

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**GENTAMİSİNLE NEFROTOKSİSİTE OLUŞTURULAN  
SIÇANLARDA L-ARGİNİNİN KORUYUCU ETKİSİNDE  
ANTİOKSİDAN MEKANİZMALARIN OLASI ROLÜ**

**Ercan KARABULUT**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
Prof. Dr. ATA SEÇİLMİŞ**

**ADANA-2016**

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**GENTAMİSİNLE NEFROTOKSİSİTE OLUŞTURULAN  
SIÇANLARDA L-ARGİNİNİN KORUYUCU ETKİSİNDE  
ANTİOKSİDAN MEKANİZMALARIN OLASI ROLÜ**

**Ercan KARABULUT**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
Prof. Dr. ATA SEÇİLMİŞ**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TDK-2014-  
3426 no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

**ADANA-2016**

## KABUL ONAY

Tıbbi Farmakoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan  
“Gentamisinle Nefrotoksisite Oluşturulan Sıçanlarda L-Argininin Koruyucu Etkisinde Antioksidan  
Mekanizmaların Olası Rolü”  
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tarihi: 12 / 10 / 2016**

### TEZ SINAV JÜRİSİ

  
Prof. Dr. M. Ata SEÇİLMİŞ  
Çukurova Üniversitesi  
Başkan

  
Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK  
Çukurova Üniversitesi  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Besim ÖZAYKAN  
Çukurova Üniversitesi  
Üye

  
Doç. Dr. Seyhan Şalfan FIRAT  
Mersin Üniversitesi  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Soner METE  
Nevşehir Hacı Bektaş Üniversitesi  
Üye

Dr.  
Üniversitesi  
Üye

Dr.  
Üniversitesi  
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve  
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

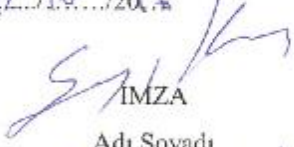
**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI**

**ETİK BEYANI**

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve alçayırme doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim. 12.10.2016

  
İMZA  
Adı Soyadı  
Ercan Karabulut

Kayıtlı olunan Program :Tıbbi Farmakoloji  
Tezin Konusu : Gentamisine Nefrotoksisite Oluşturulan Sıçanlarda  
L-Argininin Koruyucu Etkisinin Olası Rolü

Tezin Türü : Yüksek Lisans :  Doktora:

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof.Dr. M.Ata SEÇİLMİŞ  
Danışmanın İletişim Bilgileri  
Telefon :05336420082  
E-Posta : aseilmis@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri Ercan Karabulut  
Telefon : 05322960638  
E-Posta : v\_veterinercan@hotmail.com  
Adresi :

*\*Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmayı alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam sürecinde emek, destek, hoşgörü ve sabrını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Ata SEÇİLMİŞ'e; Prof. Dr. Ergin Şingirik'e, Çalışmalarım boyunca bana verdikleri destek ve ilgilerini minnetle anacağım Farmakoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve personeline, Biyokimyasal analizleri yapılmasında bana destek olan Dr. Önder Otlu ve Dr. Tuğba R. Kıran'a , Yoğun eğitim sürecim boyunca sabırla beni destekleyen sevgili eşim Prof.Dr.Aysun Karabulut'a, biricik kızlarım Sıla, Öykü, Berene, değerli dostum Nedim Turan ,Zehra Turan'a Teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
TABLolar LİSTESİ .....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
KISALTMALAR .....	ix
ÖZET .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER: .....	3
2.1. Böbreğin Yapısı ve Fonksiyonları .....	3
2.1.1. Böbrek Fonksiyon Testleri .....	5
2.2. Böbrek Yetmezliği .....	7
2.3. Aminoglikozidler .....	8
2.3.1. Farmakokinetik Özellikleri .....	9
2.3.2. Aminoglikozidin yan etkileri .....	9
2.4. Gentamisin .....	10
2.5. L-Arginin – Nitrik Oksid Yolağı .....	10
2.6. Nitrik oksid (NO <sup>•</sup> ) .....	11
2.6.1. Yapısı ve Kimyasal özellikleri .....	12
2.6.1.1. Nitrojen Oksitlerin Etkileri .....	13
2.6.1.2. Nitrik oksid etki mekanizması .....	14
2.6.2. Nitrik Oksit Sintetaz (NOS) .....	15
2.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Organizmadaki Oksidatif Hasar Mekanizması .....	17
2.7.1. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit .....	19
2.8. Antioksidanlar .....	22
2.8.1. Endojen (Doğal) Antioksidanlar .....	24
2.8.2. Sekonder Antioksidanlar (Enzim Olmayanlar) .....	27
2.8.3. Diğer Sekonder Antioksidanlar .....	28
2.8.4. Ekzojen Antioksidanlar .....	28

2.9. Kullanılan Parametreler İle İlgili Genel Bilgiler .....	29
2.9.1. Ksantin Oksidaz (XO) .....	29
2.9.2. Sitokinler.....	29
2.9.2.1. Tümör Nekrozis Faktör ( TNF) .....	29
2.9.2.2. Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF- $\beta_1$ ).....	31
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları .....	32
3.2. Deney Protokolü .....	32
3.2.1. Biyokimyasal Analiz.....	33
3.2.2. Böbrek Histopatolojisi .....	33
3.2.3. Doku Homojenizasyonu ve Tamponları .....	33
3.3. Serum ve Böbrek Doku Homojenizatında TAS, TOS, OSİ, GSH, NO, MDA, XO ve TGF $\beta_1$ , TNF $\alpha$ Analizleri .....	34
3.3.1. Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidan Status (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) .....	34
3.3.2. Total Antioksidan Status (TAS) Ölçümün Prensipleri .....	35
3.3.3. Total Oksidan Status (TOS) Ölçümün prensipleri.....	36
3.3.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	37
3.3.5. Glutayon (GSH) Analizi .....	37
3.3.6. Nitrit oksit (NO) Analizi.....	39
3.3.7. Malondialdehit (MDA) Analizi .....	42
3.3.8. Ksantin Oksidaz (XO) Analizi.....	44
3.3.9. Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF- $\beta_1$ ) Analizi .....	45
3.3.10. Tümör Nekrozis Faktör (TNF $\alpha$ ) Analizi.....	45
3.4. Verilerin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	46
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>47</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>62</b>
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>67</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>68</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>75</b>

## TABLULAR LİSTESİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa No:</u></b>
<b>Tablo 1.</b> cNOS ile iNOS Arasındaki Farklar.....	16
<b>Tablo 2.</b> Organizmada antioksidan sistem elemanları <sup>69</sup> .....	24
<b>Tablo 3.</b> Glutasyon deney protokolü.....	38
<b>Tablo 4.</b> Deproteinizasyon işleminin uygulanma prosedürü .....	40
<b>Tablo 5.</b> Nitrit ölçüm prosedürü .....	41
<b>Tablo 6.</b> Malondialdehit deney protokolü .....	43
<b>Tablo 7.</b> Ksantin oksidaz ölçümünde işlem basamakları.....	45
<b>Tablo 8.</b> Kontrol, D–arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME+Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının üre düzeylerinin karşılaştırılması .....	47
<b>Tablo 9.</b> Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının Kreatin düzeylerinin karşılaştırılması .....	48
<b>Tablo 10.</b> Kontrol, D–arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME + Gentamisin grubu, L-arginin+Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının ksantin oksidaz düzeylerinin karşılaştırılması .....	49
<b>Tablo 11.</b> Kontrol, D–arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının glutasyon düzeylerinin karşılaştırılması .....	50
<b>Tablo 12.</b> Kontrol, D–arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME+ Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının nitrik oksid düzeylerinin karşılaştırılması .....	50
<b>Tablo 13.</b> Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması .....	51
<b>Tablo 14.</b> Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TGF-B1 düzeylerinin karşılaştırılması .....	52
<b>Tablo 15.</b> Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TNF $\alpha$ düzeylerinin karşılaştırılması .....	52
<b>Tablo 16.</b> Kontrol, D-arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının TAS düzeylerinin karşılaştırılması .....	53
<b>Tablo 17.</b> Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının TOS düzeylerinin karşılaştırılması .....	53
<b>Tablo 18.</b> Kontrol, D–arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının OSİ Index düzeylerinin karşılaştırılması .....	54



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Nitrojen Oksitlerinin Etkileri .....	13
Şekil 2. Bir Poliansatüre yağ asidinin (PUFA) peroksidasyonu <sup>61</sup> .....	21
Şekil 3. A: Glutasyon redoks döngüsü <sup>74</sup> .....	26
Şekil 4. B: GSH'ın moleküler yapısı <sup>84</sup> .....	28
Şekil 5. GSH Standart grafiği.....	39
Şekil 6. NO Standart grafiği.....	42
Şekil 7. MDA standart grafiği.....	44
Şekil 8. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının ksantin oksidazdüzeylerinin karşılaştırılması*:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. (p<0,01).....	54
Şekil 9. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının kreatin düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	55
Şekil 10. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının üre düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	55
Şekil 11. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının Glutasyon düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	56
Şekil 12. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının Nitrik oksid düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	56
Şekil 13. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	57
Şekil 14. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TGF-β1 düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	57
Şekil 15. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TNF α düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	58
Şekil 16. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TOSdüzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	58
Şekil 17. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TAS düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	59
Şekil 18. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının OSI düzeylerinin karşılaştırılması *:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığışöstermektedir. p<0,01. ....	59
Şekil 19. A. Kontrol Grubu: Böbrek Parenkiminde Konjesyon H&Ex100.....	60
Şekil 20. B. Genta Grubu; Böbrek Parenkiminde Belirgin Konjesyon H&Ex100.....	60
Şekil 21. C. Genta-L-Arg Grubu: Böbrek Parenkiminde Konjesyon Ve İnterstisyel Lenfosit İnfiltrasyonu H&Ex100.....	61
Şekil 22. D. Genta+D-Arg: Böbrek Parenkiminde Tubuler Dilatasyon Ve Sekresyon İzlenmektedir. H&Ex200.....	61

## KISALTMALAR

<b>BUN</b>	: Kan Üre Nitrojeni
<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Seviye
<b>TOS</b>	: Total Oksidan seviye
<b>NO</b>	: Nitrik oksid
<b>NOS</b>	: Nitrik oksid Sentetaz
<b>OSİ</b>	: Oksidatif Stres İndeksi
<b>TGF</b>	: Transforming Growth Factor
<b>TNF</b>	: Tumor Necrosis factor
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>L-NAME</b>	: L-Omega-L-Arginine Methyl Ester

## ÖZET

### Gentamisinle Nefrotoksisite Oluşturulan Sıçanlarda L-Argininin Koruyucu Etkisinde Antioksidan Mekanizmaların Olası Rolü

Nitrik Oksid (NO) prekürsörü olan L-argininin, gentamisin ile oluşturulan böbrek yetmezliğine koruyucu bir etki gösterdiği bilinmektedir. Bu etkiye nitrik oksidin yanı sıra L-argininin NO sentez yolağı dışındaki mekanizmalarda katkıda bulunabilir. Bu çalışmada Gentamisinle oluşturulan nefrotoksisiteye karşı L-arginin ve onun inaktif izomeri olan D- argininin koruyucu etkisi karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

Bu çalışmada, gentamisin nefrotoksisitesine karşı L-argininin koruyucu etkisi altında yatan mekanizmaları anlamak amacıyla, sekiz grup oluşturuldu: kontrol grubu (normal besin ve çeşme suyu alan grup), Gentamisin (GM, 100 mg/kg; s.k.) grubu, L-arginin grubu (2g/l/gün, içme suyuyla oral yoldan), D-arginin grubu (3g/l/gün, içme suyu ile oral), L-NAME grubu (5 mg/1/gün, içme suyu ile oral olarak), GM (100 mg/ kg; s.k.) + L-arginin (2g/l/gün, içme suyu ile oral) grubu, GM (100 mg/ kg; s.k.) + L-NAME (5 mg/1/gün içme suyu ile oral olarak); GM (100 mg/ kg; s.k.)+ D-arginin (3g/l/gün dozla içme suyuyla içme suyu ile oral) uygulandı

Bu çalışmada, Gentamisin alan grupta üre ve kreatinin değerlerinin yükseldiğı tespit edilmiştir. Ayrıca bu grupta yapılan histopatolojik incelemede böbrek parenkiminde belirgin konjesyon görüldü. Buna TOS (Total oksidan Seviye), TAS (Total Antioksidan Seviye), MDA (Malondialdehid), XO (Ksantin Oksidaz) NO (Nitrik oksid), TNF alfa değerlerinde artış; TGF Beta, GSH (Glutatyon) düzeylerinde ise azalma eşlik etti. NO prekürsörü olan L-argininin birlikte verilmesi, gentamisine bağılı olarak değışen bu değıerleri nispeten düzeltti. Öte yandan, L-arginin inaktif yapısal izomeri olan D- arginin ve NOS (nitrik oksid sentaz) inhibitörü olan L-NAME gentamisine bağılı hasar üzerinde olumlu bir etki oluşturmadı.

Bu bulgular, D- argininin değıil, fakat L-argininin gentamisine bağılı oluşan oksidatif stresi azalttığını göstermektedir. Bu etki L-arginin–NO yolağı üzerinden olabilir.

**Anahtar sözcükler:** D-arginin, gentamisin, L-arginin, nefrotoksisite, antioksidan, oksidatif stres

## ABSTRACT

### The Possible Role Of Antioxidant Mechanism Of Protective Effect Of L-Arginine On Gentamicin-Nephrotoxicity In Rats

It is known that L-arginine, nitric oxide (NO) precursor, have protective effects on gentamycin (GM)-associated kidney failure. There are few studies suggest that protective effects of L-arginine are not related to only NO pathway and some other mechanisms can be included. In this study we aimed to compare the effects between L-arginine and its inactive isomere, D-arginine, due to their structural similarities.

In this this study, to determine antioxidative mechanism underlying the protective effect of L-arginine on the gentamicine-induced nephrotoxicity, seven experimental group were performed: Control (received top water), Gentamicine (GM, 100 mg/ kg; s.c.), L-arginine (2g/l/sc, in the drinking water), D-arginine (3g/l/day, in the drinking water), N<sup>G</sup>-nitro-Larginin metilester (L-NAME, 5 mg/1/day, in the drinking water), GM (100 mg/ kg; s.c.) + L-arginine (2g/l/day, in the drinking water), GM (100 mg/ kg; s.c.) + L-NAME (5 mg/1/ day in the drinking water); GM (100 mg/ kg; s.c.)+ D-arginine (3g/l/day, in the drinking water).

In the present study, gentamicine caused to increase in urea and creatinine. Also , gentamicine led to markedly congestione of renal parenchyme in histopathologic examination. Moreover, Gentamicine incresae Total oxidant status (TOS), Malondialdehyde (MDA), Xanthine (XO), Nitric oxide (NO) and TNF alfa, while it decrease in Total antioxidant status (TAS), TGF beta, Glutathione (GSH) levels.

Althought L-arginine, GM and L-NAME groups haven't shown any kidney injury, gentamicine combined groups have more kidney injury and increased urea and creatine levels.

L-arginine ameliorated the parameters ocured in gentamicine-induced nephrotoxicity. However, Neither D-arginine nor L-NAME restored the nephrotoxicity induced by gentamicine.

These results, suggest that L-arginine but not D-arginine, has protective effect on gentamicin-induced nephropathy. This effect may result from activity of L-arginine/NO pathway.

**Key Words:** D-arginine, Gentamycine, L-arginine, Nephrotoxicity, Antioxidant, Oxidative stress

# 1. GİRİŞ

Böbrekler vücudun metabolik döngüsü ile ortaya çıkan atık ürünleri ile fazla suyu idrar olarak organizmadan çıkaran organlardır. Böyle bir mekanizmayla ile doku sıvılarının yoğunluğu ve içeriği denetlenerek elektrolit, su dengesi korunur<sup>1</sup>.

Nitrik oksid (NO) çok yönlü değişik biyolojik etkilere sahip kimyasal bir moleküldür. Vazodilatatör ve nörotransmitter olarak tanımlanan NO'in, vücudun birçok organında fonksiyonlara sahip olduğu değişik çalışmalarla ortaya konmuştur. Son yıllarda NO'in böbrek dokusunda da fizyolojik ve patolojik olarak etkisi çalışılmıştır<sup>2,3,4,5</sup>. Akut böbrek yetmezliği vakalarında NO'in etkisi, NO donörü ve nitrik oksid sentaz (NOS) inhibitörlerinin kullanımı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır<sup>4,6,7,8,9</sup>. L-argininden; NO oluşturan enzim olan nitrik oksid sentetazlar (NOS) tarafından, oldukça karmaşık bir tepkime sonucu önemli bir serbest radikal olan NO ve sitrülün sentezlenmektedir<sup>10</sup>. NO, yarı esansiyel bir aminoasit olan L-argininden sentezlenir. Eşleşmemiş bir elektronu bulunan serbest radikal bir gazdır. NO sentez edildikçe salıverilen bir molekül olduğundan depolanamaz<sup>11</sup>.

Nefrotoksisitede dışarıdan verilen Largininin böbrek dokusunda makrofaj infiltrasyonunu azaltarak böbreği hasara karşı koruduğu, Gentamisin absorpsiyonunu azaltarak tubuler fonksiyonları koruduğu bildirilmiştir<sup>4,9,12,13</sup>. Fizyolojik seviyelerde NO üretimine neden olan olgularda Nitrik oksid sentetaz (NOS) inhibitörlerinin kullanılmasının zararlı olduğunu ifade etmişlerdir<sup>4,6,9,14</sup>. Yapılan nefrotoksisite çalışmalarında ise NOS inhibitörlerinin kullanılmasıyla böbreklerde azalmış olan glomerüler filtrasyon hızının kötüleştiği ve renal hasarın daha da arttığı bildirilmiştir<sup>4,6,9</sup>. L-NAME'nin gentamisin (GM) kaynaklı nefrotoksisitede, serum kreatinin düzeylerinde artışlara yol açtığı, tablonun daha da kötüleştiği bildirilmiştir<sup>6,9</sup>.

Gentamisin, gram (-) bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan aminoglikozid grubu antibiyotiktir. Ciddi nefrotoksik etkisi olması nedeniyle kullanımında dikkatli olmak gerekmektedir. Gentamisine bağlı gelişen renal yetmezliğin moleküler mekanizmasında; süperoksid anyonlarının birikimi, lizozomal enzim değişiklikleri ve mikrozomal protein sentez inhibisyonunun nefrotoksik etkilere aracılık edebileceği ileri sürülmektedir<sup>3,4,5,6</sup>.

Uzun süreli gentamisin tedavisi gereken durumlarda nitrik oksid uyarılmasının yararlı, inhibisyonunun ise zararlı olduğu bilindiğinden, L-arginin verilmesinin nefrotoksisite şiddetinin azaltılmasında işe yarayacağı önceden yapılmış çalışmalarda rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada, L-argininin gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede koruyucu etkisinin L-NAME tarafından geri çevrilemediği gösterilmiş ve L-argininin koruyucu etkisine nitrik oksid dışında başka diğer mekanizmaların da katkıda bulunabileceği tartışılmıştır.

Tüm bu çalışmaların ışığında Gentamisine bağlı gelişen renal yetmezlikte L-arginin ile onun inaktif izomeri olan D-argininin yapısal benzerliklerinden kaynaklanabilecek, NO yolağı dışında, muhtemel etkileri araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER:

### 2.1. Böbreğin Yapısı ve Fonksiyonları

Böbrekler metabolik döngüsel atık ürünleri ile beraber fazla sıvıyı da idrar olarak organizmadan çıkaran organdır. Böylelikle elektrolit-su dengesi korunur. Her böbrekte var olan bir milyon nefrondan her biri tek başına idrar yapma yeteneğine sahiptir. Böbrek atardamarının süzülme üzere getirdiği kan, üre, ürik asit, atık maddeler ile oksijen bakımından zengindir. Getirilen bu kan, kabuk bölgesinde bulunan nefronlar tarafından süzülür ve basıncın etkisiyle, bowman kapsülüne geçer. Kanda bulunan su, madensel tuzlar, glikoz, üre, ürik asidin, bowman kapsülüne geçmesine süzülme denir. Süzüntünün ardında kalan sıvı, bowman kapsülünden boşaltım kanalcığı yoluyla toplama kanalına gelinceye kadar değişmektedir. Yararlı maddelerin atılımını önlemek amacı ile enerji harcanarak süzuntu sıvısındaki suyun yoğunluğu, glikoz, madensel tuzların bir kısmı emilerek tekrar kana geçer. Havuzcuğa aktarılan sıvı idrari oluşturur. Oluşan idrar, üreterde ve idrar kesesinde toplanır ve üretra ile vücuttan dışarı atılır<sup>1,15</sup>.

Böbreğin temel fonksiyonları;

1. Hücrelerde oluşan zararlı ve atık maddeleri taşıyan kanı süzerek dışarı atılmasını sağlamak.
2. Vücuttaki fazla suyun dışarı atılmasını gerçekleştirmek.
3. Vücutta dengeli bir iç çevre oluşmasını sağlamak; Vücudumuza gerekli olan bazı minerallerin, suyun, glikozun ve proteinlerin dengede tutulmasını sağlayarak sivi-elektrolit dengesinin sağlanması.
4. Ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi
5. Hormon sentezi ve metabolizmasına katkı: Eritropoetin, D vitamini
6. Peptid hormonlarının (insülin, glukagon) yıkımı
7. Küçük molekül ağırlıklı proteinlerin ( $\beta_2$  - mikroglobulin) yıkımı
8. Metabolik etkiye katkıda bulunmak: Glukoneogenez, lipid metabolizması
9. Böbrek, 1,25 hidroksikolekalsifirol'ü aktive ederek D vitamini sentezinde rol oynar.<sup>16</sup>

İdrar, böbrekler tarafından salgılanarak mesanede depolanan ve üretra ile dışarı atılan sağlıklı bireylerde steril, berrak, acik sarı renkte sıvıdır. Aynı zamanda hücresel parçalar, tam hücreler, proteinöz atıklar ve kristaller de içerir<sup>15</sup>.

Nefronlar ortak açılma kanalları sayısında böbrek papillaları üzerinde bulunan deliklere açılırlar. Bu şekilde böbrekte oluşan idrar birikerek ilgili kanallara transfer edilir. Bu sırada kan akımı da sağlanmaktadır. Nefronların yaptığı süzme işlemi, salgılama, geri emilme işlemi sayesinde idrar şeklinde günde 1,5 lt su atılır. Nefron içinde bulunan süzücü kanallar sayesinde kanı temizlemektedir.

Nefronun etkili olduğu mekanizmalar:

1. Glomerüler filtrasyon: Glomerüldeki plazmanın önemli bir bölümünü glomerüler membrandan tübüler sistem içine filtre eder.
2. Tübüler reabsorbsiyon: Filtre edilen sıvı tübüllerde ilerlerken su ve diğer gerekli maddeler peritübüler kapiller ağda mevcut plazma içine reabsorbe edilir ve idrar oluşumuna katkıda bulunur.
3. Tübüler sekresyon: Son atıl ürünlerinin ve sindirilen inorganik maddelerin fazlasının idrarla

Vücut sıvı ve iyon düzeyindeki sapmalar idrar atılım sirkülasyonuna uygun değişikliklerle düzeltilmektedir. Elektrolit fazlalığında böbrek yolu ile fazlalık idrarla atılırken, azlığında ise elektrolitler böbrekler tarafından tutulmaktadır. Böbreklerde elektrolit dengesi tübüler geri emilim ile düzenlenmektedir. Proksimal kıvrımlı tubul Glomerulusta kandan filtre edilen sıvıdan su, üre, elektrolitler, glukoz ve bazı aminoasitlerin geri emildikleri yerdir.  $\text{HCO}_3^-$  geri emilim miktarı glomeruler filtrasyon hızına ve  $\text{H}^+$  salgılanma hızına bağlıdır. Glukoz ve aminoasitler hücre içi aktif taşıma sistemleri aracılığıyla Proksimal kıvrımlı tubüllerde geri emilirler<sup>15</sup>.

