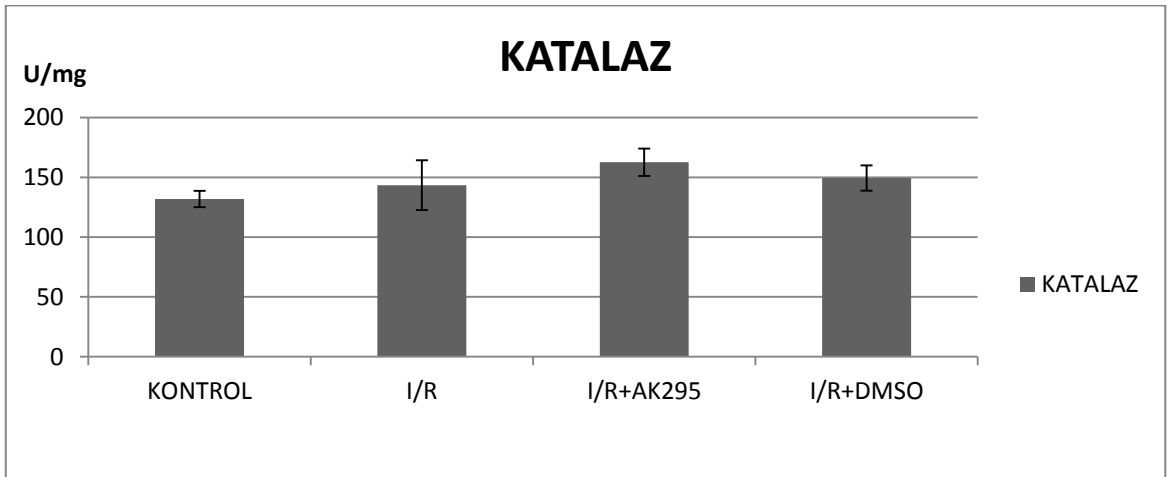


Şekil 4.2. Ortalama SOD Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

4.2.2. Doku Katalaz Değerleri

Böbrek katalaz enzim aktivite (±SD); kontrol grubunda ortalama 132 ± 6.82 , I/R grubunda 143 ± 20.83 , I/R + AK295 grubunda 163 ± 11.43 , I/R + DMSO grubunda ise 149 ± 10.58 U/mg protein olarak hesaplandı.

I/R + AK295 ve I/R + DMSO değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) derecede yüksek olduğu bulunmuştur. İ/R ile I/R + AK295 ve I/R + DMSO değerleri arasında fark anlamlı düzeyde bulunmamıştır.

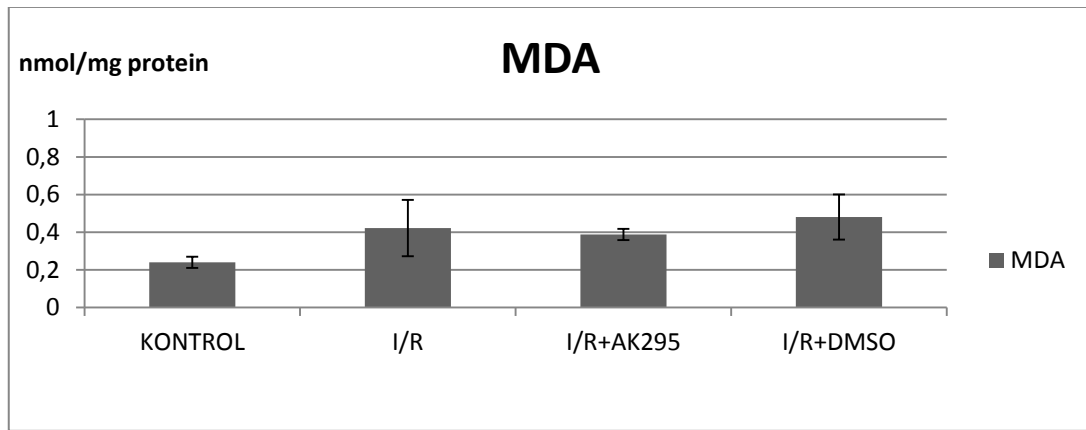


Şekil 4.3. Ortalama Katalaz Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

4.2.3. Doku MDA Değerleri

Böbrek MDA enzim aktiviteleri (\pm SD); kontrol grubunda ortalama 0.24 ± 0.03 , I/R grubunda 0.42 ± 0.15 , I/R + AK295 grubunda 0.38 ± 0.03 , I/R + DMSO grubunda ise 0.48 ± 0.12 nmol/mg protein olarak hesaplandı.

İ/R, İ/R + AK295 ve İ/R + DMSO değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Diğer gruplar arasında herhangi bir fark bulunmadı.



Şekil 4.4. Ortalama MDA Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

4.3. Serum Üre ve Kreatinin sonuçları

Yapılan çalışmalar sonucunda kontrol ve uygulama gruplarına ait serum Üre (BUN) ve değerleri çizelge 4.3 ve şekil 4.5-6' da verilmiştir.

Çizelge 4.3. Serum BUN ve Kreatinin Sonuçları

Gruplar	BUN	Kreatinin
Kontrol	35 ± 22.3 ^{a,b,c}	0.64 ± 0.09 ^{a,b,c}
İskemi – Reperfüzyon	156 ± 9.01 ^a	3.6 ± 0.23 ^a
İskemi – Reperfüzyon + AK295	151 ± 5.8 ^{b,d}	3.76 ± 0.13 ^{b,d}
İskemi – Reperfüzyon + DMSO	165 ± 6.1 ^{c,d}	3.4 ± 0.28 ^{c,d}

$p < 0.05$ için;

Kontrol ile İ/R = a

Kontrol ile İ/R + AK295 = b

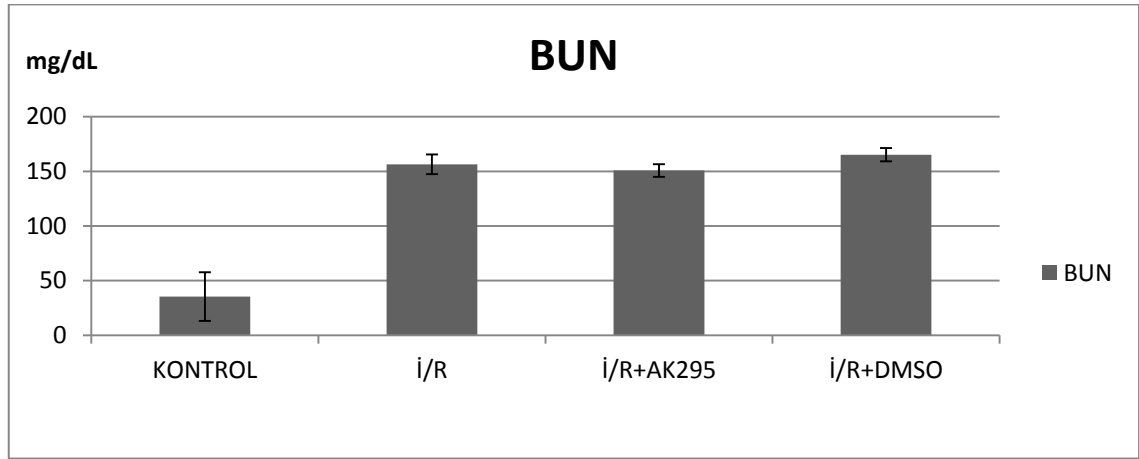
Kontrol ile İ/R + DMSO = c

İ/R + AK295 ile İ/R + DMSO = d

4.3.1. Üre (BUN) Değerleri

Yapılan biyokimyasal değerlendirme sonucu ortalama üre değerleri (\pm SD); kontrol grubunda 35 ± 22.3 , I/R grubunda 156 ± 9.01 , I/R + AK295 grubunda 151 ± 5.8 , I/R + DMSO grubunda ise 165 ± 6.1 mg/dL olarak bulundu.

İ/R, İ/R + AK295 ve İ/R + DMSO değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca İ/R + AK295 değeri de İ/R + DMSO grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) derecede düşük olduğu bulunmuştur. İ/R ile İ/R+AK295 ve İ/R ile İ/R+DMSO grupları arasında ise anlamlı fark bulunmadı.

