

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULMUŞ KARACİĞER VE
BÖBREK HASARLANMASINA L-NAME VE AMİNOGUANİDİN'İN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Belkıs BİRDEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Meral ÖNCÜ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 1944-YL-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez. No:62

2010-İSPARTA

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü destekte bulunan tez danışmanım Doç. Dr. Meral ÖNCÜ ve tezimin yapılmasında büyük emekleri olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN başta olmak üzere değerli hocalarıma;

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin VURAL'a, Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç Dr. Mehmet Kaya ÖZER'e, Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı ve Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurul Başkanı Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN'e Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na;

Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Araş. Gör. Dr. Halil AŞCI' ya, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Araş Gör. Dr. Firdevs AYLAK'a, Deneysel Araştırma Laboratuvarı (HÜDAL) sorumlu veteriner hekimi İ.Suat ÖVEY ile personel İbrahim ULUSOY, Murat ÖZKAN, Ayşe ÖZKAN ve Dudu BERBER'e; birlikte çalışma imkanı bulduğum Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma görevlilerine; Araş. Gör. Dilek BAYRAM'a, Araş. Gör. İ. Aydın CANDAN'a, Araş. Gör. Dr. Özgür FEDAKAR'a, Araş. Gör. Hakan DARICI'ya, Araş. Gör. Dr. İlkay ARMAĞAN'a, aynı çalışma odasını paylaştığım değerli arkadaşım Araş. Gör. Meltem ÖZGÖÇMEN'e ve bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en derin saygı ve sevgilerimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hepatotoksisite	3
2.2. Nefrotoksisite	3
2.3. Metotreksat.....	5
2.3.1. Metotreksat'ın Metabolizması	6
2.3.2. Metotreksat'ın Yan Etkileri	8
2.3.3. Metotreksat ve Karaciğer Toksisitesi	11
2.3.4. Metotreksat ve Böbrek Toksisitesi	12
2.3.5. Metotreksat Toksisitesi ve Oksidatif Stres	13
2.4. Oksidatif Stres	14
2.4.1. Serbest Radikaller'in Hücrede Hasar Oluşturma Mekanizması	16
2.4.2. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri	17
2.5. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler.....	18
2.5.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	18
2.5.2. Enzimatik Antioksidanlar	20
2.6. Nitrik Oksit.....	23
2.6.1. Nitrik Oksit'in Biyosentezi ve NOS'un İzofomları	24
2.6.2. NO ve Lipit Peroksidasyonu.....	33
2.6.3. Nitrik Oksit Sentaz Enzim İnhibitörleri ve Önemleri.....	35
2.7. Aminoguanidin.....	36
2.8. N ^G -Nitro L-Arjinin Metil Ester (L-NAME)	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
4. BULGULAR	52

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
ÖZET.....	73
ABSTRACT.....	74
KAYNAKLAR	75

SİMGE VE KISALTMALAR

μ	Mikron
7-OH MTX	7-Hidroksimetotreksat
ABY	Akut Böbrek Yetmezliği
ADA	Adenozin Deaminaz
AG	Aminoguanidin
AGE	İleri Glikozilasyon Son Ürünleri
ATN	Akut Tübüler Nekroz
BH4	Tetrahidrobiopterin
Ca²⁺	Kalsiyum
cNOS	Yapısal (Konstitütif) Nitrik Oksit Sentaz
DAO	Diamin Oksidaz
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat Redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FA	Folik Asit
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
GSH	Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HOONO	Hidroksinitrit
IFN-γ	İnterferon gama
IL-1	İnterlökin 1
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
L-NAME	N ^G -Nitro L-Arginin Metil Ester
MDA	Malondialdehid
MPO	Myeloperoksidaz
MTX	Metotreksat
NADP	Nikotinamid Adenozin Difosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻	Süperoksit Radikali
OH⁻	Hidroksil Radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
RA	Romatoid Artrit
RNA	Ribonükleik Asit
ROP	Reaktif Oksijen Partikülleri
SAH	S-adenozil Homosistein
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
THF	Tetrahidrofolat
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör alfa