Distal tüplerde suyun geri emilişi vazopressin hormonunun kontrolünde gerçekleşir. Tüplerden suyun fazla miktarda geri emilimi ile idrar yoğunlaşır. Proksimal tüplerde emilmeyen sodyumun sekizde biri distal tüplerde aldosteron hormonun etkisiyle geri emilmektedir. Vücuda yeteri kadar sodyum alınmazsa vücutta su tutulamaz ve hücrelerarası sıvının hacmi azalır. Geri emilim, toplama kanallarında suyun geri emilimi sonucu idrar oluşumu ile sonlanmaktadır.



Plazma asit-baz düzeyleri ve plazma elektrolitlerinin homeostatik düzenlenmesinde nefronun işlevsel olarak en aktif bölgesi distal tübüllerdir. Bu bölgede salınım ve geri emilim işlemleri  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{H}^+$  arasındaki denge ile gerçekleşir. Tüm bu işlemlerin amacı plazma  $\text{HCO}_3^-$ 'inin azaltılması ve normal plazma pH'sının dengede tutulmasıdır<sup>7,17</sup>. Tübüler sıvıda bulunan su içeriğinin yaklaşık % 70'i proksimal tübülde, % 5'i Henle kulpunda, % 10'u distal tübülde, geriye kalan kısım ise toplayıcı kanallardan geri emilir<sup>15,18</sup>.

Vücut sıvılarının pH kontrolü akciğer ve böbrekler tarafından gerçekleştirilir. Bu organlar doku katabolizmasının yan ürünü olan fazla miktardaki  $\text{H}^+$  atılımını gerçekleştirirler. İnsanlarda hücre dışındaki en önemli tampon sistemi  $\text{HCO}_3^-$  tampon sistemidir. Bikarbonat tampon sistemi genel olarak ekstrasellüler sıvıların tampon sistemidir. Bu tampon sistemi ile hücre dışı sıvıdaki  $\text{H}^+$  iyonlarının % 90'ını kontrol altında tutar. Bikarbonat tampon sistemini zayıf bir asit olan karbonik asit ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) ile sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) oluşturur. Akciğerler kandaki  $\text{pCO}_2$ 'yi azaltmak için  $[\text{HCO}_3^-]/[\text{H}_2\text{CO}_3]$  oranını yükseltirler. Fosfat tampon sistemi Eritrositlerde ve böbrek tubulus hücrelerinde daha çok görev alır. Fosfat tampon sistemleri, böbreklerden  $\text{H}^+$  iyonlarının atılmasında önemli rol oynar. İnsanlarda,  $\text{H}_2\text{CO}_3$  vücuttan atılan  $\text{CO}_2$ 'ye dehidre olmağında çok az tamponlama özelliği vardır. Bu reaksiyon karbonik anhidraz enzimi ile katalizlenmektedir. Karbonik anhidraz enziminin yokluğunda bu reaksiyon oldukça yavaş gerçekleşir<sup>1,15</sup>.

Protein metabolizması ile oluşan üre, kreatinin ve ürik asit böbrekler tarafından vücuttan atılır. Kandaki üre, kan üre azotu (BUN) olarak tanımlanır. Karaciğerde fazla miktarda aminoasit metabolize edildiğinde doğal olarak üre oluşumu ve BUN düzeyleri de artmaktadır. Ürenin %40-50'si proksimal tübüllerde geri emilmektedir. Kreatinin iskelet kasında kreatinden non-enzimatik dehidrasyonla oluşmaktadır. Glomerüllerden serbestçe filtre olan kreatinin tübüllerden geri emilime uğramadığından glomerül filtrasyon hızı hesabında kreatinin klirensi kullanılır<sup>1</sup>.

### **2.1.1. Böbrek Fonksiyon Testleri**

Böbrek fonksiyonları tübüler ve glomerüler fonksiyon testleri ile belirlenir.

### **A)Tübüler Fonksiyon Testleri**

Böbreklerin konsantrasyon ve dilüe etme yetenekleri ölçülerek renal fonksiyon bozukluğu erken dönemde tespit edebilmek için bazı biyokimyasal testler yapılabilmektedir. Rutin idrar analizi, idrarda  $\alpha_1$ -mikroglobulin,  $\beta_2$ -mikroglobulin, retinol bağlayıcı protein, gama glutamil transferaz (GGT),  $\text{Na}^+$  düzeylerinin ölçümü tübüler fonksiyon bozukluklarının incelenmesinde kullanılmaktadır<sup>1,15</sup>. Böbrekte glutatyon sentezi gama glutamil transferaz tarafından dengelendiğinden brush-border'ın kaybı glutatyon sentezinde azalmaya yol açar. İdrarda bu enzim aktivitesindeki belirgin artışı, akut renal infeksiyonlarda, renal doku hasarına sebep olan bazı hastalıklarda görülür<sup>21,14</sup>.

### **B) Glomerüler Fonksiyon Testleri**

Böbrek plazma akımının yaklaşık %20'si glomerüllerden filtre olmaktadır. Glomerüler kapillerler, proteinlere karşı geçirgen yapıda değildir. Dolayısıyla glomerüler filtrat proteinsizdir ve eritrosit dahil hücresel elemanları içermez. Böbrek fonksiyonel kapasitesinin en hassas ve spesifik ölçümü Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR)'dir. GFR, fonksiyonel nefron sayısının göstergesi olarak düşünülmektedir. Glomerüler Filtrasyon Hızı, iki böbrekte bir dakikada oluşan glomerüler filtrat miktarıdır, sağlıklı bir insanda 125 ml/dk kadardır. GFR ölçümü sayesinde glomerüllerde hasar olup olmadığı, var olan hasarın derecesini belirlemek mümkündür. GFR ölçümü için kullanılan yöntemlerin çoğu, endojen veya eksojen maddelerin böbrekler tarafından atılma kabiliyetlerini kapsar<sup>15,22,1</sup>.

Böbreklerin birim zamanda bir maddeden tamamen temizlediği plazma volumü o maddenin renal klerensi olarak tarif edilir. Renal klerens, herhangi bir maddenin böbrekler tarafından belirli zamanda temizlendiği plazma hacmi olarak tanımlanır. Klerens ölçümü için kullanılacak olan madde dolaşımında serbestçe bulunmalı, glomerüler bazal membrana serbestçe filtre olmalı, nefron boyunca sekrete edilmemeli ve tübüllerden geri emilmemeli, böbrekte metabolize olmamalı, depo edilmemelidir. Ayrıca sabit hızda endojen üretilmeli ve kolaylıkla ölçülebilir olmalıdır. Klinikte klerens ölçümünde kullanılan endojen belirteçler kreatinin, üre ve düşük molekül ağırlıklı proteinler; eksojen belirteçlere ise inülin klerensi ve iohekazol klerensi'dir. Endojen

moleküllerin avantajlı görülmesinin sebebi, enjeksiyon gerektirmemesi ve kan örneğinin yeterli olmasıdır.<sup>1,15,16,23</sup>

GFR hızının ölçülmesinde en çok kullanılan yöntem kreatinin klerensidir. Kreatinin, iskelet kasında bulunan kreatin ve fosfokreatinden oluşur. Kreatin, daha sonra fosfokreatine dönüştürülmek üzere kanla kaslara ve beyine taşınır. Serbest kreatinin, kreatin metabolizmasının atık ürünü olup tüm vücut sıvılarında bulunur ve serbest olarak glomerüler filtrasyona uğrar. Kreatinin vücut sıvılarında sabit bir hızla salındığından, plazma düzeyleri belirli sınırlar içindedir. Kan kreatinin seviyesini ve kreatininin tübüler sekresyonunu etkileyen faktörler kreatinin klirensini de etkilemektedir.<sup>24,22,25</sup>

## **2.2. Böbrek Yetmezliği**

Böbreğin normalde yaptığı görevlerini yapamama durumuna böbrek yetmezliği denir. Böbrek yetmezliği geliştiğinde böbreklerin toksik maddelerin vücuttan idrar yoluyla uzaklaştırılması, fazla suyun uzaklaştırılması, kan basıncının kontrolü, kan hücrelerinin yapımının kontrol edilmesi, gibi görevlerinde aksamalar olmaktadır.

Böbreğin işlevsel değişimlerine en duyarlı ve özgül belirteci GFR ölçümüdür. GFR'nin 80 mL/dak'nın altına inmesi böbrek yetmezliği olarak tanımlanır. Bu fonksiyon kaybı geri dönüşümlü ise akut böbrek yetmezliği (ABY), geri dönüşümsüz ise kronik böbrek yetmezliğidir (KBY)<sup>1,15,23</sup>.

### **A) Akut Böbrek Yetmezliği**

Akut böbrek yetmezliği, böbreklerin kandaki atık maddeleri süzme fonksiyonlarını ani bir biçimde kaybetmesidir.

Akut Böbrek Yetmezliğinde glomerular filtrasyon hızında ani azalma ve azotlu atık madde birikmesi söz konusudur ve genellikle geri dönüşümlüdür. Akut Böbrek Yetmezliği (ABY), böbreklere kan akışının yavaşlaması veya kesilmesi; aşırı kan veya sıvı kaybı, kalp krizi, kalp hastalıkları, böbrek atardamarının tıkanması, enfeksiyonlar, şok, ciddi alerjik reaksiyonlar, ciddi yanıklar, non steroid antiinflamatuvar ilaçlar, tansiyon ilaçları, böbrek hasarı, böbrek atardamarında veya toplar damarında pıhtılaşma, yüksek kolesterol, nefrit, bağışıklık sistemi hastalıkları, antibiyotikler, kimyasallar, kemoterapi ilaçları, görüntüleme tekniklerinde kullanılan radyoaktif

boyalar, kan hastalıkları, alkol, ağır metal, kokain gibi toksik maddeler bu duruma sebep olabilir. ABY hızlı gelişir ve bu nedenle kontrol edilmesi zor olan hızlı bir sıvı, asit-baz ve elektrolit dengesizliği ortaya çıkar ve ölüm oranı yüksektir. ABY'de GFR düşüşü KBY'ye göre oldukça hızlıdır<sup>25,26,27,28</sup>.

## **B)Kronik Böbrek Yetmezliği**

KBY, çeşitli hastalıklara bağlı olarak kalıcı nefron kaybı ve kalıcı böbrek fonksiyon kaybıdır. GFR giderek azalır; epitelyal hasar, glomerül ve parietal bazal membran hasarı, nefronların tahribi söz konusudur. Böbrek yetmezliği olan bir kişide; üç ay veya daha uzun süren azotemi, uzun süreli üremik belirti ve bulgular, anemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi, idrar sedimentinde geniş silendirler ve radyolojik incelemelerde bilateral küçük böbrekler kronik hastalığın göstergesidir. Bu özellikler KBY'yi ABY'den ayırt etmede kullanılır<sup>29</sup>.

Kronik Böbrek Yetmezliğinde, böbrekler sıvı-elektrolit dengesini sağlayamaz, sıvı hacmi ve renal kan akımını düzenleyemez, kan basıncı kontrolü, nitrojen ve diğer artıkların uzaklaştırılması, eritropoetin yapımı, serum, kalsiyum ve fosfat düzenlemesi artık yapamaz. KBY bulguları böbreğin atılım, düzenleme, biyosentez fonksiyonlarının bozulması veya belirli maddelerin aşırı üretimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu sebepten dolayı KBY'nin orta derecedeyken teşhis edilmesi hastalığın ilerlememesi açısından oldukça önemlidir<sup>1,13,15,30</sup>. Böbrek yetmezliği gelişen hastalarda; H<sup>+</sup> sekresyonu azaldığı için asit atılımı bozulur, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> geri emilimi azalmaktadır, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> den NH<sub>3</sub> sentezi azalır, Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> geri emilimi azalır, net asit atılımı azalır<sup>23,31</sup>.

Nefrotoksisiteye sebep olan ilaçlar arasında aminoglikozidler, amfoterisin B, indometazin, ACE inhibitörleri, tolazolin, nöromusküler bloke edici ajanlar, radyokontrast maddeler de vardır<sup>27,32</sup>. Nefrotoksisite renal iskemiden, toksisiteden yahut her ikisinden birden kaynaklanabilir.

### **2.3. Aminoglikozidler**

Aminoglikozidler aminosiklitol halkasına bağlı iki yada daha fazla amino-şeker grundan oluşmaktadır. Sadece spektinomisin aminoşeker ve glikozidik bağ içermediğinden diğer aminoglikozidlerden farklıdır. Aminoglikozidler fizyolojik pH olan 7,4'de katyoniktir. Aminoglikozid ilaçlar grubuna gentamisin, streptomisin,

netilmisin, tobramisin, viomisin, isepamisin, arbekasin, amikasin, spektinomisin, neomisin, paromomisin, kanamisin, sisomisin, dibekasin girmektedir. Antibakteriyel gücü en fazla olan grup ise gentamisinidir<sup>33, 34,35</sup>.

### **2.3.1. Farmakokinetik Özellikleri**

Aminoglikozidlerin farmakokinetikleri benzerdir. Çok düşük oranlarda proteine bağlandıklarından hücrenin dış yüzeyi ile iyonik etkileşim halindedirler. Aminoglikozidler bakteri hücre membranını aktif transportla geçer. Aktif transport oksijen gerektirdiğinden anaerob bakteriler üzerine etkisizlerdir. Aminoglikozidlerin bakterisidal etkinliklerinin sebebi, aktif taşıma ile hücre içinde hücre dışından daha yüksek konsantrasyona ulaşma özelliklerine bağlanmaktadır. Gram negatif bakteri hücre duvarında lipopolisakkaridlere, fosfolipidlerin polar başlarına ve dış membran proteinlerine bağlanmak suretiyle, yarışmalı olarak  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarını yerlerinden oynatırlar. Hücre duvarının normal geçirgenlik fonksiyonu bu durumda bozulmaktadır. Hücre zarını geçmiş olan aminoglikozid artık irreversible olarak sitoplazma içinde kalır. Aminoglikozidler polar yapıları nedeniyle çok az lipofilik özellikte olduğundan sindirim kanalından absorpsiyonları oldukça azdır. Aminoglikozidler kan-beyin, beyinomurilik sıvısı (BOS), kan-göz bariyerini çok az geçerler<sup>33,35,36,37</sup>.

Molekül büyüklükleri, polikatyonik yükleri ve lipid içinde çözünemediklerinden aminoglikozidlerin hücre içine girişleri zordur. Ancak nefrotoksik ve ototoksik etkilerinden dolayı renal tübüler hücrelere ve iç kulak hücrelerine özel bir mekanizma ile girebilirler. Aminoglikozidler vücutta metabolize edilmezler ve parenteral uygulamadan sonra % 99'u değişmeden böbrekler aracılığıyla atılır. İdrarda yarı ömrü 48-200 saattir. Tedavi kesildikten sonra 20 gün veya daha uzun süreyle idrarda düşük seviyede ilaç saptanabilir<sup>33,35,36</sup>.

### **2.3.2. Aminoglikozidin yan etkileri**

Aminoglikozidlerin güvenli kullanılabileceği aralık çok dardır ve kullanımlarındaki en önemli kısıtlayıcı özellik toksisiteleridir. En sık nefrotoksisite, ototoksisite, nörotoksisite (nöromusküler blokaj) meydana gelir. Böbrek korteksi ve proksimal tübüluslarda birikim yaparak reversibl akut tübüler nekroza benzer tablo oluşturmaktadır. Aminoglikozidler renal vazokonstrüksiyona neden olurlar, proksimal

tubülde direkt hücresele toksisite yaparlar. Böylelikle tubüler nekroz, tubüler atrofi, intratubüler myeloid cisimler ve interstisyel nefrit gelişebilir. Neomisin, kanamisin, gentamisin en fazla, streptomisin ise en az nefrotoksik olanıdır.<sup>37,38,39</sup>

#### **2.4. Gentamisin**

Gentamisin, organik polikasyon yapısında bir antibiyotiktir. Yapıca birbirine benzeyen üç gentamisin türünün(gentamisin C<sub>1</sub>,C<sub>1a</sub> ve C<sub>2</sub>) karışımından ibarettir. Aminoglikozidler içinde amikasinden sonra spektrumu en geniş olanıdır. Kitlesine göre, streptomisin, kanamisin ve amikasinden daha güçlüdür. Aminoglikozid ilaçlar içinde antibakteriyel etki gücü en yüksek olanıdır. Gentamisin Enterobacteriaceae grubu (E. Coli, Klebsiella, Aerobacter vb.) bakteriler ile Pseudomonas22 aeruginosa gibi gram-negatif basiller, penisiline, metisiline- dayanıklı Staph. Aureus suşları üzerinde etkilidir. Plazma proteinlerine çok az bağlanır. Bakterisid etkiye sahiptir.<sup>40,41</sup>

Gentamisin mutad olarak 1-2 mg/kg dozunda 8 saatte bir (günde 3 kez) i.m. veya i.v. injeksiyon suretiyle kullanılır. Böbrek yetmezliği olan hastalarda dozunun ayarlanması ve mümkünse serumdaki düzeyinin izlenmesi gerekir<sup>42</sup>.

Gentamisinin en önemli yan etkisi nefrotoksisitenin tedavinin 2-5. gününde geliştiği düşünülmektedir. Nefrotoksisite serum kreatinin düzeyinde 0,4-0,5 mg/dl'lik anlamlı artışı olarak yorumlanmıştır. Çoğunlukla nefrotoksisite gelişen olgularda oligüri yoktur. Reversibl olan nefrotoksisite ilacın dozu ve kullanım süresiyle doğru orantılı olarak renal kortekste birikme özelliğinden kaynaklanmaktadır.<sup>16,18,43,44</sup>

#### **2.5. L-Arginin – Nitrik Oksid Yolağı**

Arginin, kimyasal olarak  $\alpha$ -amino  $\delta$ -guanidovalerik asit yapısındadır. Karaciğerde glutamat semialdehit üzerinden transaminasyonla oluşan ornitin, üre döngüsünün ara maddesidir. Üre döngüsündeki reaksiyonlar sonunda arginin oluşur, arginaz adlı enzimin katalitik etkisiyle ornitin ve üreye parçalanır. İnce barsakta glutamattan oluşan sitrülün sistemik dolaşıma geçer, oradan da böbrekler tarafından alınarak proksimal tübüllerde arginine çevirilir. Arginin, çocuklar ve gençler için esansiyeldir. L-arginin ihtiyacı büyüme döneminde, travma ya da enfeksiyon durumunda artar. Nitrik oksid (NO $\cdot$ ), nitrik oksid sentazın (NOS) etkisiyle L-argininden moleküler oksijen, NADPH, FAD, FMN, tetrahidrobiopterin, Ca<sup>+2</sup>, hem kompleksi ve

tiyol gibi çeşitli kofaktörlerin varlığıyla sentezlenir L-Argininden NO $\cdot$  sentezini katalizleyen nitrik oksid sentezini katalizleyen nitrik oksid sentazın (NOS) izoformları endotelial NOS (e NOS), nöronal NOS, indüklenebilir NOS'dur. Ca<sup>+2</sup> bağımlı endotelial ve nöronal NOS etkisiyle, sürekli ve az miktarda NO $\cdot$  sentezlenmektedir<sup>45</sup>

İlk olarak endotelium kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak adlandırılan bu maddeye daha sonra nitrik oksid (NO) denilmiştir<sup>46</sup>.

NO, yarı esansiyel bir aminoasit olan L-argininden sentezlenir. Bir azot atomu ve bir oksijen atomunun kombinasyonundan oluşmuş ve ortaklanmamış bir elektron içeren bir bileşik olarak tanımlanır. NO sentez edildikçe salıverilen bir molekül olup yapısı gereği depolanmaya uygun değildir. Fazla miktarda oluşumunun dokular üzerinde toksik etkisi olduğu için hızla etkisiz hale dönüştürülür. NO, Guanilil siklazın hem grubuna bağlanarak, hücre için ikincil haberci molekül olarak çalışan siklik guanozin monofosfat (sGMP)' nin birikmesine yol açar. NO'nun hücre içi Ca<sup>+2</sup> düzeyini düşürdüğü anlaşılmıştır. Bu etkiler sGMP üzerinden olur<sup>47,48</sup>.

NO damar endotel hücrelerinde, aynı zamanda serebellum, ön beyin nöronlarında, nötrofil lökositlerinde, böbrek tübülüs epitel hücrelerinde, adrenal medulla hücrelerinde, mast hücrelerinde ve bazı otonom sinir uçlarında sentez edilip salıverilmektedir. L-arginin analogu NO sentaz inhibitörleri; NG-nitro-L-arginin (L-NA), N-nitro-Larginin metilester (L-NAME), N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO), N-amino-L-arginin (LNAA) ve N-N-dimetilarginin (ADMA) ve NG-monometil-L-arginin (L-NMMA) 'dır. NO, hemodinamik fonksiyonlarından dolayı faydalı olabilirken iNOS'tan salgılandığı yüksek miktarlarda ise zararlı olabilmektedir<sup>48,49,50,51,52</sup>.

## 2.6. Nitrik oksid (NO $\cdot$ )

Nitrik oksid, çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirebilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron taşıması; aynı zamanda bu elektronun nitrojen ve oksijen atomu üzerinde bulunması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bununla bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür.

Oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel/kimyasal mekanizmalarla oluşturulurlar. Oysa vücudumuzda NO sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin

metabolize edilmesi sırasında oluşan NO bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksid sentaz (NOS) enzimidir. Bu enzimin nöronal, endotelial ve indüklenabilir olmak üzere 3 formu vardır.

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikaller ile tepkimeye girmesi NO'ye antioksidan bir etki de kazandırır.

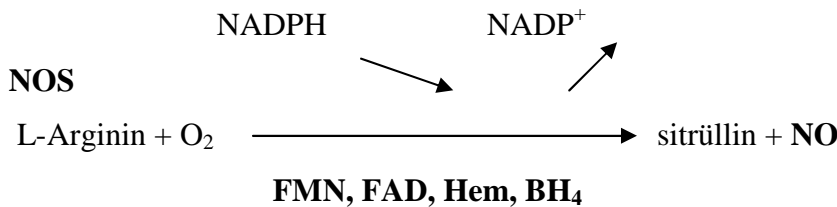
Fizyolojik değişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir. Derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile ömrü arasında ters bir orantı vardır<sup>19,61</sup>.

### 2.6.1. Yapısı ve Kimyasal özellikleri

Nitrik oksid azot monoksit olarak da adlandırılan oldukça toksik olan renksiz bir gazdır. Serbest radikal tanımına uyar ve yarı ömrü çok kısadır. Lipofilik özellikte olup, oksijen varlığında stabildir ve suda erir. Düşük dozlarda toksik değildir ve fizyolojik olarak önemli rolleri vardır<sup>20</sup>.