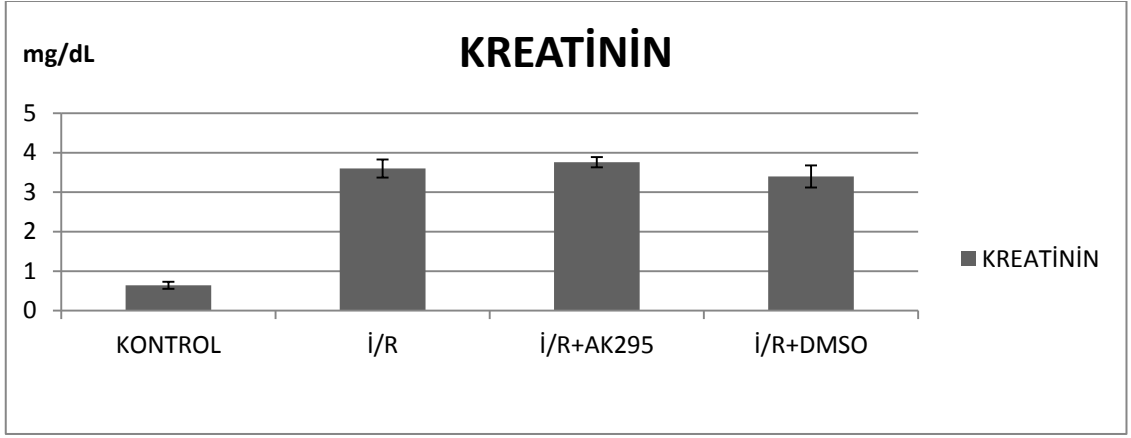


Şekil 4.5. Ortalama BUN (Üre) Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

4.3.2. Kreatinin Değerleri

Yapılan biyokimyasal değerlendirme sonucu ortalama kreatinin değerleri (\pm SD); kontrol grubunda 0.64 ± 0.09 , I/R grubunda 3.6 ± 0.23 , I/R + AK295 grubunda 3.76 ± 0.13 , I/R + DMSO grubunda ise 3.4 ± 0.28 mg/dL olarak bulundu.

İ/R, İ/R + AK295 ve İ/R + DMSO değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca İ/R + AK295 değeri de İ/R + DMSO grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) derecede yüksek olduğu bulunmuştur. İ/R ile İ/R+AK295 ve İ/R ile İ/R+DMSO grupları arasında ise anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.6. Ortalama Kreatinin Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İskemi, bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesi veya durmasıdır. Reperfüzyon ise iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır [177,178]. Renal iskemi reperfüzyon hasarı sırasında iskemi döneminde böbrek korteks ve medullasına olan kan akımı kesilmekte, reperfüzyonu takiben doku kanlanması olmaktadır. Fakat bu reperfüzyon sırasında böbreğin her yeri eşit olarak kanlanmamakta, bazı yerlerde devam eden hipoksi olurken bazı yerlerde aşırı reperfüzyona bağlı ödem gelişebilmektedir [179]. Hipoksi sonrasında değişen hücre içi mekanizmalar yüzünden hücrelerde farklı yanıtlar lokal veya sistemik olmaktadır [180].

Apoptoz farklı şekillerde uyarılan genler ile hücrelerin, programlanmış bir şekilde ölmesidir. Bu mekanizmada bcl, bax gibi farklı genler aktive olmaktadır. Kaspaz-3, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun bozulmasını takiben sitokrom yapısının artması ve sitozolde düzeyinin artmasıyla aktive olan apoptik yolun en önemli göstergesidir [181]. Hipoksik ortamda hücrelerin apoptoza gitmesi sonucu bu hücrelerde kaspaz-3 aktivitesi artmaktadır. Farklı iskemik doku çalışmalarında hipoksi ile apoptoz kaspaz-3 aktivitesi gösterilmiştir [182]. Jani A ve arkadaşları kaspaz inhibisyonunun böbrek korunmasında faydalı olabileceğini bildirmişlerdir [183]. Kalpainler de en az kaspazlar kadar apoptozdan sorumlu, MSS' de sitozolde bulunan nötral proteazlardır ve kalsiyum bağımlıdır [99]. Mitokondri aracılı prokaspaz-9 salınımını tetiklerken aynı zamanda kaspaz kaskadının ortak son etkin mediatorü olan kaspaz-3' ün de artmasına neden olurlar. Böylece kalpainler apoptoz mekanizmasında çok önemli bir yer edinirler [70,85,99].

Kalpainler lizozomsuz kalsiyum bağımlı hücre içi proteazlardır [89,184]. Kalpain aracılı proteoliz; hücre iskeleti proteinleri, membran proteinleri, kinazlar, fosfatazlar ve transkripsiyon faktörleri için seçicidir [184,185]. Kalpain izoformları bütün omurgalılarda bulunmaktadır. Kalpain inhibitörlerinin etkileri canlı sistemlerde değişken olan hücre tipi ve yaralanma türüne göre değişkenlik gösterir [186,187,188]. Kalpainlerin sinyal iletimi, hücre çoğalması, farklılaşma, apoptoz ve trombosit aktivasyonu gibi kalsiyum ile düzenlenen çeşitli olaylarda rol oynamasına rağmen fizyolojik fonksiyonu hala tam olarak anlaşılammıştır [184,189,190,191]. Kalpainler nöronal dejenerasyon, Alzheimer, metastaz ve katarakt gibi çeşitli patolojik durumlardan sorumlu tutulmaktadır. Kalpainlerin üç boyutlu yapısının aydınlatılması ve

kalsiyum aktivasyon mekanizmalarının indüklenmesi ile kalpain gen mutasyonları ve insan hastalıkları arasındaki ilişkiler keşfedilince kalpainler daha çok dikkat çekmeye başladı [103,192,193]. Kalpain proteazlar sitoskeletal ve hücre zarı metabolizma olaylarında merkezi bir rol oynar ve iskemi reperfüzyon hasarı ile aktif hale getirilebilir [89,143,194,195,196]. Kalpain proteazlar; beyin, miyokard ve renal tübüler hücre dahil olmak üzere çeşitli hayvan modellerinde iskemi reperfüzyon yaralanma patogeneğinde rol oynamaktadır [143,194,197]. Yapısal proteinler ve diğer mikrotübüler proteinler kalpain proteaz tarafından kısmen yıkıma uğratılır [89,184]. Kalpain proteazlar sinyal proteazları gibi davranarak protein kinaz c' yi aktive ederek hücre hasarına yol açan çeşitli yolların aktivasyonuna neden olabilir [184,198].

Kalpain inhibitörleri serebral iskemi ve beyin travması modellerinin birçoğunda proteolizi ve hücre ölümünü azaltmıştır [195,197,199]. Kalpain çeşitli apoptik ve nekrotik koşullarda aktif hale gelirken kaspaz-3 ise sadece nöronal apoptozda aktif hale gelir [96]. Kaspazların substratları sitoskeletal ilişkili proteinler, kinazlar, apoptoz ilişkili bcl-2 ailesinin üyeleri ve DNA modülatör enzimleridir. Kalpainlerin substratları sitoskeletal ilişkili proteinler, kinazlar, fosfatazlar, membran reseptörleri ve taşıyıcılarıdır [96].

Bir kemirgen modelinde kalpain ve kaspaz inhibitörlerinin serebral iskemide farklı mekanizmalarla beyin dokusunu korudukları belgelenmiştir [96]. Schnellmann RG ve Williams SW tavşan böbreğinin proksimal tübül hücrelerinde kalpain inhibitörleri ile kalpainlerin aktif bölgesini veya kalsiyum bağlayıcı bölgesini engelleyerek kalpainlerin aktivitesini azaltmışlardır. Kalpain aktivitesinin inhibisyonu ile Antimisin A (mitokondrial inhibitör), Tetrafloroetil-L-sistein (nefrotoksik halo karbon) ve iyonomin (Ca⁺² iyonofor) gibi çeşitli toksik maddeler tarafından üretilen hücre ölümü azalmıştır [200]. Kalpain inhibitörlerinin erişkin sıçan serebral iskemi modellerinde nöron koruyucu etkisi gösterilmiştir. Hipoksik iskemi sonucunda kalpain inhibitörü-3' ün kalpain ve kaspaz-3' ün ekspresyonlarını azaltarak sinir nekrozu ve apoptozuna müdahale eder ve neonatal beyin hasarına karşı koruyucu etki gösterir [159].

Çalışmamızda karakteristik özellikleri sayesinde diğer kalpain inhibitörlerine göre daha kuvvetli etki gösteren AK295' i kullandık. Kalpain İnhibitörü AK295' in; fokal iskemide bağlı nöronları koruduğu ve deneysel beyin hasarını izleyen motor ve bilişsel hasarı azalttığını belirtilmiştir [195,199].