TABLolar, ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE RESİMLER DİZİNİ

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1: Deney planı.....	48
Tablo 2: Çalışma öncesi ve sonrası sıçanların ortalama ağırlıkları.....	52
Tablo 3: Kontrol ve deney gruplarında karaciğerde gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskall-Wallis p değerleri.....	53
Tablo 4: Gruplar arasında karaciğerde gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri.....	54
Tablo 5: Kontrol ve deney gruplarında böbreklerde gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskall-Wallis p değerleri.....	55
Tablo 6: Gruplar arasında böbreklerde gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri.....	55
Tablo 7: Karaciğer ve böbrek dokusundaki TBARS düzeyleri (n mol/mg protein).....	62
Tablo 8: Gruplar arasında karaciğerde gözlenen TBARS aktivitesinin Mann Whitney U testine göre p değerleri.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Metotreksat'ın moleküler yapısı.....	7
Şekil 2. Dihidrofolat'ın moleküler yapısı.....	7
Şekil 3. Folik asit'ın moleküler yapısı.....	7
Şekil 4. Folik asit metabolizması.....	8
Şekil 5. Nitrik oksidin L-arjinin amino asidinden sentezlenmesi.....	27
Şekil 6. Aminoguanidin'in yapısı.....	37
Şekil 7. L-NAME'nin yapısı (NG-Nitro L-Arjinin Metil Ester Hydrochloride).....	43

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Kontrol grubuna (Grup-I) ait normal karaciğer dokusu (hematoksilen-eozin,x240).....	56
Resim 2: Grup-II'ye ait (20 mg/kg metotreksat uygulanan) karaciğer dokusu (hematoksilen-eozin, x480).....	56
Resim 3: Grup-III'e ait (20 mg/kg MTX ve 20 mg/kg aminoguanidin uygulanan) karaciğer dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	57
Resim 4: Grup-IV'e ait (20 mg/kg MTX ve 3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) karaciğer dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	57
Resim 5: Grup-V'e ait (20 mg/kg aminoguanidin uygulanan) karaciğer dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	58
Resim 6: Grup-VI'ya ait (3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) karaciğer dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	58
Resim 7: Kontrol grubuna (Grup-I) ait normal böbrek dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	59
Resim 8: Grup-II'ye ait (20 mg/kg MTX uygulanan) böbrek dokusu (hematoksilen-eozin, x480).....	59
Resim 9: Grup-III'e ait (20 mg/kg MTX ve 20 mg/kg AG uygulanan) böbrek dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	60
Resim 10: Grup-IV'e ait (20 mg/kg MTX ve 3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) böbrek dokusu (hematoksilen-eozin, x480).....	60
Resim 11: Grup-IV'e ait (20 mg/kg MTX ve 3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) böbrek dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	61
Resim 12: Grup-V'e ait (20 mg/kg Aminoguanidin uygulanan) böbrek dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	61
Resim 13: Grup-VI'ya ait (3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) böbrek dokusu (hematoksilen-eozin, x240).....	62

1. GİRİŞ

Metotreksat folik asit antagonisti ve yüksek dozlarda timidilat sentezini engelleyerek DNA sentezini baskılayan bir aminopterindir (Göğüş 2001). Metotreksat (MTX) lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri ve diğer bazı kanser tiplerinde kemoterapötik ajan olarak kullanıldığı gibi psöriasis, dermatomiyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit (RA) gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda da yaygın şekilde kullanılmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2006).

MTX kullanımını takiben görülen en yaygın yan etkilerden biri böbreklerde görülen fonksiyon bozukluğudur (Hempel et al., 2005). Akut lösemi ya da psöriasis gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan yüksek doz MTX'in karaciğerde ilerleyici fibrozis ve siroza kadar gidebilen hepatik toksisite ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Hytioglou et al., 2004). MTX'in mide-bağırsak, karaciğer, böbrek ve kemik iliği toksisiteleri en sık görülen yan etkileridir (Şener ve ark. 2006). Sıçanlara MTX verilmesinin; kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsakta glutatyon (GSH) seviyelerini azalttığı, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesini ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (Jahovic et al., 2003). Son zamanlarda çalışmalar Metotreksat'ın normal ve anormal dokulardaki istenmeyen etkilerini önleyebilecek maddeler üzerinde yoğunlaşmıştır (Yüncü ve Kanter 2006).