Nitrik oksid, L-argininden NOS (Nitrik oksid Sentetaz) aracılığıyla sentezlenir. NOS, L-argininden moleküler oksijen, Hem, FAD, FMN, ve  $\text{BH}_4$  (tetrahidrobiopterin) kofaktörleri aracılığıyla Sitrülin ve NO oluşturur. Sit.P-450 redüktazdaki gibi moleküler oksijen protoporfirine bağlanmadan önce  $\text{Fe}^{+3}$  'ü  $\text{Fe}^{+2}$ 'ye dönüştürür. Yine NOS uyarıldığında iki moleküler oksijen L-arginine girerek bazı ara ürünler oluşturarak NO ve sitrülin üretilmektedir<sup>21</sup>.

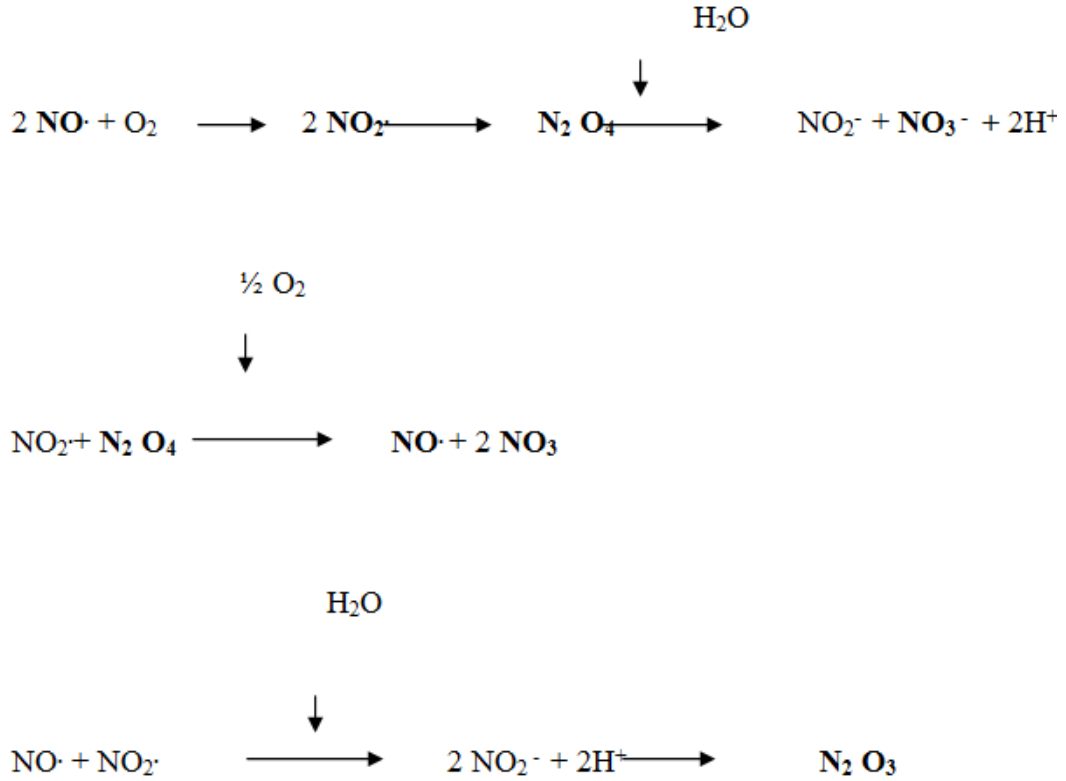
### NO sentezi





NO<sup>•</sup> elektriksel olarak yüksüz olduğundan, reseptöre bağımlı olmayan yollarla kolayca membranlardan difüze olabilir. NO<sup>•</sup> aşağıdaki gibi bir seri nitrojen dioksitlerine dönüşebilir<sup>19</sup>.

### 2.6.1.1. Nitrojen Oksitlerin Etkileri



Şekil 1. Nitrojen Oksitlerinin Etkileri

**NO<sup>•</sup>(Nitrik oksid) :** Serbest Radikal

**NO<sub>2</sub><sup>•</sup> (Nitrojen dioksit) :** Serbest Radikal, Nitroze edici ajan

**N<sub>2</sub> O(Nitröz oksit) :** Anestezik

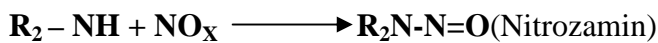
**N<sub>2</sub> O<sub>3</sub> (Dinitrojen trioksit) :** Nitroze edici ajan

**N<sub>2</sub> O<sub>4</sub> (Dinitrojen tetraoksit) :** Dimerik NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, nitroze edici ajan

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(Nitrit) :** Asidik ortamda NO oluşturur.

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(Nitrat) :** Stabil Anyon

Nitrojen oksitleri (NO<sub>X</sub>) aminleri nitrozilleyerek, nitrozaminleri oluşturur<sup>19</sup>.



Nitrozaminler, DNA'da nitrozilasyon, deaminasyon, ve alkil nükleofillerinin oluşumlarına neden olabilirler. Bu şekildeki mutasyonlar onkojenleri indükleyerek malign transformasyon oluştururlar<sup>19</sup>. Ayrıca NO<sup>•</sup>, aminoasitlerde S-nitrosotiol oluşumu ile karbonhidratlar ve pürinlere de hasar verirler. Böylece nitrojen içeren bileşiklerin yangı, kalp ve damar hastalıklarının da önemli rolleri olduğu doğrulanmaktadır.

NO<sup>•</sup> bir elektron alarak **nitroksil** anyonuna (NO<sup>-</sup>), bir elektron kaybederek **nitrozonyum** (NO<sup>+</sup>) kationuna dönüşür. NO<sup>•</sup>'nin düşük konsantrasyonları oksijenden çok hemoglobine bağlanarak, hemoglobinin oksijen formunda iken NO<sup>•</sup>'yu önce NO<sub>2</sub><sup>•</sup> (nitrit) daha sonra da NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrat) oksitler ve kendisi methemoglobine dönüşür<sup>21</sup>.

### 2.6.1.2. Nitrik oksid etki mekanizması

- NO<sup>•</sup> üretildiği hücreden çıkıp, direkt hücre içine girerek hedef moleküle bağlanıp direkt veya enzim aktivitesini değiştirerek etkisini gösterir.
- NO<sup>•</sup>'in nörotransmitter, tümör hücre ölümü, yangıda önemli rolü vardır.
- NO<sup>•</sup>'nin en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi moleküllerdir.
- Makrofajlardaki NO<sup>•</sup>, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak, antitümoral ve antimikrobiyal etki gösterir.
- Mitokondriyal elektron transport sisteminin enzimlerinin aktivitesini azaltır.
- Tümör hücresindeki ribonükleotid reduktazı inhibe ederek DNA sentezini engeller.
- Ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açabilir bu da organik ve lipid peroksidasyonuna neden olabilir.
- NO<sup>•</sup> sülfhidril (S-H) grubuyla reaksiyona girerek S-nitrozilasyon yapabilir ve plazminojen aktivatörü gibi bazı enzimlerin katalitik fonksiyonunu artırabilir.
- NO<sup>•</sup> süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) molekülü ile reaksiyona girerek önce peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) daha sonra nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>) oluşturabilir. Bu oluşumlar da tirozini 3-nitrotirozine (NO<sub>2</sub>Tyr) dönüştürür. NO<sub>2</sub>Tyr düzeyinin oksidatif hasarın bulunduğu durumlarda arttığı ve aterosklerozis, septik şok, nörodejeneratif hastalıklar, akut akciğer hasarı, organ transplantasyonu, yangılı barsak enfeksiyonları, romatoid artirit, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, yaşlanma ve sigara içenlerde arttığı gözlenmiştir<sup>23</sup>.

## 2.6.2. NitrikOksit Sentetaz (NOS)

NO'sentezlenmesini sağlayan NOS enziminin iki izoenzimi vardır.

### A-) Yapısal (Konstitüf) NOS (cNOS) :

Bu enzimin aktivitesi ikincil haberci  $Ca^{++}$ 'ya bağımlıdır. Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etkileşimde, kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks, cNOS'un aktifleşmesini sağlar ve NO sentezlenir.  $Ca^{++}$ 'u artıran uyarı kesilince, hücre içi  $Ca^{++}$  'da azalmaya başlar. cNOS enzim aktivitesi ortadan kalkarak NO sentezi durur. Bu nedenle cNOS enzimi normal biyolojik sistemlerde az miktarda NO sentezler. cNOS bulunduğu hücrelerde ancak  $Ca^{++}$  aktivitesi yükselince aktif duruma geçer. İnsan vücudunda tesbit edildikleri başlıca dokular; damar endotel hücreleri, ürogenital sistem dokuları, santral ve periferik sistemi nöronları, adrenal korteks ve medulla hücreleri, trombositler ve barsak intersitisyumudur. Fizyolojik olarak yapısal nöronal NO sentaz (nNOS) NMDA reseptörlerinin, glutamate stimülasyonu sonrasında kalsiyumun hücrenel akımı ile üretilir <sup>1</sup>.

Yapısal NOS'ta iki bölümde incelenmektedir: nNOS (nöronal) ve eNOS (endotelial)'tur.

1- nNOS kaynaklı NO: Temel olarak sinir sisteminde bulunmakla birlikte başka dokularda da tesbit edilmiştir.

#### a-) Mekezi Sinir Sistemi:

- Nörotransmitter/nöromodulatör olarak görev yapar. En düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Presinaptik uçtan salınan glutamatın etkisiyle, postsinaptik uçtaki hücrenin NOS'u aktiveştirilir ve NO sentezlenir.
- Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur.
- Koku alma, görme, ağrı algılama ve hafızanın oluşmasında görev alır.

#### b-) Periferik Sinir Sistemi :

- Noradrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak görev yapar.
- Solunum fonksiyonlarında, penil ereksiyonda, gastrointestinal sistem motilitesinde, mesane sifinkterinde ve bu organların kan basıncı ve akışının düzenlenmesinde rol alır<sup>1</sup>.

## 2- eNOS kaynaklı NO:

- Düz kasları gevşeterek kan basıncı ve akış hızını regüle eder.
- Trombositlerin, adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder.
- Endotel hücre ve vasküler düz kas hücresinde antiproliferatif etkisi vardır.

## B-) Uyarılabilir (İnducible) NOS (iNOS)

İlk olarak endotoksin ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. iNOS aktivites için kalsiyuma bağımlı değildir. Bunun nedeni enzimin kalmodulinle çok sıkı bağlanmış olması olabilir. Fakat kalmodulinin buradaki rolü bilinmemektedir. iNOS başta makrofajlar (monosit, histiyosit, kuppfer hücreleri gibi) olmak üzere polimorf nükleer lökositler (PMNL), hepatositler, damar düz kası, damar endoteli, astrositler ve kondrositler tarafından üretilebilir. Enzim indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, uzun süre devam eder. Özellikle nonspesifik immünitede önemli rol oynar. Bakteri, mantar, protozoonlara, tümör hücrelerine sitotoksik veya sitostatik etki gösterir. Yangısel ve otoimmün hastalıklarda da rol oynamaktadır. iNOS normalde hücre içinde bulunmaz. Ancak bakteriyel ürünler ve sitokinler ile temastan sonra miktarı (transkripsiyonel indüksiyon: mRNA artışı) artırılır.

**Tablo 1. cNOS ile iNOS Arasındaki Farklar**

	<b>cNOS</b>	<b>iNOS</b>
Ca <sup>2+</sup> bağımlılık	Var	Yok
NO oluşum Düzeyi	pikomol	nanomol
Uyarana Yanıt	Hemen	Geç
NO üretim süresi	Kısa	Uzun
Glukokortikoidlerin Etkisi	Etkilenmez	İnhibe edilir

Organizmada normal fizyolojik şartlarda veya herhangi bir patolojik olaylar sonucunda serbest radikaller oluşmaktadır. Bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi ile serbest radikaller arasındaki dengenin serbest radikaller lehine

kayması oksidatif stresi oluşturur <sup>53</sup>. Hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinden, hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlayan lipid peroksidasyonu oksidatif stresin en tipik göstergesidir <sup>54</sup>.

Serbest radikal reaksiyonları özetle aşağıdaki gibi sıralanır:

- 1- Hidrojen çıkarılması:  $A + RH \rightarrow AH + R$
- 2- Elektron transferi:  $X^- + Y \rightarrow X + Y^-$
- 3- Eklenme:  $X + RCH = CHR \rightarrow XR_2$
- 4- Sonlandırma:  $A \cdot + A \cdot \rightarrow A_2$
- 5- Oran bozulması:  $CH_3CH_2 + CH_3CH_2 \rightarrow CH_3CH_3 + CH_2 = CH_2$  (119).

Serbest oksijen radikalleri normal hücre metabolizması süresince sürekli olarak üretilmektedir ve antioksidan savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilir. Ancak antioksidan sistem baskılandığı zaman oksidatif stres ortaya çıkar.

Oksidatif stres; karsinogenezin başlamasında kritik rol oynayan DNA hasarına, tümör süpresör genlerde mutasyonlara, kromozomal sapmalara, kontrol edilmeyen hücre bölünmelerine neden olarak tümör gelişimine yol açar <sup>55</sup>.

## **2.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Organizmadaki Oksidatif Hasar Mekanizması**

Reaktif oksijen türleri (ROT) karbonhidratlar, lipidler, nükleik asitler, serbest aminoasitler, proteinler, lipoproteinler, ve bağ dokusu molekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmadaki hemen hemen tüm biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geriye dönüşlü veya dönüşsüz etkiler meydana getirebilmektedir <sup>56</sup>.

ROT'ların içinde en reaktif olanı hidroksil radikalidir ve yarı ömrü oldukça kısadır. Bu yüzden mitokondriler veya mikrozomlarda oluşan serbest radikallerin, hücrenin diğer bölümlerini (örn; DNA) direkt olarak etkilemesi pek mümkün değildir. Ancak bir serbest radikal, radikal olmayan bir moleküle etkileşerek, onun serbest radikal haline gelmesine neden olabilir. (serbest radikal indüksiyonu) ve bu olay, zincir şeklinde bir reaksiyonu başlatabilir <sup>26</sup>. Böylece serbest radikaller, oluştukları yerlerin uzağındaki hücresel komponentlere bu zincirleme reaksiyonların yıkım ürünleri aracılığıyla etki edebilirler. İki serbest radikal karşılaştığı zaman, birbiriyle reaksiyona girerek radikal

olmayan stabil bir molekül de oluşturabilir. Bu durum, serbest radikal indükleme zincirinin sonlanmasına neden olur.

Süperoksit molekülü; çok reaktif olmakla birlikte hidroksil radikali kadar hasar verici değildir; hidrojen peroksit varlığında, geçiş metalleri aracılığıyla hidroksil radikali oluşturabileceğinden dolayı, oldukça hasarlayıcı bir potansiyele sahiptir. Oluşumlarına neden olduğu diğer radikaller ile birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranır.  $O_2^-$  sülfidril gruplarının disüfidlere oksidasyonu ve ferrik demirin ferroz formuna oksitlenmesine neden olur. Ayrıca diğer metallere elektron vererek veya elektron alarak, organizmada fonksiyonel metallerin oksido-redüksiyon düzeyini bozar. Sülfidril gruplarının ve metal iyonlarının canlıdaki sayısız fonksiyonları göz önüne alındığında, radikallerin, hücrede metabolik olayları ve oksido-redüksiyon potansiyelini değiştirerek sayısız etkilere neden olacağı açıktır<sup>57</sup>.

Hidrojen peroksit, hücreye direkt hasar vermez. Fakat tüm biyolojik membranlardan kolayca geçebilir. Süperoksit varlığında hidroksil radikaline dönüşebilir. İşte bu nedenle güçlü hasar verici etkisi vardır.

Hidroksil radikali ise etrafındaki hemen hemen her biyomolekülle reaksiyona girebilir. Lipid peroksidasyonunu başlatma, DNA da kırılma ve hasarlanmalar, enzimlerin aktif merkezlerindeki SH ve benzeri grupların oksitlenmesi, polisakkaritlerin depolimerizasyonu gibi değişik hasarlanmalar yapabilir<sup>57</sup>.

Radikalik tepkimeler şu şekilde engellenmeye çalışılır:

- a) Oluşan radikallerin antioksidanlar ile indirgenmesi
- b) Radikallerin birbirleri ile tepkimeleri
- c) Ortamda tepkimeye girebilecek bileşik kalmaması

Buna göre hücresel koşullarda, oluşan radikalin çok erken safhalarda indirgenmesi biyomoleküllerin korunması bakımından hayati öneme sahiptir. Yaşam için mutlaka gerekli olan oksijen, canlıların yaşamının sona erdirilmesinde de etkili olan faktörlerin başında gelir. Canlıların yaşlanması, radikallerin neden olduğu kalıcı hasarların bir birikimi olarak değerlendirilmektedir.

Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif

formlarına çevrilmesi zorunludur. Örneğin; biyolojik ihtiyacın üzerinde üretilen radikaller gözlenen toksik etkilerden sorumludurlar. Çevresel faktörler (Örneğin: iyonlaştırıcı radyasyon), vücuda alınan çeşitli kimyasal bileşikler, çeşitli enfeksiyonlar, doku travmaları gibi patolojik durumlar vücutta radikal yapımında artışa neden olurlar. Düşük derişimdeki radikal yapımının etkileri çok uzun bir süreç sonunda örneğin yaşlanma sonunda görülürken; yüksek derişimde ve yaygın radikal yapımının etkileri kısa sürede ve ciddi bir patolojik durum olarak karşımıza çıkabilir<sup>56</sup>. Fakat son yıllarda daha ayrıntılı yapılan araştırmalar antioksidanlar ve prooksidanlar hakkında bazı çekinceler ortaya çıkmıştır. Bir çok patolojik durumda örneğin; ateroskleroz gibi, iskemik kalp hastalığı, kardiyak hipertrofisi, hipertansiyon, şok ve travma gibi hastalıklarda da rol oynar. Ayrıca, aynı zamanda inflamatuvar, akciğer, böbrek, karaciğer hastalıkları, romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıklarda ve glomerulonefrit gibi çeşitli renal hastalıklarda, tubulointerstisyel nefrit, kronik böbrek yetmezliği, proteinüri, üremi ve son olarak peptik ülser, gastrointestinal ve bağırsak hastalığı, kolit, diyabet, tümör ve kanser gibi hastalıklarda da rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir<sup>25,33</sup>.

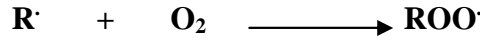
### **2.7.1. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit**

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda oluştukları zaman organizmada değişik bozukluklara yol açarlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. PUFA'nın oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Membran akışkanlığı, geçirgenliği, hareket yeteneği, transmembran iyonik gradyenti bozulur ve oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür<sup>58</sup>

**1. Başlangıç basamağı (initiation):** Otoksidasyon reaksiyonları zinciri olan lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan OH<sup>•</sup>, HO<sub>2</sub> ve <sup>1</sup>O<sub>2</sub> gibi reaktif bir serbest radikal ile membran yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin (RH), karbon zincirindeki metilen gruplarının birinden, bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Daha az reaktif olan süperoksit ve hidrojen peroksit bu reaksiyonu direkt başlatmaz. Böylece PUFA'nın karbon zinciri, doymamış bir lipid radikali (R<sup>•</sup>) haline gelir.



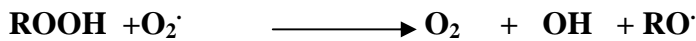
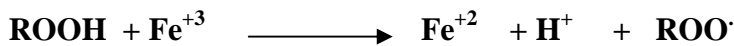
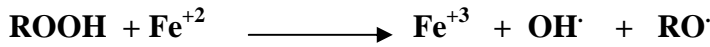
**2. İlerleme basamağı:** Oluşan bu lipid radikali oldukça kararsız bir bileşiktir ve stabilizasyonu için dien konjugasyonu ile çift bağların normal yeri değişerek, dien konjugatı oluşur. Ardından bu konjugat oksijen etkisine maruz kalarak, lipid peroksil radikali (ROO $\cdot$ ) meydana gelir.



Lipid peroksil radikalleri, kendi yapıları içerisindeki düzenlemelerle lipid endoperoksitleri haline gelirler. Daha sonra membran yapısındaki diğer PUFA'ları oksitleyerek yeni zincir tepkimeleri başlatırken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alırlar ve lipid hidroperoksitlerine (ROOH) dönüşür.



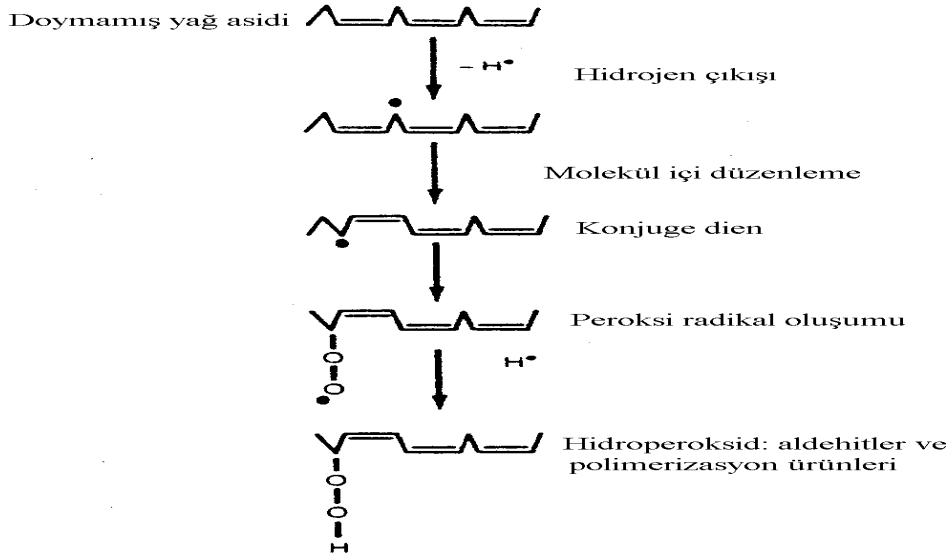
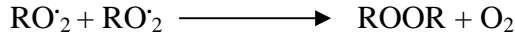
Bu reaksiyonlar yayılarak zincirleme devam eden lipid peroksidasyon reaksiyonlarına neden olarak yeni lipid hidroperoksilleri oluşur. Sonuçta; oluşan ürün hidroperoksiller (ROOH), süperoksit anyonu, perhidroksil radikali, yada geçiş metali iyonları temas edene kadar stabil kalırlar. Daha sonra bunlarla temas ettiklerinde lipid hidroperoksilleri parçalanarak daha radikalik özelliğe sahip olan türlere (lipid alkoksil: RO $\cdot$ , lipid peroksil : ROO $\cdot$ ,aldehit, lipid aldehid ve alkil radikaller gibi) çevrilirler.



Bunlardan özellikle lipid aldehitler (4-hidroksinonenal ve malondialdehit) oluştukları yerden diffüze olmak suretiyle, hücrenin diğer kısımlarına gidip hasar oluşturabilirler.



**3. Sonlanma basamağı:** Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları, iki lipid peroksid radikali birbiriyle etkileşinceye (annihilasyon) kadar devam etmektedir. Sonuç itibariyle endo peroksid (ROOR) oluşmaktadır (Şekil.....) <sup>59,60,61</sup>.



Şekil 2. Bir Poliansatüre yağ asidinin (PUFA) peroksidasyonu <sup>61</sup>.

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden PUFA'ların peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA), membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonlarına neden olabilir. Bu yüzden membran deformasyonu, membran transport bozuklukları, enzim aktivite değişiklikleri ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonları gibi patolojik sonuçları olabilir. Bu etkiler MDA'nın mutajenik, karsinojenik ve genotoksik etkilerini açıklar. Değişik koşullara maruz kaldığında polimorf nükleer lökositlerden oksijen patlaması olur. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) dismutasyonu ile oluşan Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) ve metal katalizörlüğünde  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ 'den hidroksil radikal ( $OH\cdot$ ) oluşur <sup>36,62</sup>.