Mathur P ve arkadaşları ışık saçılmasının azaltılması için kalpain inhibitörlerini karşılaştırmışlardır. *AK295*, *SJA6017* ve *MDL28170* gibi kalpain inhibitörleri kullanımının katarakt tedavisi için umut verici bir yaklaşımı temsil ettiklerini belirtmişlerdir [201]. Saatman KE ve arkadaşları Sıçanlarda seçici kalpain inhibitörü olan *AK295* uygulanması ile beyin travması sonrasında motor ve bilişsel işlev bozukluğunun azaldığı gözlemlenmiştir [202].

DeBiasi RL ve arkadaşları *AK295*' in inhibisyonunun virüs kaynaklı apoptik miyokard hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Reovirüs ile enfekte yenidoğan farelerin tedavisinde *AK295*' in reovirüs miyokarditine karşı koruyucu etkileri belgelenmiştir. *AK295*' in etkisi ile (i) miyokard hasarının azaldığı, (ii) serum kreatin fosfokinazında azalma olduğu, (iii) ağırlık artışının düzelme olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular viral hastalıkta apoptik hücre ölümü ile kalpain ilişkili yolun önemi için ilk kanıtlardır [203].

Wang MS ve arkadaşları *AK295*'in duyuşal sinir köklerinin aksonal dejenerasyon derecesini azalttığını gözlemlədiler. Kalpain inhibitörü *AK295*' in taxolün klinik ve patolojik etkilerini azaltabileceğini ve sistemik kalpain inhibisyonunun taxol ile tedavi edilen hastalarda nörapatinin önlenmesi için iyi bir strateji olabileceğini belirtmişlerdir [204].

Colak A ve arkadaşları *AK295*' in kalpain bağımlı yollardan apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir. *AK295*' in nöronlar için yeni bir terapötik bileşik olduğunu ve SCI olan hastalarda fonksiyonların düzelebileceğini belirtmişlerdir [205].

Yapılan kaynak taramalarında renal iskemi reperfüzyon hasarında kalpain inhibitörü olan *AK295*' in etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamız, renal iskemi reperfüzyon hasarında *AK295*' in kaspaz-3' e olan etkinliğini araştıran literatürdeki ilk çalışmadır.

Çalışmamız 30 dakika iskemi sonrası 24 saat reperfüzyona bırakılan Wistar albino erkek sıçanlarda yapıldı. Çalışmada apoptozun göstergesi olan Kaspaz-3' e Western Blot yöntemi ile bakıldı. Çalışmamızda antioksidan enzimlerden SOD ve katalaz ile birlikte lipid peroksidasyonunun son ürünü olan ve lipid peroksidasyonu derecesini gösteren MDA konsantrasyonu ile reperfüzyon hasarı değerlendirildi. Ayrıca serum üre ve kreatinin seviyelerine bakılarak böbrek hasarı değerlendirildi.

Western Blot sonuçlarına göre kontrol grubundaki deneklerin birinde apoptozun olmadığı, renal iskemi reperfüzyon oluşturulan İR ve İR+DMSO gruplarında apoptozun göstergesi olan kaspaz-3 miktarının arttığı gözlemlenmiştir. *AK295* uygulanan grupta

ise aktif kaspaz-3 miktarının iskemi yapılan gruplara oranla daha az olduğu ya da olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre kalpain inhibitörü olan AK295' in renal iskemi reperfüzyon yapılan sıçanlarda apoptozu kısmen önlediği sonucuna varılmıştır.

Normal bir insan böbreğinde, bir saatten kısa süren sıcak iskemi, geçici disfonksiyondan başka hasar yapmazken, üç saat ve daha uzun süren sıcak iskemi ise geriye dönüşü olmayan hasara neden olmaktadır [205]. Deneysel olarak İ/R ile oluşturulmuş böbrek hasarında, serbest oksijen radikalleri direk hücrede hasara yol açmakta ve bu hasarın şiddetine göre hücre ya apoptoz ya da nekroz ile ölüme gittiği gösterilmiştir [14].

Dokuda meydana gelen iskemi, yüksek miktarda SOR oluşumuna neden olmasının yanında, lokal ve sistemik böbrek yetmezliğine de neden olur. İskemi sonrasında dokuda nötrofil göçünün artması ve aktive olan nötrofillerin, dokuda oluşan SOR' un temel kaynağı olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir [206].

SOR canlı yapıdaki biyomoleküllerle reaksiyona girerek dokudaki hasarı artırır [20,207]. SOR oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya SOR toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler [2].

Günümüzde yapılan birçok çalışma, kalp, karaciğer, beyin, barsak ve böbreklerde İ/R hasarının bazı antioksidanlar ile belli ölçülerde önlenebildiğini göstermektedir [15,208].

Antioksidan enzim sisteminde yer alan enzimlerden en önemlisi süperoksit radikalini moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüştüren reaksiyonu katalizleyen SOD' dur [209,210]. Süperoksit dismutaz (SOD), bir metalloenzimdir. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. Süperoksidin hidrojen peroksit'e dönüşümü reaksiyonunu katalizler. Süperoksit dismutaz, bu reaksiyonda hem oksidan hem de redüktan olarak hareket eder ve bilinen en hızlı etki gösteren enzim sistemidir ancak difüzyon hızı sınırlıdır [211]. Oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı SOD, katalaz ve glutatyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır. Böylece oluşan hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. Peroksit radikalinin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit doku için biyolojik avantaj sağlar. SOD' un görevinin aerobik organizmaları, süperoksitin zararlı etkilerine karşı korumak olduğu sanılmaktadır [212,213]. Enzim, hücrede değişik kompartmanlarda bulunmaktadır. Sitozolik ve ekstrasellüler enzim, her biri içinde bir

ekivalan bakır (Cu^{+2}) ve çinko (Zn^{+2}) taşıyan birbirine benzer iki alt üniteden meydana gelir. Fakat mitokondriyal enzim, bakterilerde bulunana benzer şekilde sadece manganез (Mn^{+2}) içerir. Süperoksit dismutaz bütün temel aerobik dokularda bulunmaktadır [173].

Çalışmamızda, SOD enzim düzeyi artmasına rağmen kontrol grubuna ait SOD değeri ile İ/R, İ/R + AK295 ve İ/R + DMSO gruplarına ait SOD değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenemedi. Özellikle kısa zamanlı (30 dakika) I/R modellerinde SOD aktivitesinde artış olmadığı buna karşın 60 ve 90 dakika gibi uzun iskemi uygulanan I/R modellerinde anlamlı SOD artışı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [214]. Dolayısıyla uygulanan iskemi süresi SOD aktivitesinin belirginleşmesinde çok önemli gibi görünmektedir. Sıçanlarla yapılan deneysel hayvan modellerinde 45 ve 60 dakikalık iskemi uygulandığında iskemik hasar oluştuğu gösterilmiştir [215,216].

Katalaz, her biri 500 amino asitten oluşan dört hem proteini içeren tetramer yapıda bir hemoproteindir. Optimum etkisini nötral pH ortamında gösterir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoz membranlarda bol miktarda bulunmaktadır. Katalaz hidrojen peroksit (H_2O_2)'den başka formaldehit, formik asit ve alkoller de oksidize edebilir. Ancak siyanid ($:\text{C}_-\text{N}$) ve kürar gibi zehirler ile enzim aktivitesi inhibe olur. Katalaz iki hidrojen peroksit molekülünden birini elektron vericisi, diğerini de elektron alıcısı olarak kullanarak su ve oksijen meydana getirir [217]. Katalaz enzim sistemleri içinde en yüksek oranda molekülü indirgeyen enzimdir. Bir molekül katalaz dakikada 5 milyon molekül hidrojen peroksit (H_2O_2)' i su (H_2O) ve oksijen (O_2) molekülüne indirger. Çalışmamızda, gruplara ait katalaz enzim düzeyleri karşılaştırıldığında İ/R, İ/R+AK295 ve İ/R + DMSO gruplarına ait katalaz düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır. Fakat iskemi reperfüzyon yapılan grupları kendi arasında karşılaştırdığımızda İ/R + AK295 ve İ/R + DMSO gruplarındaki katalaz düzeylerinin İ/R grubuna göre anlamlı olmayan şekilde arttığı gözlemlendi.