Nitrik oksit (NO) çok yönlü ve farklı biyolojik etkilere sahip bir kimyasal moleküldür. Başlangıçta vazodilatatör ve nörotransmitter olarak tanımlanan NO'nun, yapılan çalışmalarla vücudun birçok organında farklı fonksiyonlara sahip olduğu ortaya konmuştur (Aladağ ve ark., 2001, Kendall et al., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003, Özkan ve Yüksekol 2003, Sharma 2004). Son yıllarda NO'nun böbrek dokusunda da fizyolojik ve patolojik durumlarda önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (Bremer et al., 1997, Can ve ark., 2000, Gabbai 2001, Klahr 2001, Kılınç ve Kılınç 2003, Sharma 2004).

NO, karaciğerdeki parankim hücrelerinde ve parankimal olmayan diğer hücrelerde L-arginin aminoasidinden uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi aracılığıyla üretilen ve yüksek reaktif oksidan kapasiteye sahip bir bileşendir

(Moncada and Higgs 1993, Gardner et al., 1992). Nitrik oksitin karaciğer üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte, bu etkinin tek yönlü olmayıp, organizmanın içinde bulunduğu duruma göre değişebildiği de belirtilmektedir (Koçak 2008).

Nitrik oksit (NO), Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-Arjinin prekürsöründen meydana gelir. Bu enzimin üç izoformu vardır. Bunlar, nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS)'tur (Kato et al., 2009).

NO'nun salınması için gerekli olan L-arginin / NO yolu arginin ve sitrüllin aminoasit türevleri ile aminoasit yapısında olmayan çeşitli bileşikler tarafından inhibe edilebilmektedir (Aladağ ve ark., 2001, Alderton et al., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003).

Aminoguanidin (AG) ve N^G-nitro L-arjinin metil ester (L-NAME) başlıca önemli NOS inhibitörlerindedir. L-NAME, her üç NOS izoenzimini inhibe etmektedir. Aminoguanidin ise, iNOS için seçici bir inhibitördür (Kilbourn et al., 1997, Alderton et al., 2001; Gölçük ve ark., 2003, Kılınç ve Kılınç 2003).

Bu çalışmada sıçanlarda metotreksat uygulamasına bağlı olarak oluşan hepatotoksisite ve nefrotoksisite durumlarında histolojik ve biyokimyasal bulgulardaki değişiklikler ile NOS inhibitörlerinin (AG ve L-NAME) kullanımının metotreksat ilişkili böbrek ve karaciğer hasarındaki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatotoksisite

Karaciğer gastrointestinal sistemdeki konumu nedeniyle birçok yabancı maddenin metabolizmasından sorumludur ve ilaç toksisitesi için hedef organdır. Akut karaciğer yetmezliklerinin % 50' den fazlasında ilaçlar sorumlu tutulmuştur (Eren ve ark., 2004). İdiosenkrazik ilaç reaksiyonlarının % 75'inden fazlası ise karaciğer transplantasyonu ve ölüm ile sonuçlanmıştır (Ostapowicz et al., 2002)

Bugün için tedavi amaçlı kullanılan ilaçların birçoğu emilimlerini kolaylaştıracak şekilde lipofilik yapıya sahip olup, hidrofilik özellik kazanabilmek için biyotransformasyona ihtiyaç duyar. Bu şekilde idrar ya da safra ile atılabilir hale gelirler (Weinshilboum 2003). Biyotransformasyon ilacın atılabilir hale gelmesi yanında bazı ilaçların aktif hale gelebilmesi için de esastır. Yine biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitler toksisiteden de sorumlu olabilirler (Eren ve ark., 2004).

Kronik karaciğer hastalığında hepatotoksisite riskinin arttığı ilaçlar içinde metotreksat, antitüberküloz ilaçlar, niasin, vitamin A, antiandrojenler sayılabilir. Bu ilaçların kullanımı sırasında karaciğer enzimlerinin yakın izlemi önerilir (Eren ve ark., 2004).

2.2. Nefrotoksisite

Böbrekler özellikle metabolik aktivitenin fazla olması, zararlı maddelerin vücuttan uzaklaştırılması ve aktif transport fonksiyonlarından dolayı birçok ilaç ve toksik madde için hedef organ durumundadır (Maden 1994, Kürşat 2000, Ertekin ve ark., 2003).

Nefrotoksisite nefrotoksik renal yetmezlik, akut glomerulonefritis, intersitisyel nefritis, nefrotik sendrom ve aşağı nefron nefrozisi olarak tanımlanmaktadır. Nefrotoksisitede başlıca tubuler nekroz şekillendiğinden Akut tübüler nekroz (ATN) olarak da tanımlanmaktadır. ATN iskemik ve nefrotoksik ATN olmak üzere ikiye ayrılır (Maden 1994, Turgut ve ark., 1995, Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999).