**Proteinlere Etkileri:**Serbest radikallerin doymamış ve sülfür içeren moleküllerle olan reaktivasyonu sebebiyle, triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasit içeren proteinler serbest radikallerle etkileşim sonucunda da sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucu immünoglobulin G ve albümin gibi disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapısı bozarak metabolik aktivitelerini engeller<sup>63</sup>.

**Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri:** İyonize edici radyasyonla meydana gelen serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon ve ölüme sebep olurlar OHradikalinin hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde, radyasyonun sebep olduğu hücre ölümünden büyük oranda sorumlu olduğu düşünülmektedir. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşır ve DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden çok daha kolay zarar görebilen açık hedeftir<sup>64,65,66</sup>.

**Karbonhidratlara Etkileri:** Serbest radikallerin karbohidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin oto oksidasyonu ile hidrojen peroksit, peroksitler ve okzalaldehitler oluşmaktadır. Okzalaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağ yapabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etkiye sahiptirler. Böylece kanser ve yaşlanmada önemli rol oynarlar<sup>64</sup>.

## 2.8. Antioksidanlar

Okside olabilen substrata göre, ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen maddeye antioksidan denir<sup>67</sup>. Antioksidanlar hem hücre içi sıvıda hem de hücre dışı sıvıda bulunarak serbest radikal hasarını önlerler. SOD, GPx ve CAT gibi enzimler mitokondride bulunurlar. Antioksidan savunma sistemleri birincil ve ikincil savunma sistemleri olarak ikiye ayrılırlar.

Antioksidanların ilk gözlenen etkileri, zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu engellenmesi olmuştur. Antioksidanların, günümüzde lipitleri, proteinleri, nükleik asitleri ve diğer hedef makromolekülleri koruduğu bilinmektedir<sup>68,69</sup>.

Antioksidanların etkileri başlıca iki şekilde gösterilir:

**A) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:**

- 1- Oksijeni uzaklaştırıcı veya azaltıcı etkiye sahiptir.
- 2- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etkiye sahiptir.
- 3- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etkiye sahiptir.

**B) Antioksidan Etki Tipleri**

1. Toplayıcı (scavenger) etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek tutma veya daha zayıf bir bir moleküle çevirme işlemine denir. Antioksidan enzimler bu etkiye örnektir.
2. Bastırıcı (quencher) etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. Vitamin, flavonoid, trimetazin, antasyonoidler.
3. Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest oksijen radikallerini kendine bağlayarak zincir kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller.
4. Onarıcı (repair) etki:  
Enzimler: Mitokondrial sitokrom oksidaz, SOD, CAT, GPX, GOT, hidroperoksidazlar.

Enzim olmayanlar: Lipid, a-tokoferol, b-karoten <sup>65,69</sup>.

**Antioksidanların Sınıflandırılması:**

Antioksidan sistem; enzimler, suda çözünen radikal tutucuları, yağda çözünen radikal tutucuları ve metal iyonlarını bağlayan proteinler olarak gruplandırılır (Tablo 2).

Antioksidanların sınıflandırılması, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirdiği <sup>65</sup> gibi enzim ve enzim olmayan antioksidanlar şeklinde de sınıflandırmaları vardır.

Antioksidan sistem; radikal oluşumunu engeller, oksidatif hasarı onararak hasara uğramış molekülleri temizleyerek mutasyonları önler <sup>69</sup>.

**Tablo 2. Organizmada antioksidan sistem elemanları <sup>69</sup>.**

Enzimler	Süperoksit dismutaz
	Katalaz
	Glutasyon peroksidaz
	Glutasyon redüktaz
Suda çözünen Radikal tutucuları	Glutasyon transferaz
	Glutasyon
	Vitamin C
	Ürik asit
Yağda çözünen radikal tutucuları	Glukoz
	Sistein
	Vitamin E
	β-Karoten
	Bilirubin
Metal iyonlarını bağlayan proteinler	Ubikinol
	Flavonoidler
	Ferritin
	Transferrin
	Haptoglobin
Seruloplazmin	
Albumin	

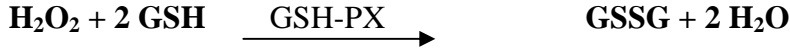
### **2.8.1. Endojen (Doğal) Antioksidanlar**

#### **A) Primer Antioksidanlar (Enzimler)**

##### **Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX= EC.1.11.1.9)**

Hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizler. Tetramerik dört Se atomu ihtiva eder. Sitolik bir enzimdir. GSH-PX, hem ve diğer prostetik grupları içermez.

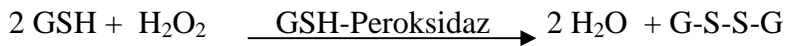
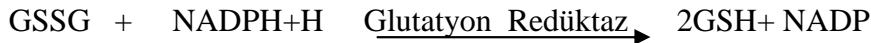
Aşağıdaki reaksiyonları katalizler:



Memelilerde saptanan ve aynı fonksiyonu gören ikinci bir selenoenzim de, “Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz” (PLGSH-PX) ‘dır. Monomerik solubl yapıda ve aktif bölgesinde bir selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran yapısındaki fosfolipid hidroperoksitlerini (PLOOH), alkollere indirger. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda, membran fosfolipidlerinin peroksidasyona karşı en önemli koruyucusu, PLGSH –Px ‘dir.

GSH-Px ‘in aktif formu olan selenat hali (E-Se<sup>-</sup>), substratı olan peroksiti alkole indirgerken kendisi oksitlenerek selenik asite dönüşür (E-Se-OH). Glutatyon bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfit’i (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutatyonun selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönerken, glutatyon okside hale dönüşür

Okside Glutatyonun (GS-SG), tekrar kullanılması için NADPH ile redüksiyonu ile Glutatyon Reduktaz aracılığıyla, tekrar GSH ‘a dönüşür.



GSHPx, solunum patlaması sırasında fagositik hücre hasarını önler. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ‘nin arttığı durumlarda GSHPx en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksit salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px deki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. GSH-PX hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ‘yi hem de organik hidroperoksitleri (kümen hidroperoksit gibi) sustrat olarak kullanabilir<sup>39,70,71</sup>.

### Glutasyon-S-Transferaz (GST-EC 2.5.1.18):

Glutasyon; glutamik asit, glisin ve sisteinden oluşan bir tripeptiddir. Glutasyon, GSH olarak kısaltılır. SH, sistenin sülfidril grubudur ve molekülün alışveriş yapan bölümüdür. Glutasyon ve ksenobiyotiklerin reaksiyonunu gerçekleştiren enzimlere “glutasyon- S- transferazlar” kısaca “GST” denir.

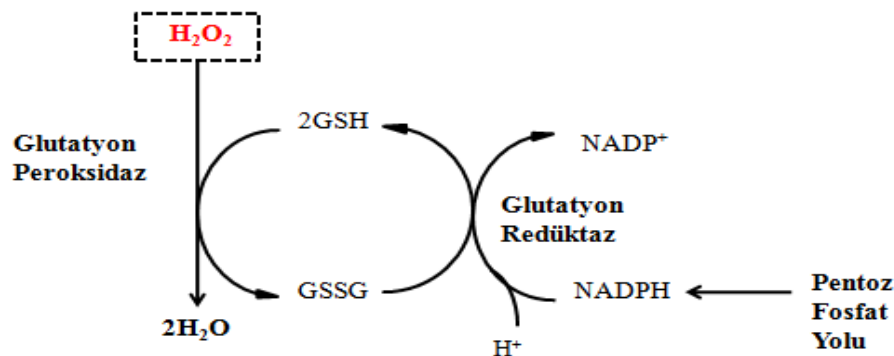
Ksenobiyotik metabolizmasında glutasyonun rolü, faz I enzimlerince oluşturulan reaktif ürünler glutasyon ile konjugasyona girer. Bunun sonucunda reaktif ürünler hücre makromoleküllerine (DNA, RNA, protein) bağlanamaz ve hücre hasarı oluşmaz <sup>72</sup>.



### Glutasyon Redüktaz (GRx-EC 1.6.4.2):

Glutasyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir. NADPH’tan bir elektronun GSSG’nin disülfid bağlarına aktarılmasında rol oynar. NADPH serbest radikal hasarına karşı koruyucu olduğu için önemlidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur <sup>73</sup>.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indirgenmesiyle GSH oksitlenir. Glutasyon peroksidazın fonksiyonu için okside glutasyon tekrar indirgenir. Reaksiyon GSH redüktaz tarafından katalizlenir. Enzim NADPH bağımlı bir flavoproteindir <sup>65</sup>. Glutasyon redoks döngüsü Şekil 1’ de gösterilmiştir.

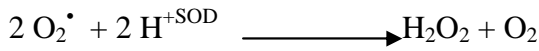


Şekil 3. A: Glutasyon redoks döngüsü <sup>74</sup>.

### **Süperoksit Dismutaz(SOD-EC 1.15.1.1):**

İnsanlarda iki adet süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimi bulunur. Bunlardan biri bakır ve çinko içerir ve sitozolde bulunur. Diğeri ise mangan içerir ve mitokondride bulunur (75,76).

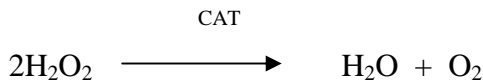
SOD enzimi, substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir. Süperoksit radikalinin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar<sup>77,78</sup>.



### **Katalaz (CAT-EC 1.11.1.6):**

Katalaz enzimi (CAT) memeli eritrositlerinde çok miktarda bulunur. CAT, tetramerik yapıya sahiptir. Molekül ağırlığı 240.000' dir. Aktif merkezinde 4 tane "ferrihem" bulunduran bir hemoproteindir<sup>79,80</sup>. CAT somatik bir oksidan koruyucusudur. CAT' in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ye affinitesi GPx e göre daha çöktür. Katalaz eritrosit içerisinde sayıca çok fazla bulunur.

Katalaz; hidrojen peroksidi, su ve oksijene parçalar<sup>80</sup>.



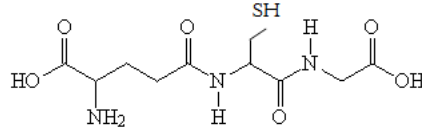
### **2.8.2. Sekonder Antioksidanlar (Enzim Olmayanlar)**

Lipit fazda bulunanlar antioksidanlar  $\alpha$  (-) tokoferol (E - vitamini) ve  $\alpha$  - karoten'dir. Sıvı fazda (hücre sitozölü veya kan plazmasında) bulunanlar ise askorbik asit, miyoglobulin, melatonin, hemoglobin, üre, ferritin, sistein, metionin, seruloplazmin, albümin, laktoferrin, bilirubin ve glutatyondur.

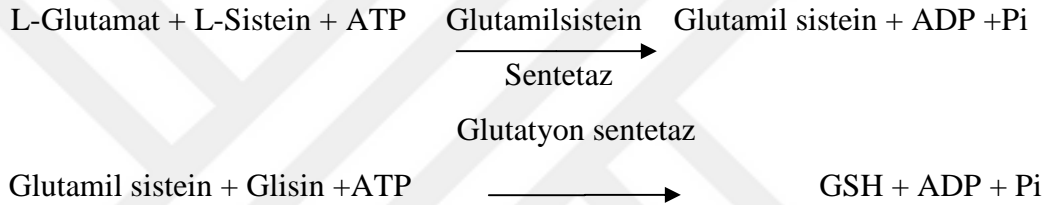
### **Glutasyon (GSH):**

Glutasyon (GSH) karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptittir. Glutasyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (65). Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları

oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Glutatyon (GSH) yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar.(61) Glutatyon (GSH) eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir <sup>69,81,82,83</sup>.



Şekil 4. B: GSH'nin moleküler yapısı <sup>84</sup>.



### 2.8.3. Diğer Sekonder Antioksidanlar

İnsan vücudunda çok az miktarlarda bulunmasına karşın vitaminlerin vücuttaki etkinlikleri oldukça fazladır. Bunların bir kısmı, biyokimyasal olayların düzenlenmesine yardımcı olurlar. A, E ve C vücut hücrelerinin hasarını önleyerek normal işlevlerini sürdürmeleri ve bazı zararlı maddelerin etkilerinin azaltılmasında yardımcı olurlar. Mesela,β-Karoten organizmada A vitamininin öncülü olmasının yanı sıra bir antioksidan olarak görev yapmaktadır. Hücrelerin dışında β-Karotenbu görevi üstlenirken; hücre içinde ise savunmayı eser elementlerden selenyumun da yardımıyla E vitaminini üstlenmektedir. E vitamini yağda çözünen bir vitamin olup temel görevi lipitleri oksidatif hasardan korumaktır <sup>85</sup>.

### 2.8.4. Ekzojen Antioksidanlar

Ksantin oksidaz inhibitörlerinden Tungsten, allopürinol, oksipürnol, folik asit ve pterin aldehit; soya fasulyesi inhibitörleri; NADPH oksidaz inhibitörlerinden kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar, cetiedil ve difenilin iyodonyum ; recombinant süperoksit dismutaz; E vitamini analogu olan Troloks-c; endojen



antioksidan aktiviteyi artıran maddelerden Ebselen ve asetil sisteindir; Mannitol ve albümin gibi diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları; Desferroksamin ve seruloplazmin gibi demir redoks döngüsünün inhibitörleri; nötrofil adezyon inhibitörleri; Tümör Nekroz Faktör (TNF) - Interlökin - 1 gibi sitokinler; barbitüratlar ; demir şelatörler <sup>86</sup>.

## **2.9. Kullanılan Parametreler İle İlgili Genel Bilgiler**

### **2.9.1. Ksantin Oksidaz (XO)**

Canlı sistemlerde ROS oluşturan başlıca enzimatik kaynaklardan birisi olan XOD, pürin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside okside ederken NAD<sup>+</sup>'ye elektron transferini gerçekleştiren bir dehidrogenaz enzimidir. Bunun yanı sıra dokuda belli stres koşulları altında tiyol gruplarını okside ederek proteolizise neden olan bir oksidaz enzimine dönüşür. XOD'ın reaksiyonları sonucunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri oluşmaktadır. Ksantin oksidazın beyinde ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi oksidatif hasarlara neden olduğu bilinmekle beraber hepatit ve beyin tümörü vakalarında da XOD'ın serum düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir. <sup>87,88</sup>.

### **2.9.2. Sitokinler**

Sitokinler hücre matürasyonu, diferansiasyonu, inflamasyon, immünite ve doku tamirinde rol oynayan; düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir, spesifik hücre 23 reseptörüne bağlanarak otokrin ve parakrin etki gösterirler. Bu nedenle sitokinler plazmada çok az miktarlardadır. Lenfosit, granülosit, monosit ve mast hücresi gibi inflamatuvar hücreler olabileceği gibi, epitel, fibroblast ve endotel gibi doku hücreleri de olabilir. Fonksiyonlarına göre interlökinler (IL), koloni stimüle edici faktörler (CSF), interferonlar (IFN), tümör nekroze edici faktörler (TNF), büyüme faktörleri (GF) ve kemokinler olarak alt gruplara ayrılırlar <sup>89,90</sup>.

#### **2.9.2.1. Tümör Nekrozis Faktör ( TNF)**

TNF antitümoral aktivitesi ile tanımlanan yangı ve hücrel immün yanıtın aracısındır. TNF-  $\alpha$  ve TNF-  $\beta$  olmak üzere iki farklı TNF molekülü vardır ki; TNF  $\alpha$

sadece % 30 oranında TNF- $\beta$  ile homologdur. İkisi de aynı reseptörlere ve benzer aktiviteye sahiptir. Lipopolisakkaritler (LPS) tarafından sitümüle edilen makrofajlar TNF'nin temel kaynağıdır. IFN- $\gamma$ ; LPS tarafından indüklenen TNF salınımını yapma gücüne sahiptir. TNF kendi sentezini indükler ve salınımını monositler aracılığıyla yapar. IL-1, IL-2 GM-CSF, CSF-1 monositlerden TNF salınımını indükler<sup>26</sup>.

TNF- $\alpha$  aktive edilmiş monosit/makrofajlar ve daha az olarak da aktif T hücreleri (Th1 hücreleri), B hücreleri, naturel killer hücreleri, mast hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, mikrogliya hücreleri, astrositler, Kupffer hücreleri, düz kas hücreleri, sinovial boşluk hücreleri ve bazofiller gibi birçok hücre tarafından üretilir<sup>19</sup>.

TNF- $\alpha$  önceleri; kaşektin, sitotoksin, sitotoksik faktör, değiştirici-indükleyici faktör, hemorajik faktör, makrofaj sitotoksik faktör, makrofaj sitotoksin, ve nekrozin olarak biliniyordu. TNF- $\beta$  ise sitotoksin, değiştirici-indükleyici faktör, lenfotoksin olarak biliniyordu. Genellikle TNF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ 'dan daha az sentezlenir. TNF- $\beta$ 'nın dolaşımdaki tesbiti kolay değildir ve lokal olarak sentezlenen bir parakirin faktör olarak düşünülür, yani sistemik hasarın bir göstergesi olamaz.

TNF- $\alpha$ , bakteri (endotoksin, LPS), viruslar, protozoonlar, sitokinler (IL-1, IL-2 GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  kendi kendine), immün kompleksler, komplement komponenti C5a, nöropeptid substans P, ve reaktif oksijen türleri aracılığıyla sentezlenir. TNF- $\alpha$ 'nın üretimi; NO, reaktif oksijen türleri, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve hipokside artar<sup>19</sup>.

TNF reseptörleri birçok hücre tipinde bulunduğundan, TNF'nin çok geniş bir oranda hücre ve organ sistemleri üzerinde etkinliği vardır<sup>33</sup>. TNF'nin temel fonksiyonu monosit ve makrofajların farklılaşması ve aktivasyonudur. TNF, parazit ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik makrofajların aktivasyonu için IFN- $\gamma$  ile sinerjist olarak çalışır<sup>26</sup>.

IL-1, IL-2 veya IL-7, TNF gibi diğer sitokinlerin varlığı timosit proliferasyonunu artırır (34). TNF, stimüle olmuş T hücrelerinden, yüksek affiniteli IL-2R salınımı yoluyla IL-2 yanıtını, IL-2 ve IFN- $\gamma$  üretimini artırır (35). TNF, GM-CSF, G-CSF, IL-1 ve IL-6 gibi bazı diğer sitokinlerin de salınımını endotel hücreleri aracılığıyla indükler. TNF endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin salınımını artırarak lökosit miktarını artırır<sup>26</sup>.

TNF, yangı, vasküler permeabilite ve şok gibi birçok patolojik durumda yüksek düzeylerde bulunur. TNF, in vivo olarak tümör hücrelerinde hemorajik nekroz oluşturur. Bu etki tümör hücrelerinde ve antitümör yanıtın immün etkilerinde direkt ve indirekt olarak etki yapar.

### **2.9.2.2. Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF- $\beta_1$ )**

Doku homeostazisi, hücre büyümesi ve çoğalmasının yanı sıra hücreler arasımatrikslerin üretim ve döngüsünün regulasyonu ile sürdürülür. Hücreler sitokinler aracılığı ile kendilerini ve hücreleri uyararak bu düzenlemeyi sağlarlar. Sitokinler, dokuların yeniden yapılanmasını planlanmış veya planlanmamış şekilde her yönden düzenlerler<sup>48</sup>. TGF- $\beta$  prototipik, çok işlevli bir sitokin olup, trombositlerden izole edilmiştir. Memelilerde bu sitokin biyolojik özellikleri hemen hemen benzer olan 3 izoform halinde bulunur. TGF- $\beta_1$  geni doku hasarına yanıtta yüksek seviyede ayarlanır. TGF- $\beta_1$ , 391 aminoasitli bir öncül molekül olarak sentezlenir, proteoliz ile peptid parçalarını ve 112 aminoasitli bir subüniti oluşturur. TGF- $\beta_1$  hücreler arası matrikslerin depolanmasını artırmada en fazla etkiye sahip olup, diğer sitokinlerin; PDGF, FGF, tumor necrosis factor (TNF) ve interleukin (IL) etkilerini düzenlemek ve baskılamak suretiyle kuvvetli bir düzenleyici olarak etki eder<sup>91</sup>.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmamızda, Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TIBDAM) alınan 250-300 gram ağırlığında 56 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar metabolik kafesler içerisinde oda sıcaklığı  $24\pm 2$  °C arasında olan ortamda barındırıldı. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsüne uyuldu. Her grupta istatistiksel anlamlılığın sağlanması amacıyla her grupta 7 rat olacak şekilde tasarlandı. Çalışma TIBDAM etik kurulundan alınan izin çerçevesinde uygulandı.

#### 3.2. Deney Protokolü

Her grupta 7-8 sıçan olmak üzere toplam 8 grup oluşturuldu. 7 gün süresince hayvanların aldığı su ve çıkardığı idrar takipleri yapıldı.

- 1. Kontrol Grubu (n=7):** Metabolik kafesler içerisinde normal besin ve çeşme suyuyla beslenen hayvanların 7 gün boyunca idrar takipleri yapıldı.
- 2. Gentamisin Grubu (n=7):** 7 gün boyunca hayvanlara ip yolla gentamisin (100mg/kg) injeksiyonu uygulandı.
- 3. D- arginin Grubu (n=7):** 7 gün boyunca hayvanların içme sularına D-arginin (3 g/l) eklendi.
- 4. L-arginin Grubu (n=7):** 7 gün boyunca hayvanların içme sularına L-arginin (2 g/l) ilave edildi.
- 5. L-NAME Grubu (n=7):** 7 gün boyunca hayvanların içme sularına L-NAME (100 mg/l) eklendi.
- 6. L-NAME+Gentamisin Grubu (n=7):** Gentamisin injeksiyonu ile birlikte sıçanların içme sularına L-NAME (100 mg/l) eklendi.
- 7. L-arginin+Gentamisin Grubu (n=7):** Gentamisin injeksiyonu ile birlikte sıçanların içme sularına L-arginin (2 g/l) ilave edildi.
- 8. D-arginin+Gentamisin Grubu (n=7):** Gentamisin injeksiyonu ile birlikte sıçanların içme sularına D-arginin (3 g/l) eklendi.

### **Kan ve Böbrek Dokularının Elde Edilmesi ve Analizlere Hazırlanması**

Hayvanların, gentamisin injeksiyonu sonrası 8.günde son injeksiyondan 24 saat sonra ketamin (40 mg/kg) ile anestezi sağlanıp intrakardiyak kanları alınıp hayvanlar dekapite edildi. Abdominal bölgenin aseptik koşulları sağlandıktan sonra karın orta çizgisinden yapılan insizyonla sol böbrek histopatolojik değerlendirme amacıyla çıkarıldı.

#### **3.2.1. Biyokimyasal Analiz**

Deney hayvanlarından alınan kan örneklerinde; BUN, serum kreatinin düzeyleri, TAS, TOS, OSİ, GSH, NO, MDA, XO ve TGF $\beta_1$ , TNF $\alpha$  Analizleri İnönü Üniversitesi Merkez Laboratuvarı tarafından değerlendirildi.