Renal I/R sırasında üretilen serbest radikaller lipid peroksidasyonu ile yapısal ve fonksiyonel olarak hücre hasarına neden olurlar [209,210]. Serbest oksijen radikalleri çok reaktif olmaları nedeni ile direkt olarak ölçülemez. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak en sık kullanılan ve doku hasarı konusunda fikir veren bu moleküllerden birisi MDA' dır [209,218]. 1980' li yıllardan beri oksidatif doku hasarının göstergesi olarak, serum ve doku MDA değerlerine bakılmakta olduğunu belirten Singh ve Chopra sıçanlarda yaptıkları renal İ/R' de renal oksidatif doku hasarının göstergesi olarak doku MDA düzeylerine bakmışlardır. Bu çalışmada da doku

hasarının göstergesi olarak renal doku MDA değerlerine bakılmış olup ve İ/R grubunda MDA değerlerinin diğer gruplara oranla belirgin olarak arttığı gösterilmiştir [219]. Biz de çalışmamızda lipid peroksidasyonunu ve hücrel hasarı değerlendirmek üzere MDA düzeylerini inceledik.

Çalışmamızda, gruplara ait MDA değerleri karşılaştırıldığında İ/R, İ/R + AK295 ve İ/R + DMSO gruplarına ait MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. Çalışmamız da saptanan böbrek doku MDA düzeyleri literatür bilgisiyle uyumlu olup serbest oksijen radikallerine bağlı böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında MDA' nın anlamlı derecede yükseldiğini göstermektedir.

Renal fonksiyon bozukluğu sonucunda meydana gelen plazma kreatinin, üre seviyelerindeki artış, böbrek IR hasarının biyokimyasal sonuçlarından birkaçıdır. Tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da serumda üre ve kreatinin seviyelerindeki artışın sebebinin tübül engellenme ya da tübüllerde geriye sızdırmadan kaynaklandığı düşünülmektedir [220]. İ/R sonrasında serum BUN miktarındaki artış akut böbrek yetmezliğinin göstergesi olabilmektedir. Çalışmamızda İ/R, İ/R + AK295 ve İ/R + DMSO üre değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durum böbrek işlevinde bir düzensizliğin oluştuğunu göstermektedir.

Kreatinin değeri böbrek yetersizliğinin tanısında ve gelişmesinin izlenmesinde çok iyi bir göstergedir. Kreatinin glomerüler filtrasyondan etkilenir ve glomerüler filtrasyonu doğrudan gösteren en pratik parametredir [221]. IR hasarı sonrasında serum kreatinin seviyesinde gözlenen yükselme, böbrek proksimal tübül hücrelerinde meydana gelen fonksiyon bozukluğunu işaret eden bir durumdur [222]. Çalışmamızda İ/R, İ/R + AK295 ve İ/R + DMSO değerlerinin, kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek olması deneklerde böbrek fonksiyonunun ileri derecede bozulduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak renal iskemi reperfüzyon hasarı modelinde kullandığımız kalpain inhibitörü AK295' in apoptozu kısmen engellediği tespit edilmiştir. AK295 ile gelecekte yapılacak olan in vivo ve in vitro çalışmalar ile mevcut tedavisi bulunmayan iskemi reperfüzyon hasarı hakkında daha fazla bilgi sahibi olunabilecek ve iskemi reperfüzyon hasarı tedavi protokolünde yer edinebilecektir.

7.KAYNAKLAR

- [1] T F. Slater Free radical mechanisms in tissue injury. **J Biochem** 1984; 222:1-15.
- [2] İ. Akkuş 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Konya, Mimoza Yayınları
- [3] RS. Cotran, V. Kumar, SL. Robbins Temel patoloji. Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul: Nobel ve Yüce, 1995.
- [4] LE. Conesa, F. Valero, JC. Nadal N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. **Am J Physiol** 2001; 281: 730-737.
- [5] A. Önal, H. Astarçioğlu, M. Örmen, K. Atila, S. Sarioğlu. Sıçandaki renal iskemi reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi. **Ulus Travma Dergisi** 2004; 10(3) : 161 .
- [6] BB. Erdoğan. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. **Akciğer Arşivi**, (2003) 4: 165-174.
- [7] SC. Wright, QS. Wei, DH. Kinder, JW. Larrick. Biochemical pathways of apoptosis; nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kd apoptotic protease and DNA fragmentation. **J. Exp. Med.**, (1996) 183: 463-471.
- [8] DW. Nicholson. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ** 1999; 6:1028-1042.
- [9] E. Ulukaya, "Apoptozis Ders Notları" Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Türkiye, 2003
- [10] R. Shi, T. Asano, NC. Vining. Control of membrane sealing in injured mammalian spinal cord axons. **J Neurophysiol.**, (2000); 84:1763-1769
- [11] AR. Blight, MP. Zimper. Acute spinal cord injury: Pharmacotherapy and drug development perspectives. **Current Opinion in Investigational Drugs** 2001; 2:801-808
- [12] M. Aragno, J C. Cutrin, R. Mastrocola, MG. Perrelli, F. Restivo, G. Poli, O. Danni, G. Boccuzzi. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: Attenuation by dehydroepiandrosterone, **Kidney International**, (2003);64:836-843.
- [13] M. Sasaki, J. Takashi, Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents, **J. Clin. Biochem.** (2006) Nutr. 40:1-12
- [14] LJ. Vinas, A. Sola, M. Genesca, V. Alfaro, F. Pi, G. Hotter. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemiareperfusion, **Free Radical Biology & Medicine**, (2006);40:992-1003.
- [15] A. Kahraman, N. Erkasap, M. Serteser, T. Köken. Protective effect of quercetin on renal ischemia-reperfusion injury in rats, **J. Nephrol**, (2003) 16:219- 224
- [16] PK. Chatterjee, NSA. Patel, EO. Kvale, S Cuzzocrea, PAJ. Brown, KN. Stewart, H. Mota-Filipe, C. Thiemermann, , Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury, **Kidney International**, (2002);61:862-871.
- [17] T. Köken, M. İnal. The effect of nitric oxide on ischemia reperfusion injury in rat liver, **Clinica Chimica Acta**, (1999); 288:55-62.

- [18] N. Erkasap, K. Uzuner, M. Serteser, T. Köken, Y. Aydın, Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats, **Peptides**, (2003); 24:1181-1187.
- [19] M. İkizler, N Erkasap, S. Dernek, T. Kural, Z. Kaygısız, Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment, *Anadolu Kardiyolog Dergisi*(2007);7:404- 10.
- [20] N. Aydoğdu, K. Kaymak, Ö. Yalçın, Sıçanlarda Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri, *Fırat Tıp Dergisi* (2005); 10(4); 151-155.
- [21] M. Çakan, T. Çakan, T. Aydos, D. Yılmaz, E. Ögüş, AS. Kılıç. Sıçan testisindeki iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerine ketoprofenin koruyucu etkisi, *Türk Üroloji Dergisi*, (2007); 33:50-55.
- [22] M. Bijl, PC. Limburg, CGM Kallenberg. New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis **Neth J Med**. 2001 Aug;59(2):66-75.
- [23] F. Öztürk, Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 9(2) 2002:143-148
- [24] AH. Wyllie, E. Duvall. Cell death. In: McGee JO'D, PG. Issacson, N. Wright, eds. *Oxford Textbook of Pathology*, vol 1. USA, Oxford University Press 1992: 142-147.
- [25] CB. Thompson. Apoptosis. In: Paul WE, ed. **Fundamental Immunology**. Lippincott-Raven Publishers. 1999.
- [26] CO. Bellamy, RD. Malcomson, DJ. Harrison, AH. Wyllie: Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. **Cancer Biology** (1995);6: 3-16,
- [27] MC. Cummings, CM. Winterford, NI. Walker: Apoptosis. **Am J Surg Pathol**. (1997);21: 88-101,.
- [28] RA. Schwartzman, JA. Cidloski: Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endocrine Reviews** (1993);14: 133-144,.
- [29] G. Majno, A. Torisl: Apoptosis oncosis and necrosis. **Am J Pathol** (1995); 146: 3-15,.
- [30] JJ. Cohen: Apoptosis: The physiological pathway of cell death. **Hosp Pract** (1993);15: 35-43.
- [31] AH. Wyllie: The genetic regulation of apoptosis. **Curr. Opin. Genet. Dev**. (1995);5: 97- 104.
- [32] J. Lu, K. Ashwell, WS. Ken, P. Waite: Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. **Spine** , (2000);25: 1859-1866
- [33] Y. Gavrieli, Y. Sherman, SA. Ben-Sasson: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**. (1992);119: 493-501,
- [34] RW. Keane, S. Kraydieh, G. Lotocki, JR. Bethea, S. Krajewski, JC. Reed, WD. Dietrich: Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. **J Neuropathol Exp Neurol**. (2001);60: 422-429,
- [35] MJ. Crowe, JC. Bresnahan, SL Shuman, JN Masters, MS Beattie. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. **Nat Med** 3: 73-76, 1997.
- [36] J Lou, LG Lenke, FJ Ludwig, MF O'Brien. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. **Spinal Cord** 36 : 683-690, 1998.