Nefrotoksisite sırasında meydana gelen değişiklikler (renal konsantrasyon bozukluğu, akut túbúler nekroz veya renal yetmezlik) ilacın renal kortekste birikme özelliğinden kaynaklanmaktadır (Luft et al., 1976, Mıstık 2000). İlaça bağlı toksisite, ATN, intersitisyel nefritis ya da glomerúlo nefritis şeklinde oluşabilmektedir (Maden 1994, Evenepoel 2004). Alınan önlemlere rağmen, hastaların % 20'sinden fazlasında ilaç toksisitesi Akut bóbrek yetmezliği (ABY) ile sonuçlanmaktadır (Can ve ark., 2000, Anderson and Barry 2004, Ghaznavi et al., 2005).

Evcil hayvanlarda birçok ilaç ve kimyasal madde nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Bunların başlıcaları; metotreksat, aminoglikozidler (neomisin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, tobramisin, amikasin vb), sefalosporinler, polimiksinler, tetrasiklinler, sűlfanamidler, penisilinler, monensin, vankomisin, acyclovir, amfoterisin-B, çeşitli ağır metaller, hemoglobin gibi endotoksinlerdir (Brion et al., 1984, Brier et al., 1985, Maden 1994, Kaneko et al., 1997, Hazıroğlu ve Milli 1998, Anderson and Barry 2004).

Kemoterapiye bağlı nefrotoksisiteyi önlemek için çeşitli ilaçlar kullanılabilir. Bunların en ucuzu ve etkilisi hastaya kemoterapi öncesinde yeterli miktarda serum fizyolojik uygulayarak diürezisi sağlamaktır. Kemoterapiye bağlı nefrotoksisitenin önlenmesi ile hastaların mortalite ve morbidite oranı azaltılabilir (Erkurt ve ark., 2009).

Bóbrek dokusu, kan akışının fazlalığı, konsantrasyonu, metabolik aktivitenin fazla olması, zararlı maddelerin vücuttan uzaklaştırılması ve aktif transport fonksiyonlarından dolayı birçok ilaç ve toksik madde için hedef organ durumundadır. ABY'nin en önemli nedeni birçok madde ve ilaca bağlı meydana gelen nefrotoksisitedir (Maden 1994, Hazıroğlu ve Milli 1998, Ertekin ve ark., 2003).

Akut Bóbrek Yetmezliği (ABY):

Akut bóbrek yetmezliği hem insan hem de hayvanlarda bóbrek kan akımının ani düşüşü ve glomerúler filtrasyon hızında (GFR) meydana gelen azalmaya bağlı olarak, kan üre azotu, (BUN) kreatinin ve diğer üremik toksinlerin vücutta birikmesi ve konsantre idrar çıkarılması ile karakterize klinik bir tablodur (Schramm et al.,

1996, Anderson and Barry 2004, Lameire and Vanholder 2004, Schrier et al., 2004, Aydın 2006).

ABY'nin etiyolojisinde prerenal, renal ve postrenal nedenler rol oynamaktadır (Deprem 1987, Bicik ve Ersan 1999, Horoz ve Özgür 2004, Evenepoel 2004, Lameire and Vanholder 2004, Aydın 2006).

Renal kökenli ABY'nin en sık nedeni iskemi veya toksinlere bağlı gelişen ATN'dir. Renal ABY olaylarında meydana gelen patolojik durum prerenal ABY'den farklı olarak böbrek kan akımının düzeltilmesi ile hemen düzelmez. Genelde geri dönüşümlü bir olay olmasına rağmen, kortikal nekroz oluşturacak düzeyde bir işlev bozukluğu mevcut ise kalıcı böbrek yetmezliği söz konusu olabilmektedir (Evenepoel 2004, Horoz ve Özgür 2004).

İskemi, toksinler, çeşitli ilaçlar metotreksat, aminoglikozidler, anfoterisin-B acyclovir, sülfonamidler, non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID), vankomisin bu tür renal yetmezliğe yol açan başlıca nedenlerdir (Hazıroğlu ve Milli 1998, Kurtde ve Borkü 1998, Bicik ve Ersan 1999, Anderson and Barry 2004, Evenepoel 2004, Horoz ve Özgür 2004).