#### **3.2.2. Böbrek Histopatolojisi**

Böbrekler %10' luk formalin solüsyonu içerisinde fixe edildikten sonra parafinlendi ve 3-5  $\mu\text{m}$ 'lik kesitler elde edilip hematoxilen-eozin ile boyandı. Tübüler nekroz, dejeneratif değişimler ve tübüler rejenerasyon ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

#### **3.2.3. Doku Homojenizasyonu ve Tamponları**

Derin dondurucudan çıkartılan dokuların aktive kaybını en aza indirmek amacıyla homojenizasyon işlemi boyunca buz üzerinde çalışıldı. Alınan dokular yaklaşık 200 mg ağırlığında küçük parçalara ayrıldı. Tartılan dokular, içi buz dolu taşıma kaplarına yerleştirilmiş ve numaralandırılmış cam tüplere bırakıldı. Doku bırakılan tüplerin her birine sırayla 1ml Tris-HCl tamponu eklenerek homojenizatörle 16000 devir/dakika hızda 2 dakika homojenize edildi. Sonra 1ml daha Tris-HCl tamponu eklendi 1 dakika daha homojenize edildi. Bu işlem her bir tüp için ayrı ayrı uygulandı. Homojenizasyon işlemi bittikten sonra bütün tüpler 4000 rpm de +4°C 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan süpernatantlar eppendorf tüplerine porsiyonlanarak biyokimyasal parametrelerin ölçümü için kullanıldı.

### **Tris-HCl Tamponu:**

**0,2 M Tris (A):** 24,23 g Tris alınıp bir miktar distile su içerisinde çözüldükten sonra toplam hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

**0,1 N HCl (B):** 8,3 ml HCl alınıp içerisinde bir miktar distile su bulunan balon joje içerisine eklendi. HCl eklenmesi esnasında balonjoje musluk suyu altında soğutuldu. Daha sonra son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

Doku örnekleri uygun oranlarda karıştırılarak elde edilen 50Mm Tris-HCl (Ph:7.4) tamponda buz içerisinde, soğukta 16.000 devir/ dakika hızda 3 dakika homojenize edilmiştir. Homejenatların geri kalan kısmı, soğutmalı santrifüjde +4°C' de 15 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek elde edilerek süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar eppendorf tüplerine porsiyonlanarak -80C° derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### **3.3. Serum ve Böbrek Doku Homojenatında TAS, TOS, OSİ, GSH, NO, MDA, XO ve TGF $\beta$ <sub>1</sub>, TNF $\alpha$ Analizleri**

#### **3.3.1. Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidan Status (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)**

Canlılar, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stres ile mücadele eden savunma sistemine sahiptirler. Kan, antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını sağlar. Total oksidan kapasiteye en büyük etkiyi vücutta sentezlenen serbest oksijen moleküllerinin yan ürünleri sağlamaktadır. Vücutta her daim normal veya patolojik olarak serbest radikaller sentez edilmektedir. Oluşan ürünler sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmedikleri takdirde zararlı etkiye sebep olurlar.

Total antioksidan kapasiteye en büyük katkıyı plazmadaki antioksidan moleküller sağlar. Plazmada antioksidanlar birbirleri ile etkileşim içindedirler. Genelde bu maddeler sinerjik etki gösterirler. Bu sinerjiye glutatyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesi örnek verilebilir. Bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile dengelenmektedir.

Vücuttaki oksidatif stresi ve antioksidan kapasiteyi belirlemek için total ölçüm sağlayan yöntemler vardır. Total oksidan status (TOS) düzeyinin, total antioksidan

status (TAS) düzeyine oranlanmasıyla oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplanmaktadır. OSİ vücudun oksidan antioksidan dengesinin yönünü belirtmede kullanılır<sup>92</sup>.

Total Oksidan Status (TOS), Total Antioksidan Status (TAS) düzeyleri Synergy HT, Biotek otoanalizöründe çalışıldı. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ); TAS ve TOS sonuçları kullanılarak hesaplandı. Erel'in metoduna göre çalışıldı<sup>93</sup>. TAS düzeyi, REL ASSAY marka ticari kit kullanılarak ölçüldü.

### 3.3.2. Total Antioksidan Status (TAS) Ölçümün Prensibi

Örnek içinde bulunan oksidanlar ferröz iyon şelatör komplekslerini ferrik iyonlara çevirir. Oluşan ferik iyonlar kromojen solusyonu ile renkli bir kompleks oluşturur ve oluşan bu kompleks örneklerdeki oksidan miktarıyla doğru orantılı olarak 530 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Ölçüm standardı olarak üretilmiş kittede mevcut olan 20 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./L solusyonu kullanıldı.

Sonuçlar µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./L olarak ifade edildi.

#### Reaktifler:

**Ayıraç 1**(Tampon solüsyonu) : 50 ml

**Ayıraç 2** ( Substrat solüsyonu ) : 10 ml

**Standart** (Stabilize Standart Solüsyon) : 5 ml. 20 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./L

#### Ölçümün Yapılışı:

1. 250 µl Ayıraç 1 bütün kuyucuklara eklendi. Standart kuyucuğuna 37 µl standart, numune kuyucuklarına 37 µl numune eklendi. 530 nm' de ilk okuma yapıldı.

2. Bütün kuyucuklara 12 µl Ayıraç 2 eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk. çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 530 nm' de ikinci okuma yapıldı ve sonuçlar hesaplandı.

#### Sonuçların hesaplanması:

Sonuç= (ΔAbs numune / ΔAbs standart 2) X Standart 2'nin Konsatrasyonu (20 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Equiv./L)

ΔNumune absorbans: (Numunenin 2. absorbansı- Numunenin 1. absorbansı)

$\Delta$ Standart 2 absorbans: (Standart 2' nin 2. absorbansı - Standart 2' nin 1. absorbansı)

Standart 2 değeri: 20  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./L

### 3.3.3. Total Oksidan Status (TOS) Ölçümün prensibi

Örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın dekolorize olması esasına dayanır (94). Bu dekolorizasyon örnekteki antioksidan moleküllerin konsantrasyonları ile doğru orantılıdır.

Standart olarak kit içerisinde bulunan ve E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı.

Sonuçlar, mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi.

#### Reaktifler:

<b>Ayraç 1</b> (Buffer Solüsyonu)	1× 50 ml
<b>Ayraç 2</b> (ABTS Radikal Solüsyonu)	1× 10 ml
<b>Standart 1</b> (Blank )	Kitte mevcut değildir. Deiyonize su

kullanılır.

**Standart 2** (1,0 mmol Trolox E Equiv./L) Solüsyon 1× 5 ml

#### Ölçümün Yapılışı:

1. 250  $\mu$ l Ayraç 1 bütün kuyucuklara eklendi. Standart kuyucuğuna 15  $\mu$ l standart, numune kuyucuklarına 15  $\mu$ l numune eklendi. 660 nm' de ilk okuma yapıldı.

2. Bütün kuyucuklara 37  $\mu$ l Ayraç 2 eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk. çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 660 nm' de ikinci okuma yapıldı ve sonuçlar hesaplandı.

#### Sonuçların hesaplanması:

$$\text{Sonuç} = [ (\Delta\text{Abs Std1}) - \Delta\text{Abs Numune} ] / [ (\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2}) ]$$

$\Delta$  Absorbans Standart 1: (Std 1' in ikinci absorbansı - Std 1' in birinci absorbansı)



$\Delta$  Absorbans Standart 2: (Std 2' nin ikinci absorbansı - Std 2' nin birinci absorbansı)

$\Delta$  Numune Absorbans = (Numunenin ikinci absorbansı - Numunenin birinci absorbansı)

### 3.3.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total Oksidan Seviye (TOS) / Total Antioksidan Seviye (TAS) bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı<sup>95</sup>. OSİ birimi, AU (Arbitrary Unit) olarak ifade edildi.

Oksidatif stres indeksini (OSİ) hesaplamak için:

$OSİ = TOS / (TAS \times 100)$  formülü kullanıldı.

### 3.3.5. Glutayon (GSH) Analizi

Çalışmada glutayon tayini Fairbanks ve Klee'nin geliştirdiği yönteme göre yapıldı<sup>80</sup>. Yöntem kısaca numuneler içerisindeki glutatyonda bulunan sülfidril gruplarının elman ayırıcı ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli ürünün absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır.

#### a. Kullanılan Reaktifler:

**Triklorasetik asit ( $Cl_3CCOOH$ ) (% 10'luk):** 27.25g TCA tartılarak 250 ml distile su içerisinde çözüldü.

**Sodyum Hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4$ ) Çözeltisi (0.3M):** 21.8g  $Na_2HPO_4$  tartılıp 200 ml distile suda çözüldü.

**Trisodyum Sitrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) Çözeltisi (% 1):** 300 mg sodyum sitrat alınıp 30 ml distile suda çözüldü.

**DTNB Reagent( $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ ) Çözeltisi:** 12 mg DTNB reagent tartılıp hazırlanan trisodyum sitrat çözeltisi içinde çözüldü.

#### *Standartlar*

**1000  $\mu$ mol GSH stok Çözeltisi:** 31 mg GSH 100 ml distile suda çözüldü.

Standart ölçümü için 1000  $\mu\text{mol}$  stok standart solüsyonundan sırasıyla 500; 100; 50; 25;  $\mu\text{mol/L}$ 'lik seri dilüsyonlar hazırlandı. Numunelere uygulanan işlemlerin aynı standartlara da uygulandı.

### **b. Deneyin Yapılışı**

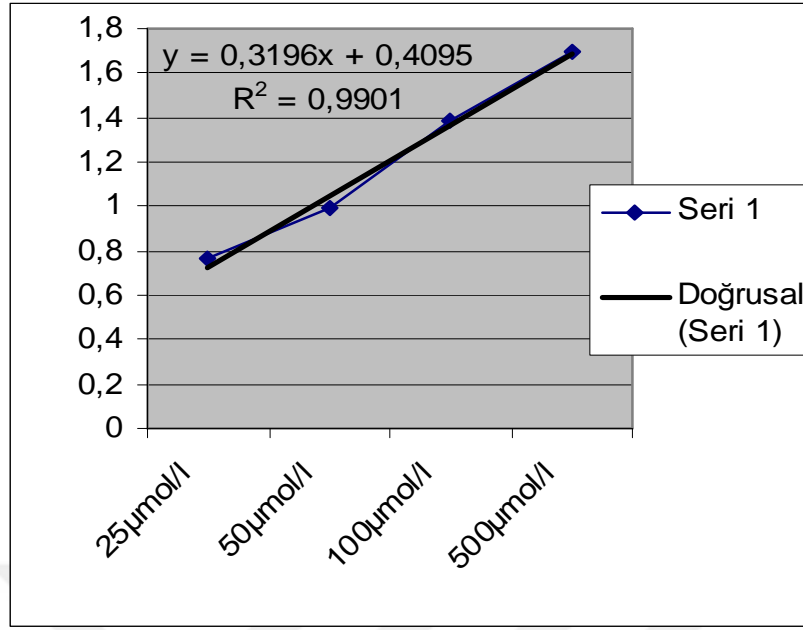
0.5 ml numune üzerine 0.9 ml TCA çözeltisi ilave edildikten sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerin altındaki pellet hareket ettirilmeden süpernatantlar yeni tüplere alındı. Bu aşamadan sonraki deney protokolü Tablo 3.2' de verilmiştir.

**Tablo 3. Glutatyon deney protokolü**

	KÖR	STD	Numune
Distile su	0.5 ml	-	-
Numune (Süpernatant)	-	-	0.5 ml
Standart	-	0.5 ml	-
0,3M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4 ml	4 ml	4 ml
DTNB reagent	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları kapatılıp 10 dk karanlıkta bekletildikten sonra spektrofotometrede 410 nm'de köre karşı okuması yapıldı.

**c. GSH Aktivitesinin Hesaplanması:** Numune absorbanları standart grafiğinden elde faktörle de çarpılarak GSH aktivitesi  $\mu\text{mol/l}$  olarak hesaplandı.



Şekil 5. GSH Standart grafiği

### 3.3.6. Nitril oksit (NO) Analizi

Nitrik oksid sentaz enzimleri tarafından sentezlenen NO, aerobik sulu ortamda kendiliğinden hızla oksitlenerek nitrat oluşturur. Nitrik oksid (NO), üretildikten sonra, 2-30 sn gibi çok kısa serede nitrit (NO<sub>2</sub>) ve daha sonra da nitrata (NO<sub>3</sub>) oksitlenir. Nitrat formu, nitrik oksid türevlerinin en kararlı yapısıdır. Nitrik oksid stabil yapıda olmaması nedeniyle direkt ölçmek çok zordur. Bu nedenle nitrati kadmiyum ile nitrite indirgemek suretiyle nitrit miktarı esas alınarak NOS aktivitesi ölçülmüştür. Ortamdaki NOS aktivitesi ile oluşan NO, nitrit üzerinden Griess reaktifi ile tepkimeye girdiğinde oluşan renkli bileşik spektrofotometrede 545 nm’de ölçülmüştür. Cortas ve Wakid yöntemi ile bakılmıştır<sup>96</sup>.

#### a. Kullanılan Reaktifler

**1. Kadmiyum Granülleri:** 0,1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde 9 ay stabil saklanabilir.

**2. Glisin-NaOH buffer:** 15 gr glisin bir miktar distile suda çözüldükten sonra pH’ı 2mol/L NaOH çözeltisi ile 9,7’ye ayarlanmıştır. Son hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Bu çözelti 1 ay 0-8 °C’de stabildir.

**3. Sülfanilamid:** 5 gr sülfanilamid 3 mol/L HCl asit içinde çözülmüştür. 1 yıl oda sıcaklığında stabildir.

**4. N-Naphthylethylene diamine(NNDA):** 50 mg NNDA 250 ml distile suda çözülmüştür. Bu çözelti 2 ay 0-8 °C'de stabildir.

**5. Çinko Sülfat (ZnSO<sub>4</sub>):** 75mmol/L; 10,8 mg alınıp 500 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

**6. Bakır Sülfat (CuSO<sub>4</sub>):** 5mmol/L; 250 mg alınıp 200 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

**7. Sodyum Hidroksit (NaOH):** 55mmol/L; 1,1 gr alınıp 500 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

**Standartlar:**

**NaNO<sub>3</sub> standartı:** 85 mg sodyum nitrat tartılıp 10mmol/L sodyum tetra borat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O ) içerisinde çözülmüştür.

**b. Deneyin Yapılışı**

Nitrik oksid deney protokolü Tablo 4 de verilmiştir.

**Deproteinizasyon**

**Tablo 4. Deproteinizasyon işleminin uygulanma prosedürü**

	<b>Numune</b>	<b>Kör</b>
Numune (Plazma)	0.5 ml	-
Distile Su	-	0.5 ml
Çinko Sülfat	2.0 ml	2.0 ml
Sodyum Hidroksit	2.5 ml	2.5 ml

Oda ısısında 10 dakika bekletildikten sonra 4000 x g 'de 20 dk santrifüj edilmiştir.

### ***Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu***

Granüller 3 defa distile su ile yıkanmıştır. 1-2 dakika  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi içinde bekletildikten sonra vortekslenmiş ve 3 defa da Glisin-NaOH buffer ile yıkanmıştır. 10 dakika içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı yardımıyla kurutulmuştur.

### **c. Nitrit Ölçümü**

**Tablo 5. Nitrit ölçüm prosedürü**

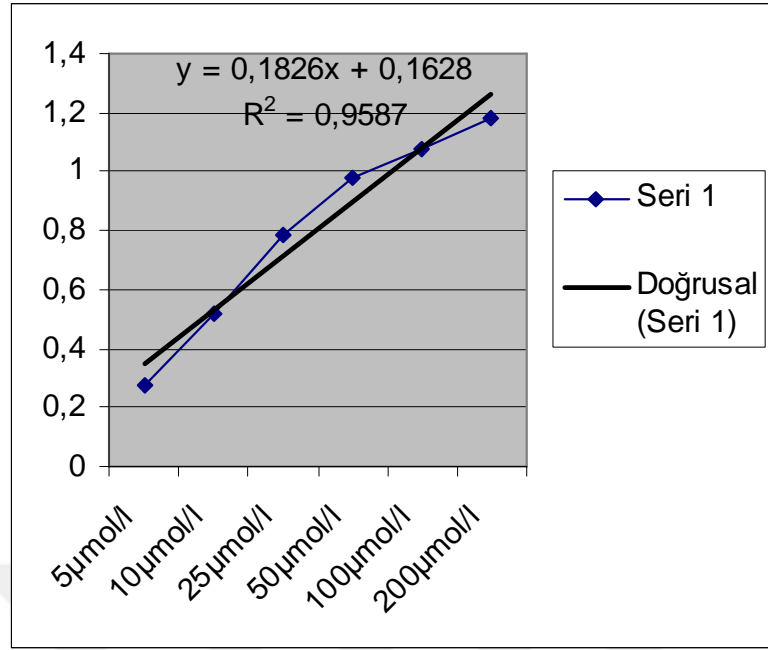
	<b>Numune</b>	<b>Standart</b>	
Glisin-NaOH buffer	1.0 ml	1.0 ml	
Deproteinize sample	1.0 ml	-	
Standart dilusyonu			
2.5-3 gr Cd granülleri (indirgenmiş)	-	1.0 ml	
90 dakika oda ısısında inkübasyon			
	<b>Numune</b>	<b>Standart</b>	<b>Kör</b>
Distile Su	-	-	1.0 ml
Numune (indirgenmiş)	1.0 ml	-	-
Standart	-	1.0 ml	-
Sülfanilamid	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
N-Naphthylethylene diamine	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

### **d. Standart Ölçümü**

Standart ölçümü için 10 mmol/L  $\text{NaNO}_3$  stok çözeltisinden 5; 10; 25; 50; 100; 200  $\mu\text{mol/L}$ 'lik seri dilusyonlar hazırlanmıştır. Numunelere uygulanan işlemlerin aynısı standartlara da uygulanmıştır.

### **e. Nitrat Aktivitesinin Hesaplanması**

545 nm'de okunan numune absorbanları sulandırma faktörü olan 10 ile çarpılıp, elde edilen değer nitrat standard eğrisinden elde edilen faktörle çarpılıp sonuç  $\mu\text{mol/L}$  olarak hesaplanmıştır.



Şekil 6. NO Standart grafiği

### 3.3.7. Malondialdehit (MDA) Analizi

Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA'in ölçümü Uchiyama ve Mihara yöntemi<sup>97</sup> ile bakılmıştır. Yöntem kısaca numuneler içerisindeki MDA'nın TBA ile 95°C'deki reaksiyonu sonucu oluşan pembe-kırmızı rengin absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan rengin şiddeti ortamdaki MDA miktarı ile orantılı olarak artmaktadır. Ortamdaki n – butanole ekstrakt oluşturularak geçen serum MDA düzeyi spektrometrede 532 nm'de ölçülmüştür.

#### a. Kullanılan Reaktifler:

**29mmol/L TBA çözeltisi:** 418 mg TBA 75mmol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O çözeltisinde (1,170 gr tartılıp distile su ile 80 ml'ye tamamlanmıştır.) pH'ı 0,1N HCl ile 2,8'e ayarlanmış ve hacmi daha sonra 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**% 1,5 KCl çözeltisi:** 1,5gr KCl tartılıp 100ml distile suda çözülmüştür.

**% 1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi:** 11,8 ml %85'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>'den alınıp 1000ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

### **Standartlar :**

20 mmol/L stok standart solüsyonu hazırlamak üzere 329 µl 1, 1, 3, 3 tetrametoksipropane etanolle 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti + 4 °C'de 1 ay stabildir.

Standart ölçümü için 20 mmol/L stok standart solüsyonundan sırasıyla 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5 µmol/L'lik seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Numunelere uygulanan işlemlerin aynısı standartlara da uygulanmıştır.

### **b. Deneyin Yapılışı**

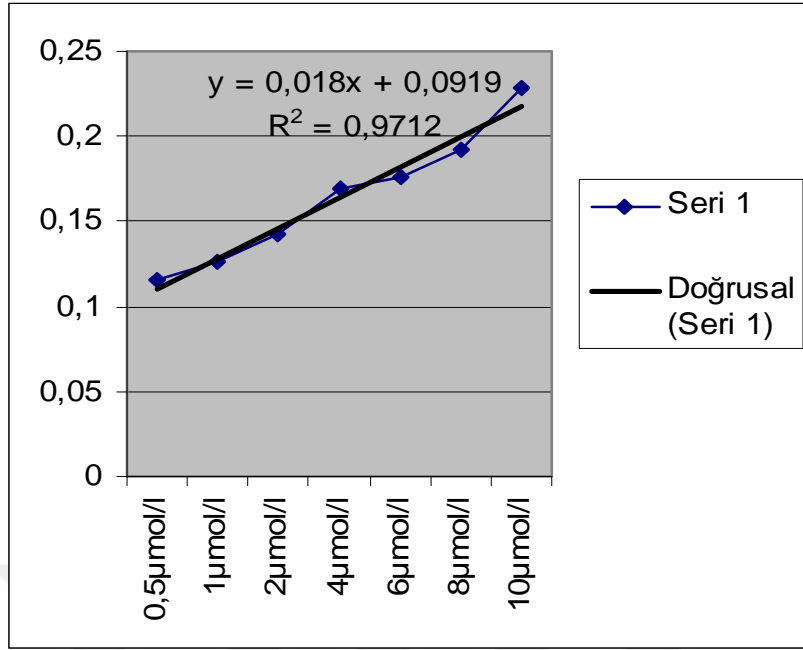
Malondialdehit deney protokolü Tablo 6 da verilmiştir.

**Tablo 6. Malondialdehit deney protokolü**

	<b>Numune</b>	<b>Standart</b>	<b>Kör</b>
Distile Su	-	-	500 µl
Numune(Plazma)	250 µl	-	-
Standart	-	500 µl	-
KCl	250 µl	-	-
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml
TBA solüsyonu	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Deney tüpleri 5 sn vortekslenmiştir. 100°C'de su banyosunda 45 dk inkübasyondan sonra buz banyosunda soğutulmuştur. Numunelerin her birine 4 ml n-bütanol ilave edildikten sonra en yüksek devirde yaklaşık 5 dk vorteks yapılmış daha sonra tüpler 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek üstte oluşan faz spektrofotometrede 532 nm'de okunmuştur.

**c. Malondialdehit (MDA) Aktivitesinin Hesaplanması:** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışılmış ve standart grafiği çizilmiştir. Numune absorbansları sulandırma faktörü olan 10 ile çarpıldıktan sonra standart grafiğinden elde faktörle de çarpılarak MDA miktarı nmol/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 7. MDA standart grafiği

### 3.3.8. Ksantin Oksidaz (XO) Analizi

Ksantin Oksidaz tayini numunenin ksantin içeren bir tamponla 30 dakikalık inkübasyonuyla ksantinden ürik asit oluşturulmuştur. Bu şekilde oluşturulan ürik asit miktarı %100'lük TCA eklenmesi ile reaksiyon durdurularak sabitlenmiştir. 293 nm dalga boyunda absorbens değeri ölçülmüştür. Bu değer XO aktivitesi ile doğru orantılıdır<sup>98</sup>.

Metot Numune ve diğer tüpler Çizelge 1'de belirtildiği gibi hazırlanarak işlemler sırasıyla yapılmıştır. İşlemin sonunda tüpler 6000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantların absorbensleri 293 nm dalga boyunda okunmuştur.