- [37] M Li, VO Ona, M Chen, M Kaul: Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. **Neuroscience** 99: 333-342, 2000
- [38] T Takagi, M Takayasu, M Mizuno, M Yoshimoto, J Yoshida. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. **Neurol Med Chir (Tokyo)** 43: 20-29, 2003.
- [39] XZ Liu, XXu M, R Hu, C Du, SX Zhang, JW McDonald, HX Dong, YJ Wu, GS Fan, MF Jacquin, CY Hsu, DW Choi. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. **J Neuroscience** 17: 5395- 5406, 1997
- [40] YM Hu, MA Benedict, LY Ding. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. **EMBO J.** 18: 3586- 3595, 1999
- [41] S Krajewski, M Krajewska, LM Ellerby, K Welsh, Z Xie, QL Deveraux, GS Salvesen, DE Bredesen, RE Rosenthal, G Fiskum, JC Reed: Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci, USA** 96: 5752- 5757, 1999.
- [42] K Newton, A Strasser: The Bcl-2 family and cell death regulation. **Curr Opin Genet Dev** 8: 68-75, 1998.
- [43] WS Choi, EH Lee, CW Chung. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. **J Neurochem** 77:1531-1541, 2001
- [44] K Takahashi, E Schwarz, C Ljubetic, M Murray, A Tessler, RA Saavedra. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. **J Comp Neurol** 404: 159-71, 1999.
- [45] H Nakatsuka, S Ohta, J Tanaka, K Toku, Y Kumon, N Maeda, M Sakanaka, S Sakaki. Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. **Brain Research** 849: 216-219, 1999
- [46] KJ Banasiak and GG Haddad. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. **Brain Res** 797: 295-304, 1998.
- [47] G Kromer, P Petit, N Zamzami, JL Vayssiere and B Mignotte. The biochemistry of programmed cell death. **Fedn Am. Soc. exp. Biol. J.** 9: 1277-1287, 1995.
- [48] K Nakamura, E Bossy-Wetzel, K Burns, et al. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. **J Cell Biol** 150: 731-740, 2000.
- [49] RV Rao, E Hermel, S Castro-Obregon, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. **J Biol Chem** 276: 869-874, 2001.
- [50] F Bao and D Liu. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. **Neuroscience** 116: 59-70, 2003.
- [51] DW Choi: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture in calcium dependent. **Neurosci Lett** 58: 293-297, 1985.
- [52] CD Bortner, NBE Odernburg, JA Crdlowski: The role of fragmentation in apoptosis. **Trends in Cell Biology** 5: 21-28, 1995.
- [53] PJ Caotes, SA Hales, PA Hall. The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. **J Pathol** 178: 71-7, 1996.

- [54] AP Anr, ML Levy: Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. **Neurosurgery** 44:1027-1039, 1999.
- [55] K Katoh, T Ikata, S Katoh, et al: Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. **Neurosci Lett** 216: 9-12, 1996.
- [56] E Emery, P Aldana, MB Bunge, W Puckett, A Srinivasan, RW Keane, J Bethea, AD Levi: Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. **J Neurosurg** 89 : 911-920, 1998.
- [57] RE Ellis, JY Yuan, HR Horvitz: Mechanisms and functions of cell death. **Ann Rev Cell Biol** 7: 663-698, 1991.
- [58] SW Hetts. To die or not to die. **The Journal of The American Medical Association (JAMA)** 1998; 279:300-7.
- [59] S Spencer, NA Cataldo, RB Jaffe. Apoptosis in the human female reproductive tract. **Obstetrical and Gynecological Survey** 5: 314- 323, 1996.
- [60] AH Wyllie. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature** 284: 555- 556, 1980.
- [61] JJ Cohen: Apoptosis. **Immunol Today** 14: 126-130, 1993
- [62] A Eastman Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. **Cancer Biology** 6: 45- 52, 1995.
- [63] DM Millerk, S Blume, M Borst. Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine. **Am J Med Sci** 300: 59-65, 1990.
- [64] PC Nowell. Cytogenetics of tumor progression. **Cancer** 65: 2172-2175, 1990.
- [65] PT Akins, PK Liu, CY Hsu. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe ?. **Stroke** 27: 1682- 1687, 1996.
- [66] R Nakano. Apoptosis: Gene directed cell death. **Horm Res** 48: 2-4, 1997.
- [67] T Miyashita, S Krajewski, M Krajewsko. Tumor supressor p53 is a regulator of bcl-2 bax gene expression in vivo. **Oncogene** 9: 1799- 1805, 1994.
- [68] ML Hooper: The role of p53 and Rb-1 genes in cancer, development and apoptosis. **J Cell Sci** 18: 13-7, 1994
- [69] GL Evan, AH Wyllie, GS Gilbert, TD Littlewood, H Lond, M Breaks. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. **Cell** 69: 119-128, 1992.
- [70] AJ Wagner, MB Small, N Itoy. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. **Mol Cell Biol** 13: 2432-2440, 1993.
- [71] SJ Korsmeyer. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes; regulators of cell death. **Blood** 80: 879-886, 1992
- [72] JM Wingrave, KE Schaecher, EA Sribnick. Early induction of injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. **Journal of Neuroscience Res.**73: 95-104, 2003
- [73] LG Israels, Israels ED. Apoptosis. **The Oncologist** 1999;4:332-9.
- [74] O Büyükgebiz, JS Caferler. Apoptoz. **Sendrom** 2001;13:102-7.
- [75] KL King, JA Cidlowski. Cell cycle regulation and apoptosis. **Annual Review of Physiology** 1998;60:601-17.
- [76] A Strasser, L O'Connor, VM Dixit. Apoptosis signaling. **Annual Review of Biochemistry** 2000; 69:217-45.
- [77] J Wang, HJ Chun, W Wong, DM Spencer, MJ Lenardo. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. **Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS)** 2001; 98:13884-8.

- [78] I Budihardjo, HLM Oliver. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1999; 15:269-90.
- [79] MB Hampton, S Orrenius. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8:1-5.
- [80] R Ventimiglia, L Lau, RA Kinloch, A Hopkins, EH Karran, LP Petalidis, RV Ward. Role of caspases in neuronal apoptosis, **Drug Development Research**, 52:4 (2001) 515-533.
- [81] M Schuler and DR Gren, Mechanisms of p53-dependent apoptosis, *oc. Trans.*, 29 (2001) 684–688.
- [82] RC Bleackley, JA Heibin, Enzymatic control of apoptosis, **Nat. Prod. Rep.**, 18:1 (2001) 431-440.
- [83] A Lawen, Apoptosis-an introduction, *BioEssays*, 25:9 (2003) 888-896.
- [84] Ray SK, DD Matzella, EL Wilford: Inhibition of calpain mediated apoptosis by E-64-d reduced immediate early gene expression and reaktive astrogliosis in the lesion and penumra following spinal cord injury in rats. **Brain Res.** 916:115-126, 2001.
- [85] Swapan K R, Edward LH, Naren LB: Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. **Brain Res. Reviews** 42: 169-185, 2003.
- [86] Blomgren Klas: Synergistic avtivation of Caspase-3 by m-kalpain after neonatal hypoxia-ischemia, . **J. Biologic Chem.** 276:10191-10198, 2001
- [87] Nomenclature committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Enzyme nomenclature. **Recommendations** 1978. Supplement 2: Corrections and additions. **Eur J Biochem** 1981, 116, 423-435.
- [88] DE Goll; VF Thompson, H Li, W Wei, J Cong,. The calpain system. **Physiol Rev** 2003, 83, 731-801.
- [89] DE Croall, GN Demartino: Calcium activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. **Physiol Rev.** 71: 813-847, 1991.
- [90] G Guroff. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. **J Biol Chem** 1964, 239, 149-155.
- [91] Suzuki K; Hata, S.; Kawabata, Y.; Sorimachi, H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 2004, 53 *Suppl 1*, S12-18.
- [92] ME Saez; R Ramirez-Lorca, FJ Moron, A Ruiz, The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. **Drug Discov Today** 2006, 11, 917-923.
- [93] NO Carragher, Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. **Curr Pharm Des** 2006, 12, 615-638.
- [94] A Kishimoto, N Kajikawa, H Tabuchi, M Shiota, Y Nishizuka. Calcium dependent neural proteases, widespread occurrence of a species of protease active at lower concentrations of calcium. **J Biochem (Tokyo)** 1981, 90, 889-892.
- [95] KK Wang, PW Yuen. Development and therapeutic potential of calpain inhibitors. **Adv Pharmacol** 1997, 37, 117-152.
- [96] A Rami. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain calpastatin caspase hypothesis. **Neurobiol Dis** 2003, 13, 75-88.
- [97] C Wiessner, D Sauer, D Alaimo, PR Allegrini: Protective effect of a caspase inhibitor in models for cerebral ischemia in vitro and in vivo. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)** 46: 53-62, 2000.
- [98] NL Banik, EL Hogan, LJ Powers: Degradation of cytoskeletal proteins in spinal cord injury. **Neurochem Res** 7: 1465-1475, 1982.