2.3. Metotreksat

MTX, lösemi, çeşitli solid tümörler, psöriazis, romatoid artrit ve diğer bazı otoimmün hatalıkların tedavisinde 40 yıldan daha uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda sarkoidoz, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve vaskülitlerde de kullanılmaktadır. MTX, S fazındaki hücreleri etkileyen folat antagonisti antimetabolittir. Dihidrofolat analogu olan ilaç, hücre replikasyonunda anahtar enzim Dihidrofolat redüktaz'a bağlanarak pürin ve pirimidin yapımı için gerekli tetrahidrofolat sentezini inhibe eder. Pürin ve primidin sentez inhibisyonu apoptozisle sonuçlanan DNA defektlerine yol açar (Chabner et al., 2007, Uraz ve ark., 2008). MTX'in aynı zamanda kaspaz aktivasyonuna bağlı mekanizma ile apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Papaconstantinou et al., 2001).

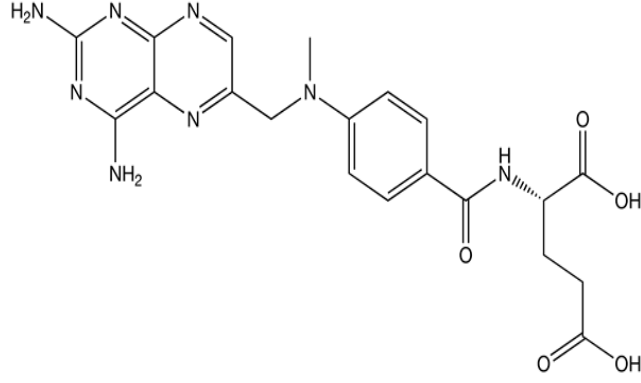
MTX'in sitotoksik etkisi, kanser hücreleri için seçici olmadığından kemik iliğindeki hematopoetik hücreler ve bağırsak mukozasındaki aktif bölünen hücreler gibi proliferasyon hızı yüksek dokuları da etkiler (Chabner et al., 2007).

MTX toksisitesinin, oluşan sistemik oksidatif stres, tedavi süresi ve doz şeması, hastanın risk faktörleri ve hastalığın tipi ile genetik ve moleküler apoptotik faktörler gibi birçok faktörün etkileşimiyle oluştuğu rapor edilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2006).

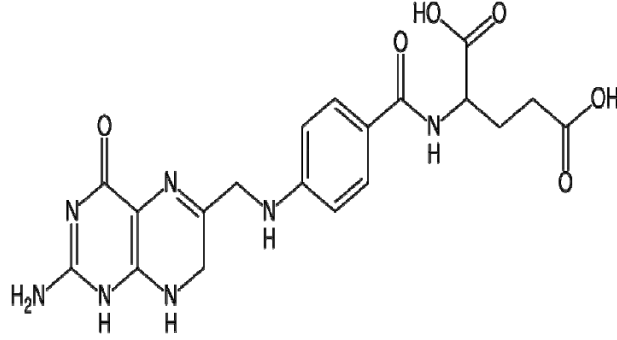
2.3.1. Metotreksat'ın Metabolizması

Folik aside bağlı enzimler tek karbon fragmanların transferini içeren reaksiyonlarda gereklidir. Bunlar arasında en önemlisi DNA sentezi için deoksiüridilatın metilasyonu ile timidilat elde edilmesidir. Bu işlem sırasında metilen tetrahidrofolat (MTHF) dihidrofolat'a (DHF) dönüşür. DHF'nin ise tekrar kullanılması için Tetrahidrofolat'a (THF) dönüşmesi gereklidir. Bu dönüşüm için dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzime ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat'a (NADPH) gereksinim vardır. THF, DNA ve RNA sentezi için gerekli olan pürin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezinin önemli bir komponenti olan timidilatın üretiminde rol oynar (Flores and Kerdel 2000). Bu nedenle MTX, THF eksikliğine yol açarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkiler (Jolivet et al., 1983). MTX'in moleküler yapısı DHF'ye benzer. MTX'in yapısında birden fazla metil grubu vardır ve DHF'deki hidroksil (OH⁻) grubu yerine NH₂ bulunur. MTX, DHF'yi THF'ye çeviren DHFR enzimini inhibe eder (Dutz and Ho 1998). MTX folilpoliglutamil sentetaz ile 1-4 glutamat gruplarının eklenmesiyle poliglutamit forma dönüştürülen bir ilaçtır. Poliglutamit yapı muhtemelen tüm hücrelerde bulunur. Poliglutamit formun ölçümleri eritrosit, karaciğer, fibroblastlar ve kemik iliği myeloid serisinde yapılmıştır. MTX poliglutamitleri hücre içinde tutulur ve DHFR enzime bağlanarak DHF ile yer değiştirir (van Ede et al., 1998, Rubino 2001).