**Tablo 7. Ksantin oksidaz ölçümünde işlem basamakları**

	<b>Numune Körü</b>	<b>Numune</b>	<b>Standart Körü</b>	<b>Standart</b>
<b>Tampon</b> (pH7.5, 50 mM)	2.80 ml	2.80 mL	2.85 mL	2.80 mL
<b>Xanthine</b> (4 mM)	50µL	50µL	50µL	50µL
<b>Numune</b>	-	50µL	-	-
<b>Standart</b> (500 µM)	-	-	-	50µL
37 °C de 30 dakika inkübasyon				
<b>Numune</b>	50µL	-	-	-
<b>TCA (% 100)</b>	100µL	100µL	100µL	100µL

Hesaplama; 1 ünite XO, 37°C’de pH 7,5’ta 1 dakikada oluşan ürik asit olarak tarif edilmiş ve U/mL olarak hesaplanmıştır.

### **3.3.9. Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF-β<sub>1</sub>) Analizi**

TGF-β<sub>1</sub> düzeyi ticari rat ELİSA kitleri kullanılarak belirlendi (BioSource Int, Inc. California, USA, katalog ve lot no: KAC1688 ve 043503). Sonuçlar standart eğriler kullanılarak bioelisa okuyucusu Elx800 yardımıyla hesaplandı.

### **3.3.10. Tümör Nekrozis Faktör (TNF α) Analizi**

TNF-α düzeyi ticari rat ELİSA kitleri kullanılarak belirlendi (IBL Co, Ltd. Gunma, JAPAN, katalog ve lot no: 17194 ve OL-527). Sonuçlar standart eğriler kullanılarak bioelisa okuyucusu Elx800 yardımıyla hesaplandı.

### **3.4. Verilerin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi**

İstatistiki anlamda verilerin değerlendirilebilmesi için öncelikle verilerin normal dağılım gösterip göstermediği kontrol edildi ve normal dağılımın mevcut olmadığı gözlemlendi. Bu durumda kullanılacak testler non-parametrik testler olarak belirlendi.

Tüm gruplardan tek tek elde edilen verilerin aritmetik ortalaması ve Standart hataları hesaplandı ve non-paired t-testi uygulandı,  $p < 0.05$  olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### Üre (mg/dL)

Çalışma sonunda elde ettiğimiz üre ölçümlerine göre en düşük üre seviyesine sahip grup Kontrol grubu ve en yüksek üre seviyesine sahip grup ise Gentamisin grubu olarak gözlemlendi. Kontrol grubuna kıyasla D-arginin grubu hariç diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın var olduğu görüldü.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında gentamisin alan grupta üre seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Bu artış D-arginin ile değil ancak L-arginin tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde geri çevrildi (Tablo 8).

**Tablo 8. Kontrol, D-arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L- NAME+Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının üre düzeylerinin karşılaştırılması.**

	Grup	N	Mean	SEM
Üre (mg/dL)	<b>Kontrol</b>	7	11.00	0.38
	<b>D-arginin</b>	7	12.00	0.49
	<b>L-arginin</b>	7	17.86 <sup>*</sup>	0.34
	<b>Gentamisin</b>	7	35.29 <sup>*</sup>	1.50
	<b>L-NAME</b>	7	15.14	0.67
	<b>LNAME+ gentamisin</b>	7	29.50	1.33
	<b>Larginin +gentamisin</b>	7	18.57 <sup>*+</sup>	0.370
	<b>Darginin+gentamisin</b>	7	32.00 <sup>*</sup>	0.692

\* Kontrolle göre farklılığı, + Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

### Kreatin (mg/dl)

L-arginin, D-arginin ve L-NAME, kontrol kreatin seviyeleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Gentamisin uygulaması ile kreatin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi.

L-arginin, tek başına gentamisin uygulaması ile gözlenen kreatin düzeylerindeki artışı kısmen önledi (Tablo 9).

**Tablo 9. Kontrol,D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME,L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının Kreatin düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
Kreatin (mg/dl)	Kontrol	7	0,47	0.008
	D-arginin	7	0,47	0.004
	L-arginin	7	0,49	0.011
	Gentamisin	7	0,93 <sup>*</sup>	0.053
	L-NAME	7	0,46	0.008
	L-NAME+ gentamisin	7	0,94 <sup>*</sup>	0.021
	L-arginin +gentamisin	7	0,69 <sup>*+</sup>	0.011
	D-arginin+gentamisin	7	0,95	0.019

<sup>\*</sup> Kontrole göre farklılığı, <sup>+</sup> Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

### **Ksantin Oksidaz ( $\mu$ U/ml)**

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre gentamisin uygulaması ile ksantin oksidaz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. D-arginin veya L-arginin, gentamisin uygulaması ile gözlenen bu artış üzerinde etkisiz kaldı (Tablo 10).

**Tablo 10. Kontrol, D-arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME + Gentamisin grubu, L-arginin+Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının ksantin oksidaz düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
Ksantin Oksidaz ( $\mu\text{U/ml}$ )	Kontrol	7	170.59	3.602
	D-arginin	7	170.02	0.994
	L-arginin	7	158.54	1.818
	Gentamisin	7	189.19*	3.455
	L-NAME	7	182.54*	1.663
	L-NAME+ gentamisin	7	203.89	3.079
	L-arginin +gentamisin	7	183.31*	1.610
	D-arginin+gentamisin	7	188.90*	2.665

\* Kontrolle göre farklılığı, + Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

### **GSH ( $\mu\text{mol/l}$ )**

Gentamisin uygulaması sonucunda GSH düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. L-arginin, gentamisine bağlı GSH düzeylerindeki azalmayı kısmen önledi. L-arginin tek başına GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olarak artışa neden oldu (Tablo 11).

**Tablo 11. Kontrol, D-arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının glutatyon düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
GSH ( $\mu\text{mol/l}$ )	Kontrol	7	38.42	0.344
	D-arginin	7	38.02	0.427
	L-arginin	7	43.32*	0.786
	Gentamisin	7	24.21*	1.123
	L-NAME	7	30.28	0.835
	L-NAME+ Gentamisin	7	25.61	1.577
	L-arginin +Gentamisin	7	28.46* <sup>+</sup>	0.261
	D-arginin+Gentamisin	7	25.39	0.472

\* Kontrole göre farklılığı, <sup>+</sup> Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

#### NO ( $\mu\text{mol/dl}$ )

L-arginin veya gentamisin uygulaması, NO düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir artışa neden oldu. Gentamisin ile birlikte L-arginin veya L-NAME uygulaması, gentamisine bağlı gelişen NO düzeylerindeki artış üzerinde anlamlı bir azalmaya neden oldu (Tablo 12).

**Tablo 12. Kontrol, D-arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME+ Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının nitrik oksid düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
NO ( $\mu\text{mol/dl}$ )	Kontrol	7	25,40	0.352
	D-arginin	7	28,03	0.571
	L-arginin	7	44,65*	0.900
	Gentamisin	7	49,92*	1.274
	L-NAME	7	23,31	0.714
	L-NAME+ gentamisin	7	42,77* <sup>+</sup>	1.400
	L-arginin +gentamisin	7	34,61* <sup>+</sup>	0.790
	D-arginin +gentamisin	7	47,27	0.726

\* Kontrole göre farklılığı, <sup>+</sup> Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

### MDA (nmol/ml)

Gentamisin uygulaması MDA değerlerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışa yol açtı. L-arginin uygulaması, gentamisin ile meydana gelen bu artışı kısmen önledi (Tablo 13).

**Tablo 13. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME, L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
MDA (nmol/ml)	Kontrol	7	20,06	0.374
	D-arginin	7	20,66	0.265
	L-arginin	7	21,01	0.389
	Gentamisin	7	42,05*	0.503
	L-NAME	7	19,58	0.552
	L-NAME+ Gentamisin	8	41,83	0.587
	L-arginin +Gentamisin	7	33,58*+	0.488
	D-arginin +Gentamisin	7	42,05	0.503

\* Kontrole göre farklılığı, + Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

### TGF-B1 (pg/ml)

Gentamisin uygulaması kontrol grubuna göre TGF-B1 düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olurken, L-arginin gentamisin ile meydana gelen bu azalmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde geri çevirdi. D-arginin TGF-B1 düzeyinde hafif bir azalmaya neden oldu. D-argininin gentamisin ile birlikte kullanımı, gentamisinin tek başına TGF-B1 düzeyleri üzerinde neden olduğu azalmayı kısmen geri çevirdi (Tablo 14).

**Tablo 14. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TGF-B1 düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
<b>TGF-β1 (pg/ml)</b>	Kontrol	7	741.10	42.978
	D-Arginin	7	656.03	24.794
	L-Arginin	7	793.13	8.939
	Gentamisin	7	156.32*	10.194
	L-NAME	7	679.67	29.988
	L-NAME+ Gentamisin	8	139.58	7.050
	L-arginin +Gentamisin	7	432.13 <sup>+</sup>	11.615
	D-arginin +Gentamisin	7	207.23	12.976

\* Kontrolle göre farklılığı, <sup>+</sup> Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

#### **TNFα (pg/ml)**

Gentamisin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TNF- α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olurken, L-arginin gentamisinin tek başına meydana getirdiği bu artışı kısmen geri çevirdi (Tablo 15).

**Tablo 15. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME, L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TNFα düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
<b>TNFα (pg/ml)</b>	Kontrol	7	705.45	29.28
	D-arginin	7	664.28	9.15
	L-arginin	7	836.57	26.50
	Gentamisin	7	2508.43*	2.91
	L-NAME	7	756.26	14.32
	L-NAME+ Gentamisin	7	2266.00	47.32
	L-arginin +Gentamisin	7	1283.78 <sup>+</sup>	23.29
	D-arginin +Gentamisin	7	2137.14	70.41

\* Kontrolle göre farklılığı, <sup>+</sup> Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05



## TOS ( $\mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Equiv/L}$ ), TAS (mMTrolox) ve Osi İndex

Gentamisin uygulaması TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olurken, TOS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldu. Bu sonuçlar, TAS/TOS düzeyleri arasındaki oranın bir göstergesi olan OSİ indeksinde de düşüşe neden olmuştur. L-arginin uygulaması ise gentamisin ile oluşan bu tablonun tersine çevrilmesine neden olmuştur (Tablo 16,17 ve 18).

**Tablo 16. Kontrol, D-arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının TAS düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
TAS (mMTrolox)	Kontrol	7	0.97	0.008
	D-arginin	7	0.95	0.011
	L-arginin	7	1.17	0.132
	Gentamisin	7	0.65*	0.026
	L-NAME	7	0.89	0.026
	L-NAME+ gentamisin	7	0.62	0.014
	L-arginin +gentamisin	7	0.79*+	0.015
	D-arginin+gentamisin	7	0.74*+	0.030

\* Kontrolle göre farklılığı, + Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

**Tablo 17. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının TOS düzeylerinin karşılaştırılması**

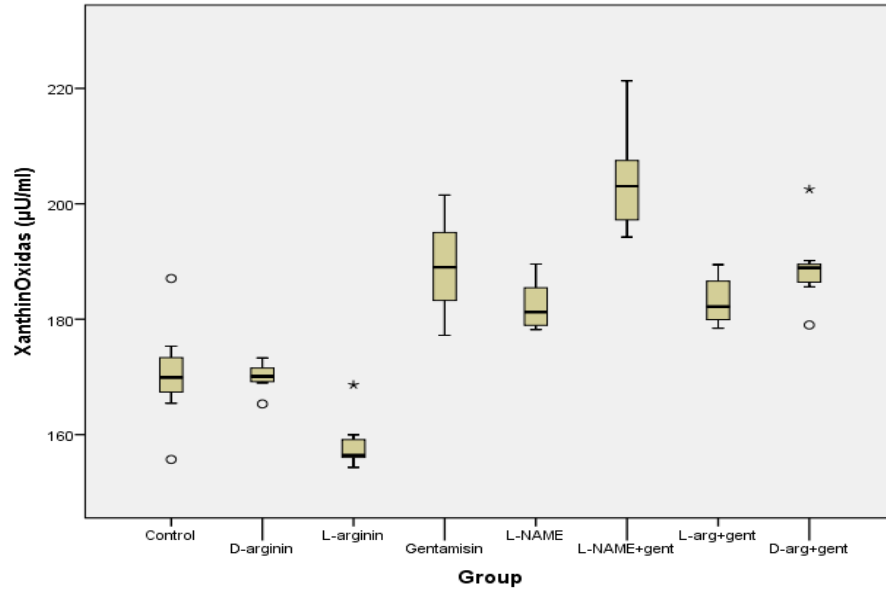
	Grup	N	Mean	SEM
TOS ( $\mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Equiv/L}$ )	Kontrol	7	15.07	0.31
	D-arginin	7	15.16	0.20
	L-arginin	7	17.09	0.33
	Gentamisin	7	27.51*	0.50
	L-NAME	7	16.00	0.40
	L-NAME+ gentamisin	7	25.70	0.516
	L-arginin +gentamisin	7	17,98*+	0.370
	D-arginin+gentamisin	7	24.68	0.688

\* Kontrolle göre farklılığı, + Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05

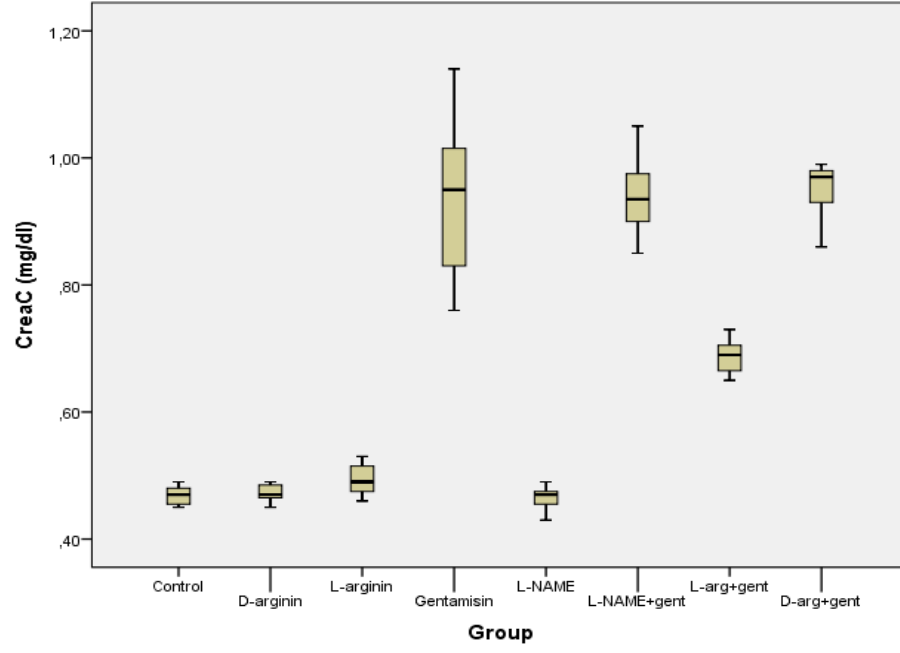
**Tablo 18. Kontrol, D-arginin, L-arginin, Gentamisin, L-NAME, L-NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D-arginin+Gentamisin gruplarının OSİ İndex düzeylerinin karşılaştırılması**

	Grup	N	Mean	SEM
Osi İndex	Kontrol	7	15.59	0.314
	D-arginin	7	16.00	0.306
	L-arginin	7	15.42	1.274
	Gentamisin	7	42.71*	2.075
	L-NAME	7	18.14	0.669
	L-NAME+ gentamisin	7	41.32*	1.319
	L-arginin +gentamisin	7	22.73*+	0.703
	D-arginin+gentamisin	7	33.85*+	1.984

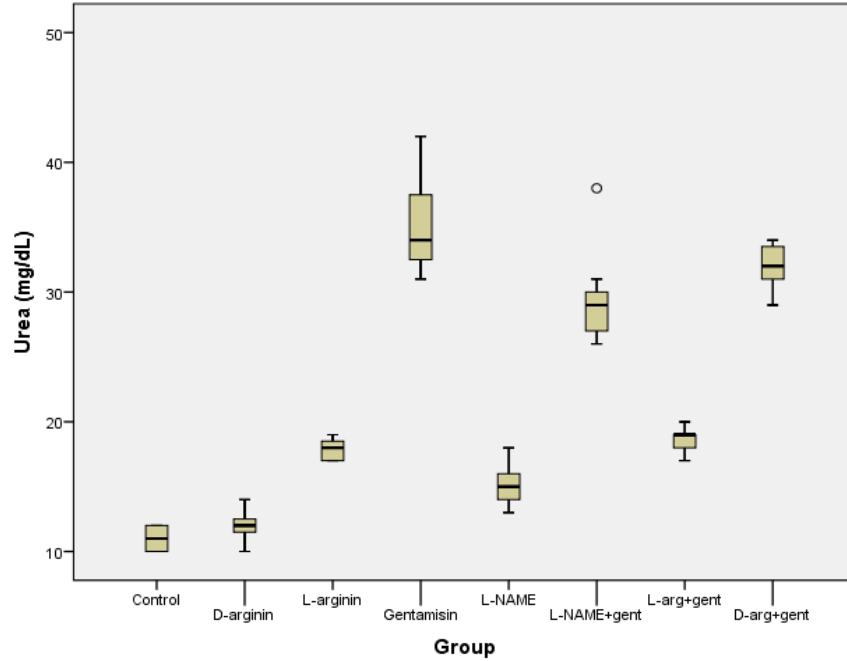
\* Kontrolle göre farklılığı, + Gentamisine göre farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) göstermektedir. P<0.05



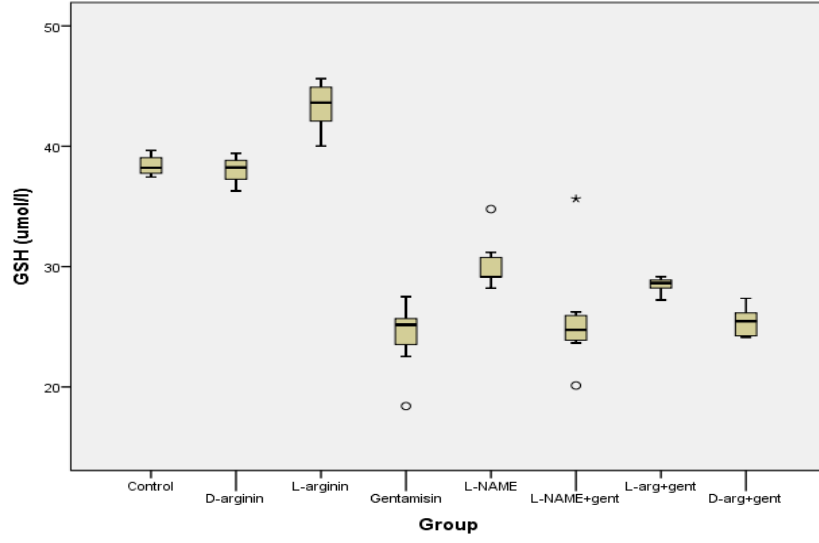
**Şekil 8. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının ksantin oksidazdüzeylerinin karşılaştırılması\*:, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığıgöstermektedir. (p<0,01).**



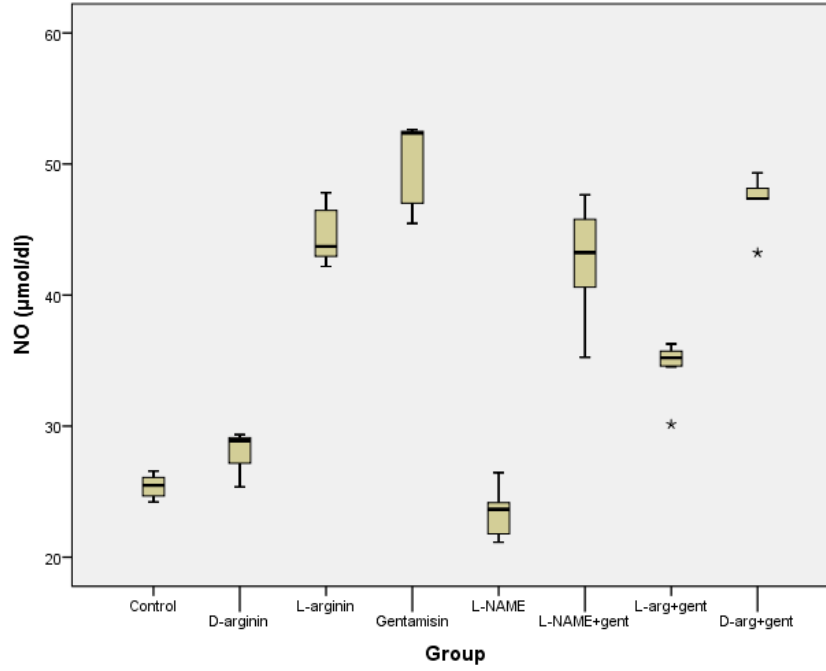
Şekil 9. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının kreatin düzeylerinin karşılaştırılması \*: , o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığı göstermektedir.  $p < 0,01$ .



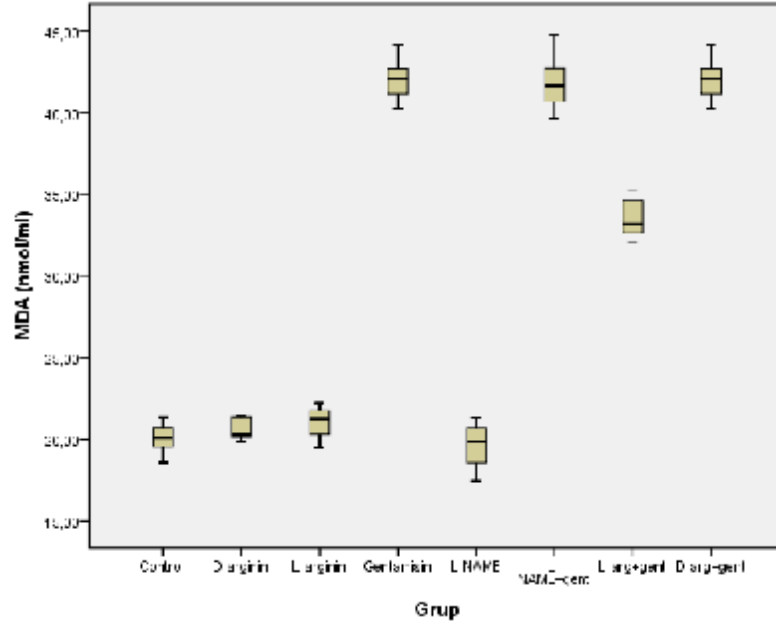
Şekil 10. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının üre düzeylerinin karşılaştırılması \*: , o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığı göstermektedir.  $p < 0,01$ .



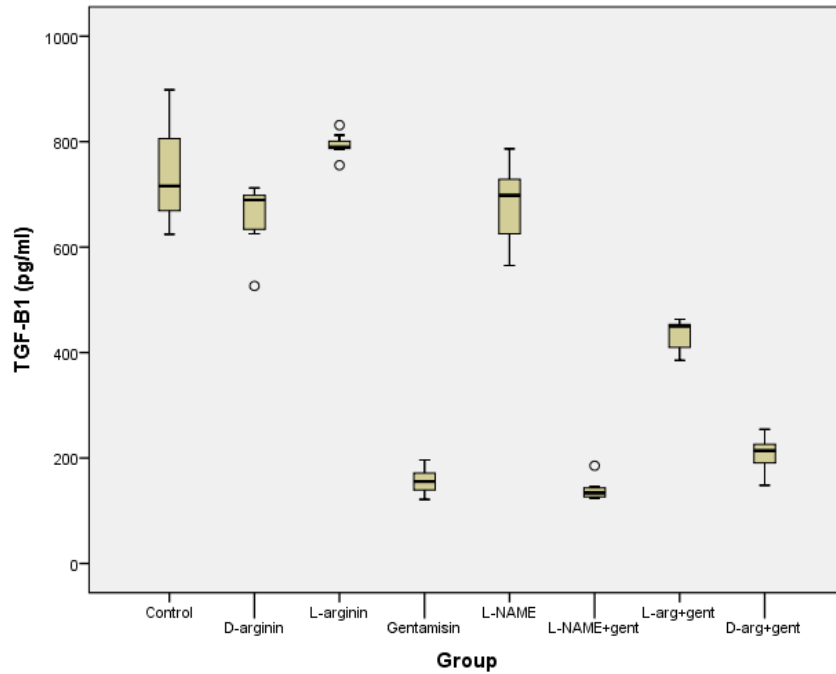
**Şekil 11.** Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının Glutasyon düzeylerinin karşılaştırılması \*: , o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığı göstermektedir.  $p < 0,01$ .