- [99] SK Ray, DD Matzella, EL Wilford: Increased calpain expression is associated with apoptosis in rat spinal cord injury: calpain inhibitor provides neuroprotection. **Neurochem Res.** 25: 1191-1198, 2000.
- [100] Blomgren Klas : Calpastatin Is Up-regulated in response to hypoxia and Is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia **J. Biologic Chem** 274.14046-14052, 1999.
- [101] L Wolman: The disturbance of circulation in traumatic paraplegia in acute and late stages: a pathological study. *Paraplegia* 2: 213-226, 1965.
- [102] K Suzuki, H Sorimachi, T Yoshizawa: Calpain: Novel family members, activation, and physiologic function. **Biol. Chem.** Hoppe Seyler 376:523- 529, 1995.
- [103] S Strobl; C Fernandez-Catalan, M Braun, R Huber, H Masumoto, et al. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000, 97, 588-592.
- [104] A Khorchid, M Ikura. How calpain is activated by calcium. **Nat Struct Biol** 2002, 9, 239-241.
- [105] M Inomata, M Hayashi, M Nakamura, Y Saito, S Kawashima. Properties of erythrocyte membrane binding and autolytic activation of calcium-activated neutral protease. **J Biol Chem** 1989, 264, 18838-18843.
- [106] M Molinari, J Anagli, E Carafoli. Ca²⁺-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. **J Biol Chem** 1994, 269, 27992-27995.
- [107] GD Lin, D Chattopadhyay, M Maki, KK Wang. Carson, M. et al. Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. **Nat Struct Biol** 1997, 4, 539-547.
- [108] H Blanchard, P Grochulski, Y Li, J.S Arthur, PL Davies,. et al. Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. **Nat Struct Biol** 1997, 4, 532-538
- [109] O Akdemir, M Uçankale, A Karaoğlan, S Barut, A Sağmanlıgil, K Bilguvar, B Çırakoğlu, E Şahan, A Çolak: SJA6017 Noroprotectif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi **J Clin Neurosci.** 2008
- [110] E Kathryn Saatman: Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat, **Neurobiology**, 93,3428-3433, 1996.
- [111] M Uysal, 1998, Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen kosullar, **Klinik Gelişim**, 11, 336-341.
- [112] CE Cross , B Halliwell, ET Borish, WA Pryor, BN Ames, RL Saul, JM McCord, D Harman, 1987, Oxygen radicals and human disease, **Annals Internal Medicine**, 107, 526-545.
- [113] MG Batrelli, ED Corte, and F Stirpe, 1972, Xanthine oxidase type (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat, **Biochem. J.**, 126, 747-749.
- [114] I Fridovich, 1983, Superoxide radical: an endogenous toxicant, **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 23, 239-257.
- [115] MD McMichael, RM Moore. 2004 a, İschemia-reperfusion injury pathophysiology, part I, **Journal of Veterinaty and Critical Care**, 14 (4), 231-241.

- [116] H Esterabuer, 1996, Estimation of peroxidative damage, a critical review, **Pathol. Biol.** (Paris), 44, 25-28.
- [117] JF Curtin, M Donovan, TG Cotter. 2002, Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis, **J. Immunol Methods**, 265, 49-72.
- [118] FJ Kelly , 2001, UrinaryF2-isoprostane metabolite analysis: a step closer to obtaining a reliable measure of oxidative stress?, **Clin. Exp. Allergy**, 31, 355-356
- [119] I Acworth, D McCabe, T Mather, 1997, The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants, *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*, Taylor & Francis Washington, DC., 23–77.
- [120] D Pratico, 2001, *In vivo* measurement of the redox state, *Lipids*, 36, 45-47.
- [121] MS Brown, JL Goldstein. 1979, Receptor mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system, **Proc. Natl. Acad.**, 76, 3330-3337.
- [122] B Halliwell, 1994, Free radicals and antioxidants: a personal view, **Nutr. Rev.**, 52, 253-265.
- [123] M Valko, D Leibfritz, J Moncol, MTD Cronin, M Mazur, Telser. radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39 (1), 44-84.
- [124] R Radi, JS Beckman, KM Bush, BA Freeman. 1991, Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, **Archive of Biochemistry and Biophysics**, 288, 481-487.
- [125] K Uchida, ER Stadtman. 1993, Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and inter-molecular cross-linking reaction, **Journal of Biological Chemistry**, 268, 6388-6393.
- [126] G Poli, M Parola. 1997, Oxidative damage and fibrogenesis, **Free Radical Biology and Medicine**, 22, 287-305
- [127] N Tokol Tunalı. Jinekolojik Kanserli hastalarda CoQ₁₀'un tedavi edici etkinliğinin araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2007,Eskişehir.
- [128] U Rangan, GB Bulkley, Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury, **British Medical Bulletin**, 1993,49, 700-718.
- [129] R Hatungil. Serbest radikallerin yol açtığı doku hasarları. **Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi**. 2002;3: 460-469.
- [130] G Poli, E Albano, and MU Diazani, Free Radicals: **From Basic Science to Medicine**. Birkhauser, Basel (Switzerland), (1993); s.47.
- [131] B Halliwell. Oksidatif stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Res.** 1996;25, 57-74.
- [132] Halliwell B. and Gutteridge J M C,1989: Free radicals in Biology and Oxford, Clarendon Pres; s.177-8.
- [133] JC Fulbert, M Succari, and MJ Cals, 1992. Semi- automated assay of erythrocyte Cu-Zn Superoxide dismutase activity. **Clin. Biochem.**, 25:115-119
- [134] İ Durak, Z Yurtasian, O Canbolat, ve ÖA Akyol.. Methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium reduction **Clin. Chim. Acta.**, 1993;214:103- 104.
- [135] E Serin, E Yılmaz, S Yılmaz, E Ünsaldı, ve AS Durmuş,.İskemik-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri. **Artroplastik Artroskopik Cerrahi**. 1998; 9: 36-39.

- [136] E Akgül. Tip II diyabetes mellituslu hastalarda oksidan ve antioksidan mekanizmaların incelenmesi. Uzmanlık tezi, Elazığ: **Fırat Üniversitesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Ana Bilim Dalı**, 1996;86s.
- [137] AS Yalçın. Antioksidanlar. Klinik Gelişim, 1998;11: 409-411.
- [138] JM Mates. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, 2000;153: 83-104.
- [139] GL Baker , RJ Corry , AP Autor. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. **Ann Surg**. 1985 Nov;202(5):628-41.
- [140] M Schumer, MC Colombel, IS Sawczuk, G Gobé, J Connor, KM O'Toole, CA Olsson, GJ Wise, R Buttyan. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. **Am J Pathol** 1992; 140: 831-838.
- [141] F López-Neblina , AJ Paez , AH Toledo , LH Toledo-Pereyra . Role of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the rat kidney. **Circ Shock**. 1994 Oct; 44(2): 91-5.
- [142] CL Edelstein , MM Yaqoob , RW Schrier . The role of the calcium-dependent enzymes nitric oxide synthase and calpain in hypoxia-induced proximal tubule injury. **Ren Fail**. 1996 May;18(3):501-11.
- [143] CL Edelstein , ED Wieder , MM Yaqoob , PE Gengaro , TJ Burke , RA Nemenoff , RW Schrier . The role of cysteine proteases in hypoxia-induced rat renal proximal tubular injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995 Aug 15;92(17):7662-6.
- [144] DP Basile , H Liapis , MR Hammerman . Expression of bcl-2 and bax in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. **Am J Physiol**. 1997 May;272(5 Pt 2):F640-7.
- [145] GP Kaushal, AB Singh, SV Shah. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol**. 1998 Mar;274(3 Pt 2):F587-595.
- [146] CL Edelstein , Y Shi , RW Schrier . Role of caspases in hypoxia-induced necrosis of rat renal proximal tubules. **J Am Soc Nephrol**. 1999 Sep; 10 (9) : 1940-9.
- [147] Y Shi , VY Melnikov , RW Schrier , CL Edelstein . Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2000 Sep;279(3):F509-17.
- [148] PK Chatterjee , PA Brown , S Cuzzocrea , Z K acharowski , KN Stewart , H Mota-Filipe , MC McDonald , C Thiemermann . Calpain inhibitor-1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat. **Kidney Int**. 2001 Jun;59(6):2073-83.
- [149] C Zhang , R Siman , YA Xu , AM Mills , JR Frederick , RW Neumar . Comparison of calpain and caspase activities in the adult rat brain after transient forebrain ischemia. **Neurobiol Dis**. 2002 Aug;10(3):289-05.
- [150] KJ Kelly, Z Plotkin, SL Vulgamott, PC Dagher . P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. **J Am Soc Nephrol**. 2003 Jan;14(1):128-38.
- [151] C Perrin , A Ecartot-Laubriet, C Vergely, L Rochette . Calpain and caspase-3 inhibitors reduce infarct size and post-ischemic apoptosis in rat heart without modifying contractile recovery. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. 2003;49 Online Pub:OL497-505.