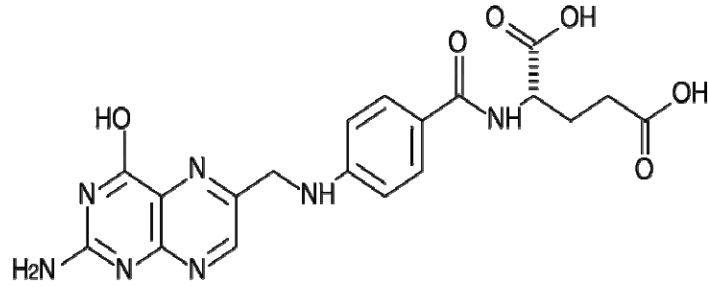
MTX düşük dozlarda oral olarak hemen hemen tamamen emilir. Başlangıç yarı ömrü (dağılımı) 1,5-3,5 saattir. Terminal yarı ömrü 8-15 saattir. MTX ve metabolitleri hücrelere aktif taşıma ile girer ve büyük oranda böbrek yoluyla elimine olur (Yılmaz 2008).



Şekil 1. Metotreksat'ın moleküler yapısı.



Şekil 2. Dihidrofolat'ın moleküler yapısı.

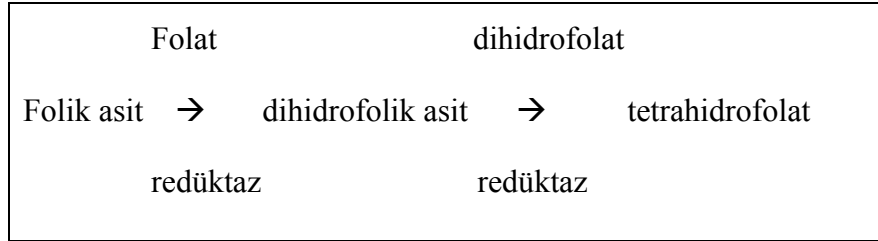


Şekil 3. Folik asit'in moleküler yapısı.

İnsanlarda vücudun ana yapılarından folik asidi (FA) sentezleme özelliği olmadığından diyetle FA alımı zorunludur. Dihidrofolat redüktaz, DHF'yi FA'ya bağımlı yollarda temel bileşen olarak hizmet eden THF'ye dönüştürür (Şekil 4). Chabner ve ark. MTX'in FA antagonisti mekanizması olarak iki teoriyi öne sürmüşlerdir.

Folik asit azalma teorisi: İntrasellüler FA'nın azalması DHFR'nin blokajına dayanmaktadır.

Yarışma teorisi: Nükleotidlerin sentezinde görevli basamakları MTX'in doğrudan inhibe etmesine ve DHF birikimine dayanmaktadır (Chabner et al., 1985). MTX, DHFR'yi inhibe eder bu yüzden THF'nin azalmasına neden olur. MTX poliglutamatları 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz ve aminoimidazol-karbokzamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe eder. Bu enzimlerdeki inhibisyon pürin ve pirimidin metabolizmasında inhibisyonla sonuçlanır (van Ede et al., 1998). Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA sentezini ve enerji üretimi için gerekli ATP üretimini inhibe eder. Ayrıca THF'ye dönüşmeden kalan dihidrofolatpoliglutamatlar ve MTX'in poliglutamat türevleri toksik inhibitör metabolitler şeklinde birikir. Timidilat sentazın ve pürinin sentezinde rol oynayan transformilaz enzimlerinin inhibisyonu, MTX'in iki poliglutamat metaboliti tarafından yapılır (Bram et al., 1987). MTX'in hücrelerdeki toksik etkileri dışarıdan ilaç olarak verilen folinik asit (N5-formiltetrahidrofolat) tarafından antagonize edilir; folik asidin kendisi ise bu durumda THF'ye dönüşemediğinden antidotal etkinlik göstermez.



Şekil 4. Folik asit metabolizması.