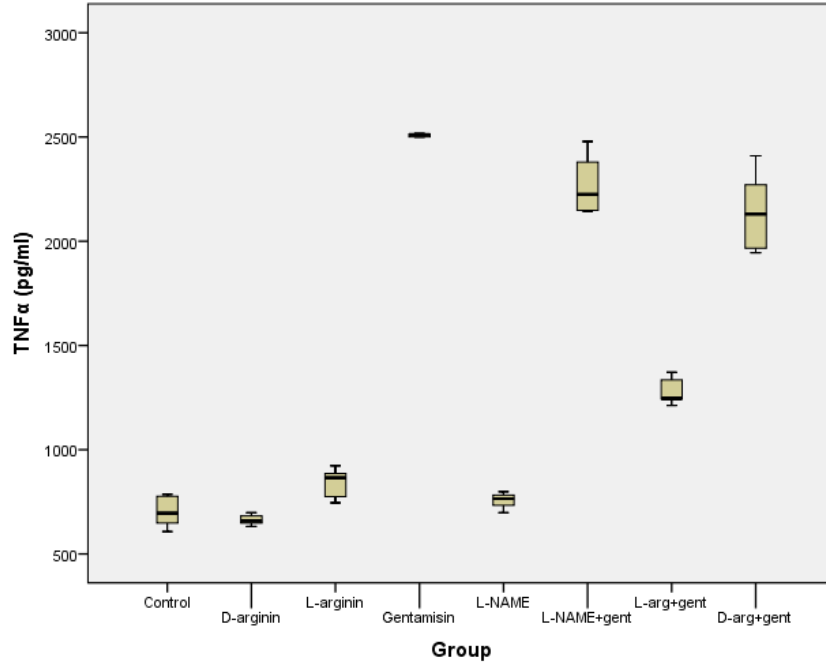
**Şekil 12.** Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının Nitrik oksid düzeylerinin karşılaştırılması \*: , o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığı göstermektedir.  $p < 0,01$ .



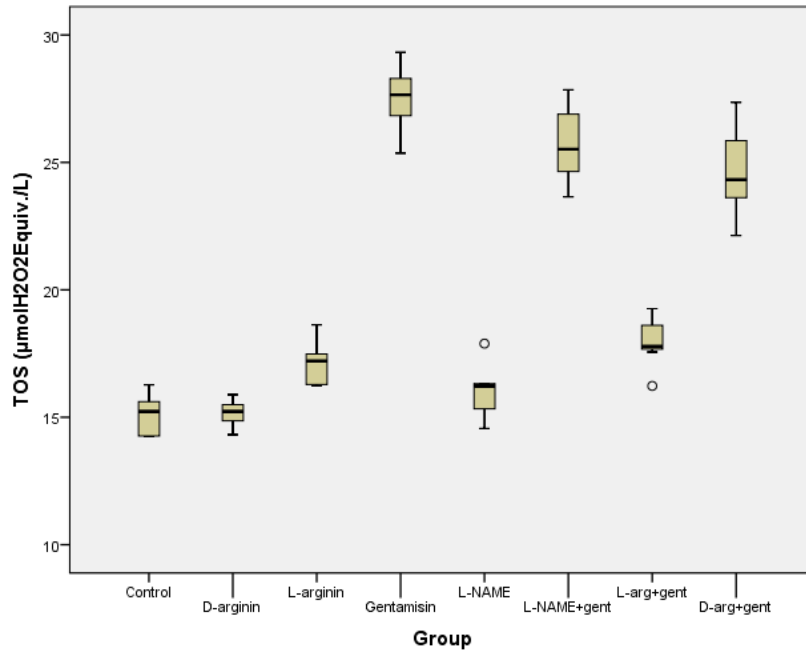
Şekil 13. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması \*: , o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığigöstermektedir.  $p < 0,01$ .



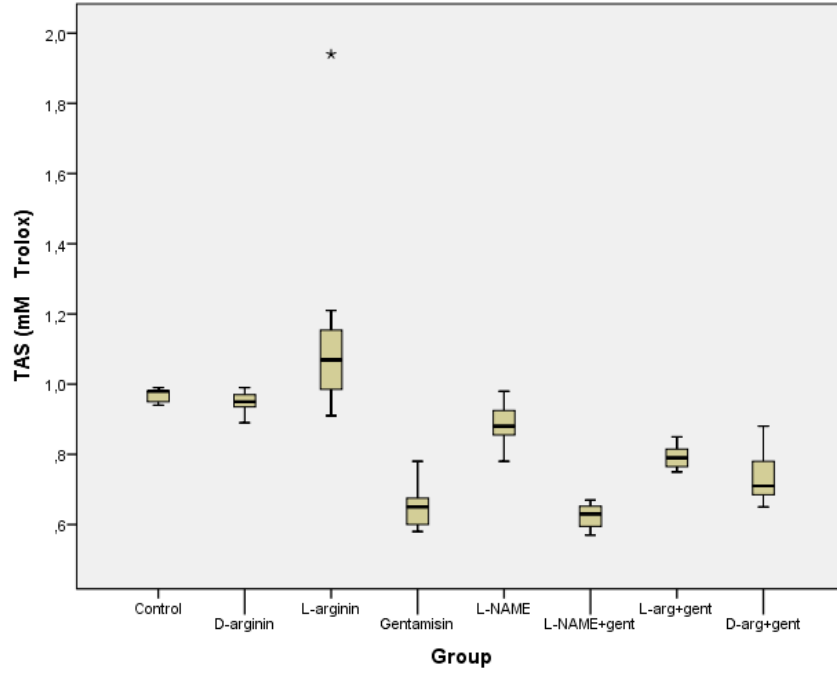
Şekil 14. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TGF- $\beta$ 1 düzeylerinin karşılaştırılması \*: , o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığigöstermektedir.  $p < 0,01$ .



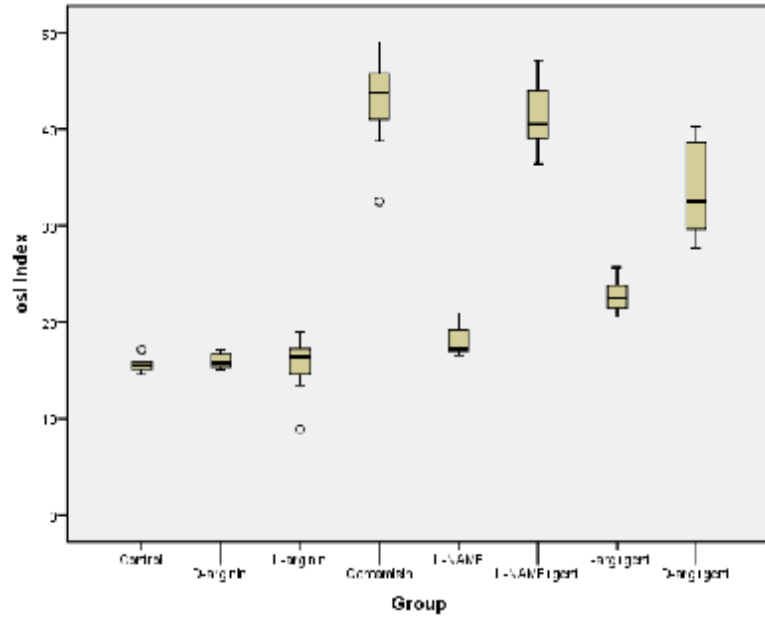
**Şekil 15.** Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TNF  $\alpha$  düzeylerinin karşılaştırılması \*, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığı göstermektedir.  $p < 0,01$ .



**Şekil 16.** Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TOS düzeylerinin karşılaştırılması \*, o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığı göstermektedir.  $p < 0,01$ .

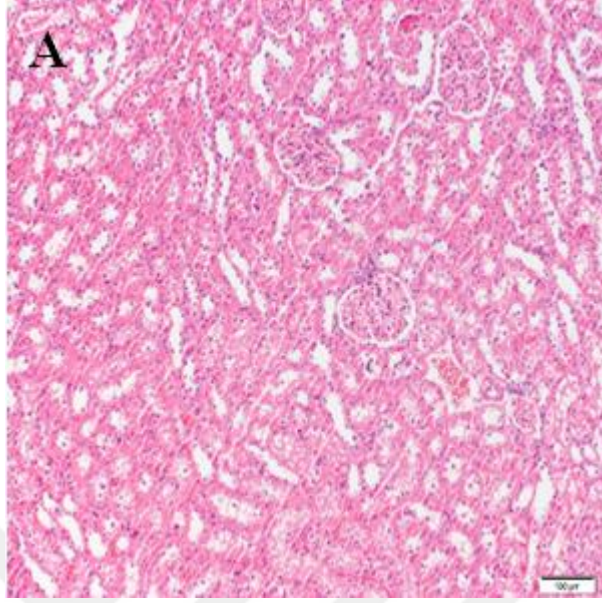


Şekil 17. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının TAS düzeylerinin karşılaştırılması \*: , o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığı göstermektedir.  $p < 0,01$ .

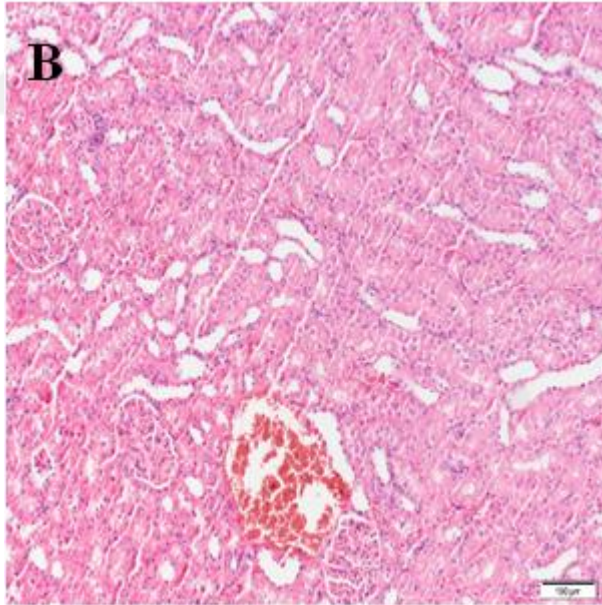


Şekil 18. Kontrol, D –arginin, L-arginin, Gentamisin, L- NAME , L NAME +Gentamisin grubu, L-arginin+ Gentamisin grubu, D arginin+Gentamisin gruplarının OSI düzeylerinin karşılaştırılması \*: , o: ve oo: düzeylerine göre anlamlılığı göstermektedir.  $p < 0,01$ .

## Histopatolojik Bulgular

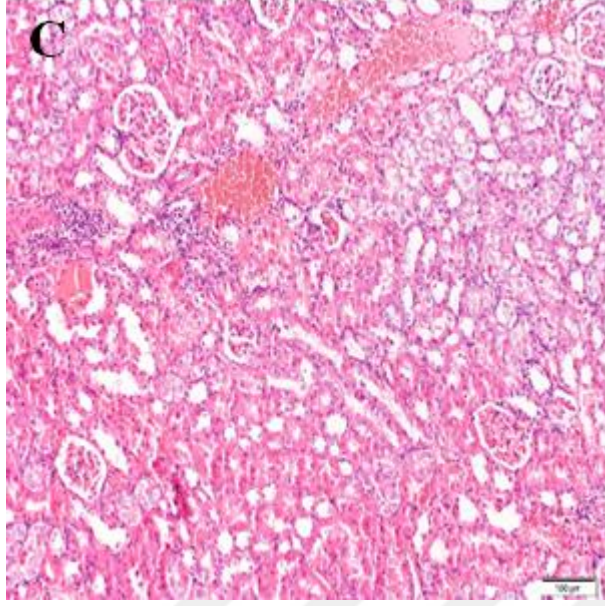


Şekil 19. A. Kontrol Grubu: Böbrek Parenkiminde Konjesyon H&Ex100

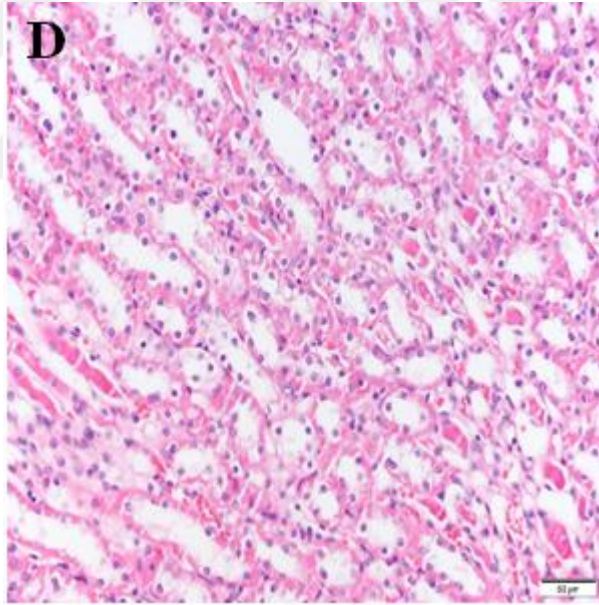


Şekil 20. B. Genta Grubu; Böbrek Parenkiminde Belirgin Konjesyon H&Ex100





**Şekil 21. C. Genta-L-Arg Grubu: Böbrek Parenkiminde Konjesyon Ve İnterstiyel Lenfosit İnfiltrasyonu H&Ex100**



**Şekil 22. D. Genta+D-Arg: Böbrek Parenkiminde Tubuler Dilatasyon Ve Sekresyon İzlenmektedir. H&Ex200**

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada NO prekürsörü olan L-argininin gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisite üzerindeki koruyucu etkisinde, bu aminoasidin nitrik oksid sentezine katkısının dışında, başka mekanizmalar aracılığı ile de katkı sağlayabileceği hipotezinden yola çıkılarak, L-arginin ve onun inaktif izomeri olan D-argininin etkisi gentamisin nefrotoksisitesi üzerinde karşılaştırılmalı olarak incelendi. D-arginin değil fakat L-argininin NO sentezini desteklemekten başka oksidatif stresi azaltmak suretiyle koruyucu etkiye neden olabileceği görüldü.

Yapılan çalışmalarda, bir NO prekürsörü olan L-argininin, gentamisine bağlı böbrek yetmezliğinde protektif bir etki gösterdiği, bir nitrik oksid sentaz inhibitörü olan L-NAME tarafından bu protektif etkinin geri döndürülebildiği gösterilmiş ve L-arginin-NO yolağının renal hastalıklarda major öneme sahip olduğu belirtilmiştir (12,99). Bunun yanısıra, bir aminoasid olan L-argininin, insülin, glukagon, büyüme hormonu ve endojen steroidlerin salınımını stimüle ederek farklı metabolik yolları etkilediği bilinmektedir<sup>13</sup>.

L-NAME'nin GM kaynaklı nefrotoksisite olgularında, nefrotoksisite tablosunda şiddetlenmeye neden olduğu ve Scr düzeylerinde artışlara yol açtığı bildirilmiştir (Valdivielso ve ark. 1997; Can ve ark. 2000; Ghaznavi ve ark. 2005; Ghaznavi ve Kadkhodae 2007). Bu çalışmada gruplar arası karşılaştırmadan elde edilen sonuçlara göre D arginin grubu hariç üre konsantrasyonlarının kontrol grubu ile diğer tüm gruplarda istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde kontrol grubu kreatin düzeyinin D arginin ve L NAME grupları hariç diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, gentamisin uygulanması ile renal hasarın daha da arttığı, üre ve kreatin değerlerinin de yükseldiği tespit edildi. Bu bulguları önceki çalışmalardan elde edilenleri desteklemektedir.

Nitrik oksid ve N-nitro-L-arginin metil esteri olan L-NAME, gentamisin kaynaklı böbrek yetmezliğinde L-argininin etkilerini araştırılmıştır. Sıçanlara günlük subkutan 100 mg/kg gentamisin, 2 gr/l gentamisin ve L-arginin; içme suyunda 100 mg/l Gentamisin ve L-NAME veya gentamisin +L-arginin ve L-NAME karıştırılarak verilmiştir. 8 günün sonunda, gentamisin grubunda belirgin ölçüde kreatinin azaldığı ve böbrek yetmezliği geliştiği kaydedilmiştir. Gentamisin ile tedavi edilen sıçanlara L-

arginin ve L-NAME birlikte uygulanması, tek başına gentamisin verilenlere nazaran anlamlı değişikliğe neden olmuştur<sup>1</sup>. Gentamisin uygulanan ratlara gentamisinin yanı sıra nitrik oksid sentaz önleyicisi olan Larginin ile kombinasyonunun renal hasar açısından olumlu etkilerinin olduğu saptanmıştır. Gentamisin kaynaklı böbrek yetmezliğinde L-arginin takviyesinin yararlı etkileri olduğu sonucuna varılmıştır.

Puromisin amino-nükleozid (PAN) ile glomerüler epitel hücre hasarı ve proteinüri ile karakterize nefrotik sendrom oluşturulan ratlarmetabolik kafeslerde tutularak idrarda protein atılımı ve nitrit (NO<sub>2</sub>) boşaltımı ölçülmüştür. Nefrotik sendrom görülen deneklerin idrar ve plazma nitrit, nitrik oksid düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yükseldiği tespit edilmiştir<sup>2</sup>. Gentamisin kaynaklı böbrek yetmezliğinde oksidatif ve nitrosatif stresin arttığına vurgu yapılmıştır<sup>3</sup>.

Gentamisin bağımlı nefrotoksititeli rat böbrek dokusunda malondialdehid seviyesinde önemli artışlar tespit edilirken, non- protein sülfhidrilleri ve süperoksit dismutaz aktivitesinde önemli düşüşler kaydedilmiştir<sup>4</sup>.

Bir başka çalışmada gentamisin ile tedavi edilen ratlarda kronik L-arginin yönetimi sadece böbrek fonksiyonunda değişikliklere sebep olurken akut L-arginin uygulaması ise herhangi bir deney grubunda böbrek fonksiyonlarını değiştirmemiştir. N-asetil-β D glukozaminidaz'ın idrarla atılımında L-argininin hiçbir etkisi yokken; alkalın fosfatazın L-NAME ile tedavi yapılan her iki grupta da artmıştır<sup>5</sup>.

CP (Cisplatin) düşük doz (1 mg / kg / gün; ip) 15 gün boyunca erkek ve dişi Wistar farelere günlük olarak tatbik edilmiştir. Erkek ve dişi hayvanlarda kilo kaybı, MDA serum düzeyleri ve nitrit oranlarında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır. Ancak, serum BUN, Cr, Mg, ve böbrek MDA düzeyleri, böbrek ağırlığı, hasar puanı erkeklerde kadınlara göre anlamlı derecede daha yüksek tespit edilmiştir (p<0.05)<sup>6</sup>. Tavşanlarda deneysel gentamisin nefrotoksitesinde nitrik oksid donörü (L-arginin) ile selektif ve nonselektif (AG, L-NAME) nitrik oksid sentaz inhibitörlerinin oral kullanımlarının bazı biyokimyasal parametrelere olan etkisinin belirlenmesi amacıyla

I. grup (Kontrol), II. grup (L-arginin), III. grup (Aminoguanidin (AG)), IV. grup (L-NG-nitro arginin metil ester (L-NAME)), V. grup (Gentamisin (GM)), VI. grup (GM+L-arginin), VII. grup (GM+AG) ve VIII. grup (GM+L-NAME) gruplara ayrılmıştır. Kontrol, L arginin, Aminoguanidin, L-NG-nitro arginin metil ester (L-NAME) biyokimyasal parametrelerde önemli bir değişim belirlenmemiştir. Serum ve

idrar nitrit konsantrasyonları bakımından L arginin grubunda artış, Aminoguanidin, L-NG-nitro arginin metil ester (L-NAME) gruplarında ise anlamlı düşüşler belirlenmiştir. Gentamisin verilen serum BUN seviyelerinde artış, kreatinin klirensi değerlerinde ise önemli düşüşler belirlenmiştir <sup>7,8</sup>.

Bizim çalışmamızda Gentamisin uygulanan ratlara gentamisinin yanı sıra L-Arginin eklenmesiyle elde edilen sonuçlara göre, gentamisin grubuna kıyasla NO, MDA, TAS, TOS, OSİ düzeylerinin renal hasar açısından olumlu etkilerinin olduğu saptanmıştır. Kombin tedaviler kıyaslandığında ise oksidatif hasarın en fazla düşüş gösterdiği grubun Larginin + Gentamisin grubu olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu bulgular, NO sentez prekürsörü olan Largininin gentamisine bağlı renal hasarı ve ona eşlik eden oksidatif stresi azalttığı göstermektedir.

Gentamisin tedavisi uygulanan bir başka çalışmada, ratların plazma kreatinin ve üre konsantrasyonlarında belirgin bir artış ile karakterize böbrek yetmezliği oluşturulan grubun, böbrek doku malondialdehit seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu GSH, GSH-Px, CAT seviyelerinin ise kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edilmiştir <sup>17</sup>.Gentamisine bağlı nefrotoksik ratlarda yapılan bir çalışmada artmış malondialdehit düzeyleri ve artmış böbrek oksidatif stres, azalmış glutatyon düzeyleri tespit edilmiştir<sup>9,10</sup>. Gentamisin kaynaklı böbrek yetmezliğinde Aminoguanidin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada; böbrek doku malondialdehit (MDA), nitrik oksid (NO) düzeylerinde artış; ancak GSH-Px, SOD, CAT aktiviteleri ve GSH içeriğinin azaldığı rapor edilmiştir <sup>11</sup>. Gentamisin bağımlı nefrotoksiteli ratlarda 5 günün sonunda rat böbrek mangan superoksit dismutaz; bakır/çinko superoksit dismutaz; glutatyon peroksidaz; glutatyon reüktaz; katalaz aktivitesinin kontrol grubunu sonuçlarına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir <sup>12</sup>. Gentamisin, rat böbrek katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH Px) ve glutatyon (GSH) seviyesi, bakır -çinko süperoksit dismutaz (Cu, Zn-SOD) aktivitelerini kontrol grubuna kıyasla azalmıştır. Zerdeçal tedavisi ile CAT, GSHPx ve GSH seviyesinde gentamisin kaynaklı azalma önemli ölçüde zayıflamıştır <sup>13</sup>.