- [152] A Sola, V Alfaro, JL Viñas, G Hotter. Exogenous adenosine enhances caspase-3 activity in warm renal ischaemia. **Pflugers Arch.** 2004 Jan;447(4):387-91. Epub 2003 Nov 7.
- [153] PK Chatterjee , Z Todorovic , A Sivarajah , H Mota-Filipe , PA Brown , KN Stewart , E Mazzon , S Cuzzocrea , C Thiernemann . Inhibitors of calpain activation (PD150606 and E-64) and renal ischemia-reperfusion injury. **Biochem Pharmacol.** 2005 Apr 1;69(7):1121-31.
- [154] Y Tao , J Kim , S Faubel , JC Wu , SA Falk , RW Schrier , CL Edelstein . Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slows disease progression in polycystic kidney disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2005 May 10;102(19):6954-9. Epub 2005 Apr 29.
- [155] X Qiao , X Chen , D Wu , R Ding , J Wang , Q Hong , S Shi , J Li , Y Xie , Y Lu , Z Wang . Mitochondrial pathway is responsible for aging-related increase of tubular cell apoptosis in renal ischemia/reperfusion injury. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2005 Jul;60(7):830-9.
- [156] A Kher , KK Meldrum , KL Hile , M Wang , BM Tsai , MW Turrentine , JW Brown , DR Meldrum . Aprotinin improves kidney function and decreases tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling after renal ischemia-reperfusion. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 2005 Sep;130(3):662-9.
- [157] A Dingman, SY Lee, N Derugin, MF Wendland, ZS Vexler. Aminoguanidine inhibits caspase-3 and calpain activation without affecting microglial activation following neonatal transient cerebral ischemia. **J Neurochem.** 2006 Mar;96(5):1467-79. Epub 2006 Feb 8.
- [158] C Frangié , W Zhang , J Perez , YC Dubois , JP Haymann , L Baud . Extracellular calpains increase tubular epithelial cell mobility. Implications for kidney repair after ischemia. **J Biol Chem.** 2006 Sep 8;281(36):26624-32. Epub 2006 Jul 5.
- [159] LN Chen , B Yan , DP Chen , YJ Yao . [Protective effect of calpain inhibitor-3 on hypoxic-ischemic brain damage of neonatal rats]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2008 Jan;46(1):13-7.
- [160] D Wu , X Chen , R Ding , X Qiao , S Shi , Y Xie , Q Hong , Z Feng . Ischemia/reperfusion induce renal tubule apoptosis by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and L-type Ca²⁺ channel opening. **Am J Nephrol.** 2008;28(3):487-99. Epub 2008 Jan 10.
- [161] H Chen , B Xing , X Liu , B Zhan , J Zhou , H Zhu , Z Chen . Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. **Eur J Pharmacol.** 2008 Mar 10;581(3):306-14. Epub 2007 Nov 28.
- [162] M Sun , C Xu . Neuroprotective mechanism of taurine due to up-regulating calpastatin and down-regulating calpain and caspase-3 during focal cerebral ischemia. **Cell Mol Neurobiol.** 2008 Jun;28(4):593-611. Epub 2007 Aug 22.
- [163] GV Chaitanya , PP Babu .Activation of calpain, cathepsin-b and caspase-3 during transient focal cerebral ischemia in rat model. **Neurochem Res.** 2008 Nov;33(11):2178-86. Epub 2008 Mar 13.
- [164] MD Covington , DD Arrington , RG Schnellmann . Calpain 10 is required for cell viability and is decreased in the aging kidney. **Am J Physiol Renal Physiol.** 2009 Mar;296(3):F478-86. Epub 2009 Jan 14.
- [165] A Kucuk , K S abadere , M Tosun , T Koken , MK Kinaci , B Isikli , N Erkasap .Protective effects of doxycycline in ischemia/reperfusion injury on kidney. **J Physiol Biochem.** 2009 Jun;65(2):183-91.

- [166] S Kumar , DA Allen , JE Kieswich, NS Patel , S Harwood , E Mazzon , S Cuzzocrea , MJ Raftery , C Thiemermann , MM Yaqoob . Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. **J Am Soc Nephrol.** 2009 Nov;20(11):2412-25. Epub 2009 Sep 24.
- [167] A Korkmaz , D Kolankaya .Protective effect of rutin on the ischemia reperfusion induced damage in rat kidney. **J Surg Res.** 2010 Dec;164(2):309-15. Epub 2009 Apr 21.
- [168] MK Chok, M Conti, A Almolki, F S erlicot, L S oric, A Dürrbach, G Benoît, Droupy S, Eschwège P.Renoprotective potency of amifostine in rat renal ischaemia-reperfusion. **Nephrol Dial Transplant.** 2010 Dec;25(12):3845-51. Epub 2010 Jun 4.
- [169] T Hayashi, MA De Velasco, Y Saitou, K Nose, T Nishioka, T Ishii, H Uemura . Carvedilol protects tubular epithelial cells from ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress. **Int J Urol.** 2010 Dec;17(12):989-95. doi: 10.1111/j. 1442-2042.2010.02644.x. Epub 2010 Oct 14.
- [170] F Bardakçı, Yenidünya A F (2007): Moleküler biyoloji teknikleri 1:Nükleik asit analiz teknikleri (in) Moleküler Biyoloji. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), 519-553, Nobel Yayın, Ankara.
- [171] İ Yılmaz; Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul (2005).
- [172] MM Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, **Anal. Biochem.** 72 (1976), pp. 248–254
- [173] JM McCord, I Fridovich, Superoxide dismutase: An enzymic function for Erythrocyte (Hemocytin), **The J of Biological Chemistry**, Vol,244, No. 22:(1969) ;6049-6055
- [174] RF Beers, IW Sizer. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol Chem** 1952;95: 133-140.
- [175] H Lück. Catalase. In: Bergmeyer HU, editors. Methods of Enzymatic Analysis. New York and London: Verlag Chemie-GMBH, Weinheim;1965.p885-894.
- [176] AJ Buege, SD Aust. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol** (1978) 52, 302-310.
- [177] F Serracino-Inglott, NA Habib, RT Mathie. Hepatic ischemia-reperfusion injury. **Am J Surg.** 2001 Feb;181(2):160-6.
- [178] EE Montalvo-Jave, T Escalante-Tattersfield, JA Ortega-Salgado, E Piña, DA Geller. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. **J Surg Res.** 2008 Jun 1;147(1):153-9. Epub 2007 Jul 27.
- [179] JJ Friedewald, H Rabb. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. **Kidney Int.** 2004 Aug;66(2):486-91.
- [180] P Chowdhury, SH Sacks, NS Sheerin. Minireview: functions of the renal tract epithelium in coordinating the innate immune response to infection. **Kidney Int.** 2004 Oct;66(4):1334-44.
- [181] TC Saido , H Sorimachi , K Suzuki . Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. **FASEB J.** 1994 Aug;8(11):814-22.