2.3.2. Metotreksat'ın Yan Etkileri

MTX tedavisi esnasında ortaya çıkan yan etkiler oldukça yaygındır. Yan etkinin şiddeti değişkendir. En sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür. Bulantı, kusma, transaminazlarda yükselme ve stomatit gibi yan etkiler sıklıkla dozla ilişkilidir. MTX tedavisi alan romatoid artritli hastaların yaklaşık %30'unda ilaç toksisitesi nedeniyle tedavi kesilir (van Ede et al., 1998).

MTX toksisitesinin mekanizması hala tam anlaşılamamıştır. Ancak bazı yan etkiler; pürin, pirimidin, poliamin ve FA gibi metabolik yolların bozuklukları ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Kremer ve ark. ilk kez RA'lı hastaların karaciğer biyopsisinde MTX poliglutamatlarının birikmesine, FA eksikliğini eşlik ettiğini göstermiştir (Kremer et al., 1986). Değişik yollarda adenozin deaminazın (ADA) MTX tarafından inhibisyonu deoksiadenozin ve deoksiadenozin trifosfat (dATP) gibi adenozin metabolitlerinin birikimine yol açar. Adenozin, deoksiadenozin ve metilli adenozin metabolitleri yüksek konsantrasyonlarda muhtemelen doğrudan toksik etkilidirler.

Deoksiadenozin kromozom kırıklarına ve S-adenozil homosistein (SAH) hidrolaz enziminde inaktivasyona yol açar. SAH-hidrolaz metilasyon reaksiyonları için gereklidir. dATP, DNA sentezi için gerekli olan ribonükleotid redüktazı inhibe eder (van Ede et al., 1998). Baggott ve ark. MTX tedavisi ile ADA inhibisyonu geliştiğini destekleyen veriler elde etmişlerdir (Baggot et al., 1993). MTX'in vasküler hastalık için risk faktörü olarak bilinen hiperhomosisteinemiye sebep olduğu bilinmektedir (van Ede et al., 1998, Kane et al.,1994). Metilasyon reaksiyonlarının belirleyicisi olan S-adenozil metionin (SAM)/SAH oranında azalmaya neden olur. Metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu toksisiteye neden olabilir (van Ede et al., 1998).

MTX dihidrofolatı (DHF) tetrahidrofolata (THF) çeviren dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini baskılar (Dutz and Ho 1998). Tetrahidrofolat pürin ve pirimidin sentezinin önemli bir parçası olan timidilatın üretiminde etkindir (Flores and Kerdel 2000). Pürin ve pirimidin nükleotidleri deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) sentezinde rol oynarlar. Bu nedenle MTX, THF eksikliğine yol açarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkiler. Bu metabolik yollar üzerinde yaptığı değişiklikler ile MTX'in tedavi edici etkileri yanında toksik etkileride ortaya çıkmaktadır (Jolivet et al., 1983).

MTX'in mide-bağırsak, karaciğer, böbrek ve kemik iliği toksisiteleri en sık görülen yan etkileridir (Şener ve ark., 2006).

MTX, bağırsak mukozasında morfolojik, biyokimyasal ve fizikokimyasal değişikliklere yol açmaktadır (Takeuchi et al., 1989, Tsurui et al., 1990). Bu değişiklikler sonucu bulantı, kusma, diyare, stomatit, gastrointestinal ülserler ve mukozitis gibi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. MTX'in antimitotik etkisinin malabsorbsiyon sendromuna yol açtığı iyi bilinir (Loehry and Creamer 1969, Taminiou et al., 1980, Naruhashi et al., 2000). Tüm bu istenmeyen etkiler hastanın genel durumunun daha da bozulmasına neden olmaktadır.

Metotreksat uygulanmış sıçanların kan, karaciğer, böbrek ve ince bağırsak glutasyon (GSH) seviyelerinin azaldığı, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Jahovic ve ark., 2003).

MTX'in hepatotoksisite ve nefrotoksisite ile ilgili mekanizması konusunda en çok değinilen konu oksidatif stres (glutasyon seviyelerinin azalması) olmuştur (Jahovic et al., 2003).