Gentamisin bağımlı nefrotoksiteli rat böbrek dokusunda artmış malondialdehit, nitrik oksid düzeyleri ve azalmış glutatyon, katalaz, superoksit dismutaz düzeyleri tespit edilmiştir <sup>14</sup>. 5. gün gentamisin ile tedavi edilen rat plazma glutatyon peroksidaz aktivitesinin böbrek total süperoksit dismutaz, Mn superoksit dismutaz, Cu, Zn

superoksit dismutaz aktivitelerinin de kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur<sup>14</sup>. Gentamisin ile tedavi edilen rat gruplarında nefrotoksite geliştiği, renal oksidatif stresde artış, Mn superoksit dismutaz, glutayon peroksidaz ve glutayon redüktaz aktivitesinde düşüş tespit edilmiştir<sup>15</sup>. Ratlarda gentamisinin etkileri araştırılmış ve tiyobarbitürik asid reaktif moleküllerinin seviyesi, total nitrat/nitrit (NOx) konsantrasyonları hem serum hem de böbrek dokusunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Gentamisin grubunda rat böbrek redükte glutayon (mmol/g doku), Glutayon peroksidaz (U/g doku), katalaz (U/g doku) seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur<sup>16</sup>.

Canlı sistemlerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunda aktif rol alan enzimatik kaynaklardan birisi olan ksantin, dokuda herhangi bir stres durumunda tiyol gruplarını okside ederek oksidaz enzimine dönüşmektedir. Ksantin oksidaz aynı zamanda süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroperoksit radikallerinin oluşumuyla ROS üretimine katkıda bulunmaktadır. Oksidatif hasara neden olan vakalarda serum düzeylerinin arttığı bilinmektedir. Glutayon metabolizmada oluşan birçok organik oksidi kimyasal yolla detoksifiye edebilen bir tripeptiddir. Tüm bu bilgilerin doğrultusunda kontrol grubuna kıyasla Gentamisin, L-NAME, L-NAME + Gentamisin, Larginin + Gentamisin, D Arginin+Gentamisin gruplarının glutayon seviyeleri anlamlı düşük olduğu belirlenmiştir. Gentamisin uygulanan ratların glutayon seviyelerinin, kombine tedaviler arasındaki kıyaslama sonucunda anlamlı düşük olduğu tespit edilmiştir. Tek başına gentamisin uygulamasının yapıldığı gruba kıyasla en anlamlı yüksek glutayon seviyesi Larginin + Gentamisin grubuna aittir. Bu sonuçlar L-Argininin gentamisinle birlikte uygulamasının doku stresini azalttığını göstermektedir. Gentamisin ilişkili nefrotoksisitede nitrik oksid yolağının desteklenmesinin yararlı, bu yolağın inhibisyonunun ise zararlı etkilerinin olduğu sonucundan yola çıkarak uzun süreli gentamisin tedavisi gereken durumlarda L-arginin verilmesinin nefrotoksisitenin şiddetinin azaltılmasında yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Ayrıca gruplar arası ksantin oksidaz düzeylerinin istatistiki anlamlılık değerlendirilmesi yapıldığında Gentamisin uygulanan gruba kıyasla L-NAME, Larginin + Gentamisin, D Arginin + Gentamisin gruplarına ait sonuçlar anlamlı derecede düşükbulunmuştur. L NAME + Gentamisin grubunun gentamisin grubuna kıyasla ksantin oksidaz düzeyinin yüksek bulunması, glutayon düzeyinin de gentamisin

grubuna kıyasla düşük olması dokudaki gentamisine bağı ROS oluşumunun NOS inhibisyonu tarafından arttırıldığını göstermektedir. Kombin tedaviler kıyaslandığında ise oksidatif hasarın en fazla düşüş gösterdiği grubun Larginin + Gentamisin grubu olduğu tespit edilmiştir.

L-arginin, Gentamisine bağı artmış TNF $\alpha$  ve NO (pg/ml) düzeylerini anlamlı bir şekilde geri çevirirken, azalmış TGF $\beta$  (pg/ml) düzeylerini arttırmıştır. Tümör nekrosis faktör alfa (TNF-  $\alpha$ ), yangı, hücre yaşamının devamı ve hücre ölümü süreçlerinde yer alan önemli bir sitokindir. Bu molekül uyarılabilir nitrik oksid sentetazı (iNOS) aktive ederek NO üretimini arttırabilmektedir. iNOS sentezi nekroze edici faktör-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) ile uyarılırken, transforming büyüme faktör-  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) ile inhibe edildiği bilinmektedir. TNF  $\alpha$  seviyesindeki bu anlamlı artış nitrozatif ve oksidatif stresdeki artışla doğru orantılı olduğunu düşündürmüştür. Bu bulgular önceki çalışmalarda ileri sürülenleri destekler niteliktedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1- L-arginin, gentamisin bağımlı akut nefrotoksisite olgusunda, nekrozun hafiflemesi ve nitrozatif , oksidatif stres etkisini en fazla azaltan ajanın L-arginin olduğu bu çalışma ile desteklenmiştir. Ancak D-argininin böyle bir etkisi görülememiştir.
- 2- Uzun vadeli gentamisin tedavisi gereken durumlarda, D-arginin değil fakat L-arginin verilmesinin nefrotoksisitenin şiddetinin azaltılmasında olumlu etki gösterdiği görülmüştür. Bulgularımız, bu olumlu etkiye hem oksidatif stresin azalmasının hem de NO sentez yolağının desteklenmesi aracılık edebileceğini göstermektedir.
- 3- Aminoglikozid ilaçlar içinde antibakteriyel etki gücü en yüksek olan Gentamisinin nefrotoksisitesinin azaltılması amacına yönelik olarak bu antibiyotiğin L-arginin ile birlikte verilmesi yararlı olabilir. Ancak bu amino asidin gentamisinin antibakteriyel etkinliği üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığının araştırılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1- **İşlekel H.** Böbrek fonksiyonları ve bozuklukları. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Türkiye: Palme Yayıncılık, **2002**; 37-42.
- 2- **Kılınç A, Kılınç K.** Nitrik oksid: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme Yayıncılık, ANKARA, **2003**.
- 3- **Sharma SP.** Nitric oxide and the kidney. Indian J Nephrol, **2004**; 14: 77-84.
- 4- **Can C, Şen S, Neşe B, Işık.** Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. Eur J Pharmacol, **2000**; 390: 327-334.
- 5- **Klahr S.** The role nitric oxide in hypertension and renal disease progression. Nephrol Dial Transpl, **2001**; 16 (1): 60-62.
- 6- **Valdivielso JM, Cabanero LR, Barriocanal FP, Lopez-Novoa JM.** Effect of nitric oxide synthesis modification on renal function in gentamicin-induced nephrotoxicity. Environ Toxicol Phar, **1997**; 3: 123-128.
- 7- **Mazzon E, Britti D, Sarro AD, Caputi AP, Cuzzocrea S.** Effect of N-acetylcysteine on Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir gentamicin-mediated nephropathy in rats. Eur J Pharmacol, **2001**; 424: 75-83.
- 8- **Polat A, Parlakpınar H, Tasdemir S, Colak C, Vardi N, Ucar M, Emre MH, Acet A.** Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. Acta Histochem, **2006**; 108: 365-371.
- 9- **Ghaznavi R, Faghihi M, Kadkhodae M, Shams S, Khastar H.** Effects of nitric oxide on gentamicin toxicity in isolated perfused rat kidneys. J Nephrol, **2005**; 18: 548-552.
- 10- **Altınışık M.** Protein ve aminoasit metabolizması. Erişim: (<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-13>) Erişim tarihi: 10.02.2016.
- 11- **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacologic Reviews*, **1991**; 43:109-141.
- 12- **Kurus M, Esrefoglu M, Karabulut AB, Sogutlu G, Kaya M, Otlu A.** Oral L-arginine protects against cyclosporine-induced hepatotoxicity in rats Exp Toxicol Pathol. **2008**; 60(4-5):411-9.
- 13- **Cherla G, Jaimes EA.** Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease. J Nutr, **2004**; 134: 2801-2806.
- 14- **Chaverri JP, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macias-Ruvalcaba NA, MedinaCampos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernandez-Pando R S.** allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. BMC Clin Pharmacol, **2004**; 4(5):1-7
- 15- David J.Tietz basic principles in clinical chemistry. **Aslan D**, Eds. *Klinik kimyada temel ilkeler*. Türkiye: Palme Yayıncılık, **2005**;308-722.
- 16- **Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G.** *Nefroloji El Kitabı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **1996**:1-Biyokimyası. Türkiye: Palme Yayıncılık, 2002;37-42.



- 17- Guyton AC. Medical Physiology. **Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ, Aydın Z, Alican İ.** *Tıbbi Fizyoloji*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2001**;280-285.
- 18- **Ricos C, Jimenes CV, Hernandez A.** Biological variation in urine samples use for analyte measurements. *Clin Chem* **1994**; 40: 472-477.
- 19- Raab WP. Diagnostic value of urinary enzyme determinations. *Clin Chem* **1972**; 18(1):5 25.
- 20- **Taşman S, Bilaloğlu E.** İdrar enzimlerinin klinikte değerlendirilmesi. *Doktor* **1994**; 2/3:185-192.
- 21- **Handerson AR, Moss DW.** Enzimler. Ed. Diler Aslan, *Klinik Biyokimyada Temel İlkeler*, Ankara: Palme yayıncılık, **2005**;352-389.
- 22- Süleymanlar G. Akut böbrek yetmezliği. **İliçin G**, Eds. *İç Hastalıkları*, Ankara: Güneş Kitabevi, **2003**;1286-1287.
- 23- **Arık N, Başkol M, Çağlar K.** *Nefroloji*. İstanbul: Deniz Matbaacılık, **2001**; 11-15.
- 24- **Özkan C, Akgül Y.** Deneysel nefrotoksisite oluşturulan tavşanlarda Nitrik oksid donörü (LArginin) ve Nitrik oksid Sentaz inhibitörlerinin (Aminoguanidin, L-NAME) Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkileri. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2010**; 21 (1): 35 – 41
- 25- **Cockroft DW, Gault MH.** Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* **1976**; 16: 31-41.
- 26- **Albernethy, Liberthal W.** Acute renal failure in the critically ill patient. *Crit Care Clin* **2002**; 18: 203- 222.
- 27- **Yurdakök M, Erdem G.** Böbrek ve islevleri Türk Neonatoloji Derneği, *Neonatoloji kitabı*.**2003**; 80: 681-693.
- 28- **Guignard JP, Dukker A.** Clinical neonatal nephrology. In: Barratt TM, Avner ED, Harmon WE, Eds. *Pediatric Nephrology* (4th ed), Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins, **1999**;1051-1066.
- 29- **Aljama P,Cruz JM. Martin de Francisco AL.** New insights in ESRD. *Kidney Int* **2002**; 80: 1-27.
- 30- Brenner RM, Brenner BM. Harrison's principles of internal medicine. **Sağlıker Y.** *Harrison iç hastalıkları prensipler*,.İstanbul: Nobel Tıp Kİtabevleri, **2001**;1550-1561.
- 31- **Bremer V, Tojo A, Kimura K, Hirata Y, Goto A, Nagamatsu T, Suzuki Y, Omata M.** Role of nitric oxide in rat nephrotoxic nephritis: Comparision between inducible and constitutive nitric oxide synthase. *J Am Soc Nephrol*, **1997**; 8 (11): 1712-1721.
- 32- Adreoli SP. Renal failure in the newborn infant. **In Polin RA, Yoder MC, Berg FD**, Eds. *Workbook in Practical Neonatology*, Philadelphia: WB Saunders, **2000**;322-337.
- 33- **Gilbert DN. Mandell GL, Benet JE, Dolin R.** Aminoglycosides. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5. baskı, Philadelphia: Churchill and Livingstone, **2000**; 1: 307-336
- 34- Arman D, Dizbay M. Yeni aminoglikozid antibiyotikler. Antimikrobiyal tedavide yenilikler. *Modern Tıp Seminerleri* **2000**; 40-50.
- 35- Willke A. Aminoglikozidler. **Willke AT, Söyletir G, Doğanay M.** *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojis*,.2. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kİtapevleri, **2002**; 1: 214-223.

- 36- **Akata F.** Aminoglikozidlerde Farmakokinetik/ Farmakodinamik İlişkiler. *ANKEM Derg* **2003**; 3: 232- 236.
- 37- **Aygiin G.** Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Eriskinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi. *Cerrahpasa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*. **2002**;31:39-54.
- 38- **Mıstık R.** Aminoglikozid Antibiyotikler ve Günde Tek Doz Kullanımları. *Klinik Dergisi* **2000**; 1:43-45.
- 39- **MacDonald M.G, Mullett M.D, Mary M.K.** Neonatology Pathophysiology and management of the newborn. 6th Ed.,*Renal Disease* **2000**; 42:980-1065.
- 40- **Hancock RE, Raffle VJ, Nicas TI.**Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **1981**;19: 777–785.
- 41- **Balsam L, Nikbakht N.L.**Arginine inhibits vasopressin-stimulated mesangial cell Ca<sup>2+</sup>. *J. Am. Soc. Physiol* **1998**;275:C352-C357.
- 42- **Mycek M.J, Howland R. D.** Lippincott illustrated review of Pharmacology, 3rd Ed.,Philadelphia: Williams & Wilkins, **2004**;130-171 .
- 43- **Lode H.** Tobramycin: a review of therapeutic uses and dosing schedules. *Curr Ther Res* **1998**; 59: 420- 53.
- 44- Zaska DE. Aminoglycosides. In: **Ewans WE, Schentag JJ, Jusko WJ**, Eds. *Applied Pharmacokinetics. Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. 3rd Ed., Vancouver: Applied Therapeutics,**1992**;14-47.
- 45- **Altınışık M.** Protein ve aminoasit metabolizması. Erişim: (<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-13>). Erişim tarihi: 20.12.2008.
- 46- **Cooper JR, Bloom FE, Roth RH.** The biochemical basis of neuropharmacology. Seventh Ed. New York: Oxford University Press,**1996** ;;119-122.
- 47- **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitricoxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacologic Reviews*, **1991**; 43:109-141.
- 48- **Bökesoy TA, Çakıcı A, Melli M.** Farmakoloji ders kitabı, Türk Farmakoloji Derneği Gazi Kitabevi Tic. Ltd. Sti, **2000**.
- 49- **Lakkis FG, Maldononado MM. Jacobson HR, Striker GE, Klahr S (eds).** Conservative management of chronic renal failure and the uremic sendrome. *The principles and practice of nephrology. Esence ofthe science*. St Louis: CV, **1999**;140-148.
- 50- **Kayaalp SO.** Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 10. Baskı, Ankara: Hacettepe-Tas Kitapçılık Ltd. Sti. **2002**.
- 51- **Seçilmis MA.** İzole perfüze rat mezenter arterinde perfüzyon basıncı üzerine asetilkolin, sodyumnitroprusiat, nitrogliserin ve pinasidil etkilerinin karşılaştırılması. Doktora tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2001**.
- 52- **Büyükafşar K.** Nitrik oksidin fizyolojik olaylardaki rolü. Farmakoloji Eğitim Sempozyumları. Mersin, 27 Mayıs **2005**; 2.

- 53- **Kaur, H., Perkins, MJ.** The free radical chemistry of food additives. In: Aruoma, O.I., Halliwell, B. (Eds.). *Free Radicals and FoodAdditives. London, UK: Taylor & Francis.1991;* 17–35,
- 54- **Mercan, U.** Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi,2004;* 15 (1-2), 91-6.
- 55- **Schuyer, M., Berns, EM.** Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis? *Mol Cell Endocrinol, 1999;*155, 143-152.
- 56- **Önen K.** Böbrek hastalıkları tanısı. Çağlar Ş, Eds. *Klinik Nefroloji, Medikal, 1986;* 57-99.
- 57- **Humes HD.** Acute renal failure prevailing challanges and prospects for the future. *Kidney Int 1995;* 48(Suppl 50):26-32.
- 58- **Kayaalp OS.** Aminoglikozidler. *Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji.* 11. Baskı, Ankara: Hacettepe-Tas.Kitapçılık Ltd. Sti.,2005.
- 59- **Karabulut Bay A.** Hepatit B’li hastalarda eritrosit ve lenfosit antioksidan enzimler, nitrik oksid düzeyleri ve plazma stokinleri. Doktora Tezi, Malatya. **2001.**
- 60- **Slater TF.** Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J. 1984;*222:1-15,
- 61- **Özekin A, Değer O.** LDL oksidasyonu ve etkileri *İbni Sina Tıp Dergisi,2001;* 6:125-132,
- 62- **Gür D.** Anti mikrobik Tedavide Yeni Direnç Sorunları. Antimikrobiyal tedavide yenilikler. *Modern Tıp Seminerleri: 2000;*59-65.
- 63- **Ghanayem BI BP, Ahmed AE.** . Acrylonitrile-induced gastric mucosal necrosis: Role of gastric glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1984;* 232: 570-577.
- 64- **Freeman BA, Crapo JD.** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation, 1982;*47: 412-426.
- 65- **Akkuş, İ.** *Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri.* Konya: Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım.1995.
- 66- **Halliwell B.** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet, 1994;*344: 721-724.
- 67- **Young, ID.** Medical Genetics. *Oxford University Pres.2005;* 52-56.
- 68- **Halliwell, B., Gutteridge, JMC.** Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd edn. Oxford University Press, New York.1999.
- 69- **Yalçın, A. S.** Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom,1992;* 4: 40-43.
- 70- **Aköz M., Vatansev H., Gürbilek M., Akkuş İ., Vatansev C., Kaptanoğlu B.** Glutatyon S transferaz (GST) izoenzimlerinin çeşitli kanser vakalarında araştırılması. *Genel Tıp Derg. 2000;*10(1):1-6,
- 71- **Andreoli SP.** Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatr Nephrol.1991;*5:733-742,
- 72- **Koç, S.** Glutatyon S–transferaz genindeki delesyonların (gstt1, gstm1) koroner arter, hastalığı ve akut miyokart infarktüsü ile ilişkisi, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.2008.

- 73- **Özkan A, Fışkın K.** Serbest oksijen radikalleri, Karsinogenez ve antioksidant enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*,**2004**;14: 52–60.
- 74- **Cüre, E.** Ratlarda demir yüklenmesi ile oluşturulan oksidatif stresin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterinin etkinliğinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.**2007**.
- 75- **Deby, C., Goutier, R.** New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol*,**1990**; 39: 399–405.
- 76- **Marklund, SL.** Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J*,**1984**; 220(1): 269–72.
- 77- **Young, IS., Woodside, JV.** Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, **2001**;54(3): 176-186.
- 78- **Uysal, M.** Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul. **2006**.
- 79- **Özkan, A., Gündüz, G., Çıplak, B., Fışkın, K.** Kimyasal Mücadele Uygulanmış Dociostarus Morakanus Epidemik Populasyonunda Alınan Örneklerde Antioksidan Enzim Aktiviteleri, *Türk J Biol*, Tübitak, **2000**,24:141-149.
- 80- **Karabulut AB., Özerol, E., Temel, İ.** Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2002**;9(2): 85–88.
- 81- **Ulakoğlu ZE, Gümüştas MK, Belce A, Altuğ T, Kökoğlu E.** The relationship between endogenous glutathione depletion and energy metabolism in stress-induced gastric mucosal injury. *Cerrahpaşa J Med*. **1998**;29 (3):127-131,
- 82- **Aksoy Y.** Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *T Klin J Med Sci*.**2002**; 22:442-448,
- 83- **Öztürk M, Güzelhan Y, Sayar K, Tüzün Ü.** Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması. *Klinik Psikofarmakoloji Bülten*.**2001**;,11:155-159,
- 84- **Sevgiler, Y.** Oreochromis niloticus'da karaciğer ve böbrek dokularında Fenthionin NAC ve BSO modülatörlüğünde Glutatyon metabolizmasına oksitadif etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.**2007**.
- 85- F.O. Antioksidan Vitaminler, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Konferansı.,Erzurum.**1999**,
- 86- 145. D. B. Mide Ülserlerinde Melatonin Antioksidan Etkileri. . Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, **1998**.
- 87- Lavelli V, Peri C, Rizzola A. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copperinduced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem*, **2000**; 48(5): 1442-1448.
- 88- **Koca N, Karadeniz F.** Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **2003**; 6: 32- 37.
- 89- **Moses HL, Coffey JR RJ, Leof EB, Lyons RM, Keski-Oja J.** Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *Jour of Celluar physiology Supplement*, **1987**;5:1-7.

- 90- **Turato G, Di Stafeno A, Maetrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, Fabbri LM, Saetta M.** Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, **1995**;152:1262-7.
- 91- **Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF.** Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. *N Engl J Med*.**2000**. May; 342: 1350-59.
- 92- **Şengül CA.** Obez Olgularda İnsülin Direnci, Metabolik Sendrom İle Total Oksidan Ve Antioksidan Düzeyleri İlişkisi. *Uzmanlık Tezi, Gaziantep*.**2010**.
- 93- **Erel, O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, **2005**;38(12), 1103-11.
- 94- **Hu, ML., Louie, S., Cross, CE., Motchnik, P., Halliwell, B.** Antioxidant protection against hydrochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med*,**1993**;121: 257- 62.
- 95- **Harma, M., Kocyigit, A., Erel, O.** Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *J. Mutat Res*,**2005**; 583: 49-54.
- 96- **Cortas NK., Wakid NW.** Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium reduction method. *Clin Chem*. **1990**;36:1440-1443,
- 97- **Zhao, J., Liu, XJ., Ma, JW.** DNA damage in healthy term neonate. *Early Hum Dev*,**2004**; 77: 89–98.
- 98- **Bergmayer, HU.** *Methods of Enzymatic Analysis*,**1974**; 644.
- 99- **Yang CW, Yu CC, Ko YC, Huang CC.** Aminoguanidine reduces glomerular inducible nitric oxide synthase (iNOS) and transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) mRNA expression and diminishes glomerulosclerosis in NZB/W F1 mice. *Clin Exp Immunol*, **1998**; 113: 258-264.

## T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Toplantı Tarihi	Toplantı Yeri	Oturum Başkanı
3	28.04.2014	Ç.Ü.T.F.-DETAUM	Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

**KARAR NO 9-** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'ndan Öğretim Üyesi Görevlisi Doç.Dr.Ata SEÇİLMİŞ'in sorumlu araştırmacı olarak yürütmesi öngörülen, “**Gentamisine Nefrotoksisite Oluşturulan Sıçanlarda L-Argininin Koruyucu Etkisinde Antioksidan Mekanizmaların Rolü**” başlıklı proje, araştırma etiği yönünden değerlendirildi; toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

**BAŞKAN** Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK  
Araştırmacı Uzman Üye  
Farmakoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

**ÜYELER** Doç. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU  
Veteriner Hekim  
ÇÜTF-DETAUM Müdürü

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL  
Araştırmacı Uzman Üye  
Mikrobiyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa EMRE  
Araştırmacı Uzman Üye  
Biyofizik A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Gülşah SEYDAOĞLU  
Araştırmacı Uzman Üye  
Biyostatistik A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Selim KADIOĞLU  
Tıp Etiği Uzmanı Üye  
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bertan YILMAZ  
Araştırmacı Uzman Üye  
Tıbbi Biyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Av. Mehmet Ali AKGÜL  
Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi  
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

Sezgin KERTMEN  
Sivil Üye  
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]



## ÖZGEÇMİŞ

Adana 1970 doğumlu olup ilk orta eğitimimi Adana'da tamamladı. Lise eğitimini Ankara Anafartalar lisesinden mezun olduktan sonra, 1988 yılında A.Ü. Veteriner Fakültesinde Lisans eğitimimi tamamladı. Yüksek lisans eğitimini A.Ü. Veteriner Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç hastalıkları AD.'de tamamladı. Özel sektörde kendi alanında ilgili klinik çalışmaları yürüttü. Toplam kalite alanında, çevre ve gıda temel ve dökümantasyon sertifikaları olup; 2012 yılında Adana Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde doktora eğitimine başladı. Evli ve üç çocuk babasıdır.Yabancı dili İngilizce dir.