- [182] DE Goll, T VF hompson, RG Taylor, JA Christiansen. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie**. 1992 Mar;74(3):225-37.
- [183] AM Di Stasi, V Gallo, M Ceccarini, TC Petrucci. Neuronal fodrin proteolysis occurs independently of excitatory amino acid-induced neurotoxicity. **Neuron**. 1991 Mar;6(3):445-54.
- [184] A Rami, J Krieglstein. Protective effects of calpain inhibitors against neuronal damage caused by cytotoxic hypoxia in vitro and ischemia in vivo. **Brain Res**. 1993 Apr 23;609(1-2):67-70.
- [185] KK Wang, R Nath, A Posner, KJ Raser, M Buroker-Kilgore, I Hajimohammadreza, AW Probert, FW Jr, Marcoux, Q Ye, E Takano, M Hatanaka, M Maki, H Caner, JL Collins, A Fergus, KS Lee, EA Lunney, SJ Hays, P Yuen. An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1996 Jun 25;93(13):6687-92.
- [186] H Sorimachi, S Ishiura, K Suzuki. Structure and physiological function of calpains. **Biochem J**. 1997 Dec 15;328 (Pt 3):721-32.
- [187] H Sorimachi, K Suzuki. The structure of calpain. **J Biochem**. 2001 May;129(5):653-64.
- [188] Y Huang, KK Wang. The calpain family and human disease. **Trends Mol Med**. 2001 Aug;7(8):355-62.
- [189] CM Hosfield, JS Elce, PL Davies, Z Jia. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. **EMBO J**. 1999 Dec 15;18(24):6880-9.
- [190] D Reverter, H Sorimachi, W Bode. The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function. **Trends Cardiovasc Med**. 2001 Aug;11(6):222-9.
- [191] S Tolnai, B Korecky. Calcium-dependent proteolysis and its inhibition in the ischemic rat myocardium. **Can J Cardiol**. 1986 Jan-Feb;2(1):42-7.
- [192] RT Bartus, NJ Hayward, PJ Elliott, SD Sawyer, KL Baker, RL Dean, A Akiyama, JA Straub, SL Harbeson, Z Li, et al. Calpain inhibitor AK295 protects neurons from focal brain ischemia. Effects of postocclusion intra-arterial administration. **Stroke**. 1994 Nov;25(11):2265-70.
- [193] SC Hong, Y Goto, G Lanzino, S Soleau, NF Kassell, KS Lee. Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. **Stroke**. 1994 Mar;25(3):663-9.
- [194] KS Lee, S Frank, P Vanderklish, A Arai, G Lynch. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1991 Aug 15;88(16):7233-7.
- [195] A Kishimoto, K Mikawa, K Hashimoto, I Yasuda, S Tanaka, M Tominaga, T Kuroda, Y Nishizuka. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). **J Biol Chem**. 1989 Mar 5;264(7):4088-92.
- [196] KE Saatman, H Murai, RT Bartus, DH Smith, NJ Hayward, BR Perri, TK McIntosh. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1996 Apr 16;93(8):3428-33.
- [197] N Yazihan, H Ataoglu, GO Kavas, N Akyurek, B Yener, C Aydm. The effect of K-ATP channel blockage during erythropoietin treatment in renal ischemia-reperfusion injury. **J Invest Surg**. 2008 Nov-Dec;21(6):340-7.

- [198] S Hai, S Takemura, Y Minamiyama, K Yamasaki, S Yamamoto, S Kodai, S Tanaka, K Hirohashi, S Suehiro. Mitochondrial K(ATP) channel opener prevents ischemia-reperfusion injury in rat liver. **Transplant Proc.** 2005 Jan-Feb;37(1):428-31.
- [199] A Jani, D Ljubanovic, S Faubel, J Kim, R Mischak, CL Edelstein. Caspase inhibition prevents the increase in caspase-3, -2, -8 and -9 activity and apoptosis in the cold ischemic mouse kidney. **Am J Transplant.** 2004 Aug;4(8):1246-54.
- [200] RG Schnellmann, SW Williams. Proteases in renal cell death: calpains mediate cell death produced by diverse toxicants. **Ren Fail.** 1998 Sep;20(5):679-86.
- [201] P Mathur, SK Gupta, AR Wegener, W Breipohl, MH Ahrend, YD Sharma, YK Gupta, RB Vajpayee. Comparison of various calpain inhibitors in reduction of light scattering, protein precipitation and nuclear cataract in vitro. **Curr Eye Res.** 2000 Dec;21(6):926-33.
- [202] KE Saatman, C Zhang, RT Bartus, TK McIntosh. Behavioral efficacy of posttraumatic calpain inhibition is not accompanied by reduced spectrin proteolysis, cortical lesion, or apoptosis. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2000 Jan;20(1):66-73.
- [203] RL DeBiasi, CL Edelstein, B Sherry, KL Tyler. Calpain inhibition protects against virus-induced apoptotic myocardial injury. **J Virol.** 2001 Jan;75(1):351-61.
- [204] MS Wang, AA Davis, DG Culver, Q Wang, JC Powers, JD Glass. Calpain inhibition protects against Taxol-induced sensory neuropathy. **Brain.** 2004 Mar;127(Pt 3):671-9. Epub 2004 Feb 4.
- [205] A Colak, M Kaya, A Karaoğlan, A Sağmanligil, O Akdemir, E Sahan, O Celik. Calpain inhibitor AK 295 inhibits calpain-induced apoptosis and improves neurologic function after traumatic spinal cord injury in rats. **Neurocirugia (Astur).** 2009 Jun;20(3):245-54.
- [206] K Singbartl , K Ley . Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin. **Crit Care Med.** 2000 Jul;28(7):2507-14.
- [207] BJ Zimmerman, MB Grisham, DN Granger. Role of oxidants in ischemia reperfusion induced granulocyte infiltration. **Am J Physiol.** 1990 Feb;258(2 Pt 1):G185-90.
- [208] D Singh, V Chander, K Chopra. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia reperfusion induced renal injury in rats. **Arch Med Res.** 2004 Nov-Dec;35(6):484-94.
- [209] EL Greene , MS Paller . Oxygen free radicals in acute renal failure. **Miner Electrolyte Metab.** 1991;17(2):124-32.
- [210] KH Cheeseman , S TF later . An introduction to free radical biochemistry. **Br Med Bull.** 1993 Jul;49(3):481-93.
- [211] AV Peskin, CC Winterbourn. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). **Clin Chim Acta.** 2000 Mar;293(1-2):157-66.
- [212] DR Spitz, LW Oberley. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Anal Biochem.** 1989 May 15;179(1):8-18.
- [213] D Salvemini, S Cuzzocrea. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. **Curr Opin Investig Drugs.** 2002 Jun;3(6):886-95.

- [214] K Dobashi, B Ghosh, JK Orak, I Singh, AK Singh. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. **Mol Cell Biochem.** 2000 Feb;205(1-2):1-11.
- [215] MS Paller, JR Hoidal, TF Ferris. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. **J Clin Invest.** 1984 Oct;74(4):1156-64.
- [216] P Williams, H Lopez, D Britt, C Chan, A Ezrin, R Hottendorf. Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats. **J Pharmacol Toxicol Methods.** 1997 Feb;37(1):1-7.
- [217] H Aebi. Catalase invitro assay methods. **Methods Enzymol** 1984; 105: 121-126.
- [218] L Baud , R Ardaillou . Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. **Br Med Bull.** 1993 Jul;49(3):621-9.
- [219] S D ingh , K Chopra . Effect of trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Pharmacol Res.** 2004 Dec;50(6):623-9.
- [220] G Karimi, M Ramezani, Z Tahoonian. Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2005 Sep;2(3):383-6. Epub 2005 Jul 26.
- [221] A Altıntaş, A Bilgili. Melez köpeklerde kan ve idrarda üre, kreatinin, Na ve K normal düzeyleri ile yaş, cinsiyet ve ağırlığın etkisi. **Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.** 1992; 3(1-2):11-27
- [222] C Thiernemann, NS Patel, EO Kvale, GW Cockerill, PA Brown, KN Stewart, S Cuzzocrea, D Britti, H Mota-Filipe, PK Chatterjee. High density lipoprotein (HDL) reduces renal ischemia/reperfusion injury. **J Am Soc Nephrol.** 2003 Jul;14(7):1833-43.

8. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

İsim ve Soyadı : Mahmut BİNEN
Doğum Tarihi : 10.01.1985
Doğum Yeri : Yüreğir/ADANA
Mesleki Durumu : Biyolog
Medeni Hali : Bekar

EĞİTİM BİLGİLERİ

İlkokul : 23 Nisan İlköğretim Okulu 1991-1996
Ortaokul : Gazi Ortaokulu 1996-1999
Lise : Seyhan Rotary Anadolu Lisesi. 1999-2003
Lisans : İnönü Üniversitesi. 2004-2008
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi. 2008-2011

Verilen Seminer:

Seminer Konusu : KALPAİNLER
Seminer Tarihi : 25 Ocak 2010
Seminer Yeri : Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Seminer Salonu