Yüksek doz MTX kullanan psöriazisli hastalarda karaciğer fibrozisi ve sirozu ile seyir gösteren hepatotoksisitenin oluştuğu gösterilmiştir (Tobias and Aurbach 1973, Roenigk et al., 1971). Aynı zamanda yüksek doz MTX'in akut böbrek yetmezliğine sebep olduğu ve serum kreatinin, üremi ve hematüri seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Kintzel 2001). Metotreksat zehirlenmelerinde oluşan akut hepatorenal fonksiyon bozuklukları, plazma değişimi ve hemodiyaliz ile düzeltilmeye çalışılmaktadır (Goto et al., 2001). MTX aracılı toksisite pek çok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterir. Tedavi süresi, kullanım dozu, hastaların risk faktörleri, hastalığın tipi, genetik varlığı ve moleküler apoptotik faktörler toksisiteyi etkiler (Neuman et al., 1999).

MTX karaciğerde steatoz, fibrozis, kolestaz ve siroz gibi farklı hepatotoksik bulgulara yol açabilir (Vonen and Morland 1984). MTX'in nefrotoksik etkisi ise; MTX ve metaboliti olan 7-hidroksimetotreksatın (7-OH MTX) böbrek tübüllerinde çökmesi ile açıklanmıştır ki bu da MTX atılımının gecikmesi ile sonuçlanır (Van den Bongard et al., 2001).

Bazı ksenobiyotiklerin karaciğer ve böbrek toksisitesinde ve organ yetmezliği patogeneğinde, reaktif oksijen metabolitleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mitchell

et al.,1973, Baliga et al., 1999). Serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oluşan lipid peroksidasyonunun, hücre membran hasarı ve yıkımı ile MTX aracılı doku tahribatına önemli oranda katkı yaptığı düşünülür. Çeşitli kimyasal maddeler tarafından oluşturulan doku hasarında, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu mikrovasküler bozukluklar üzerinde durulmaktadır (Parks and Granger 1988).

Serbest radikallerin dokuya doğrudan zarar verici etkileri yanı sıra; dokuda karmaşık bir şekilde lökosit birikimini tetikledikleri de belirlenmiştir. Dokuda meydana gelen bu hasar dolaylı olarak aktive olan nötrofillerce oluşturulur. Aktifleşen nötrofillerin MPO, elastaz, proteaz gibi enzim sentezledikleri ve serbest radikalleri açığa çıkardıkları gösterilmiştir (Sullivan et al., 2000). Bu nedenle karaciğer ve böbrek dokularında artan MPO seviyeleri, nötrofil birikimi ile MTX aracılı oksidatif organ hasarına katkı sağlamaktadır.

MTX aracılı oluşan karaciğer hasarı hem doz hem de tedavinin süresi ile ilgilidir. Bazı deneysel araştırmalarda yüksek doz MTX'in karaciğerde hasar oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu da büyük ihtimalle ilaca maruz kalma sürecinde sistemik toksisite ile baskılanma şeklinde açıklanabilir (Örneğin kemik iliği, mide-bağırsak hasarı gibi.) (Hall et al., 1991).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 20 mg/kg tek doz MTX'in, sistemik toksisite oluşturmaksızın, oksidatif stres yoluyla karaciğer ve böbrekte toksik etki oluşturduğu gösterilmiştir (Jahovic ve ark., 2003).

Kanser tedavisinde kullanılan yüksek doz MTX, akut böbrek yetmezliğine neden olabilir. Bu da MTX ve MTX metaboliti olan 7-Hidroksimetotreksat'ın renal tübüllerde çökmesi ile gerçekleşir. Bu olay myelosüpresyon, gastrointestinal toksisite, hepatit ve mokozyt gibi toksisite oluşumuna öncülük eder (Schornagel and Mcvie 1983).

2.3.3. Metotreksat ve Karaciğer Toksisitesi

Akut lösemilerin tedavisindeki gibi MTX'in aralıklı yüksek doz kullanımı veya psöriazisteki gibi uzun dönem MTX kullanımında progresif hepatik fibrosis ve siroza ilerleyebilen karaciğer hasarı oluşabilir. Düşük doz uzun dönem MTX tedavisi alan psöriazisli hastalardaki siroz gelişme riski %7'dir. Takip edilen hastaların

yaklaşık %8'inde transaminazların normalin üç katı kadar yükseldiği gösterilmiştir (Uraz ve ark., 2008). MTX'in neden olduğu toksisitenin, tedavinin süresi ve doz şeması, hastalığın tipi ve hastanın risk faktörleri ile birlikte genetik ve moleküler apoptotik faktörler gibi birçok faktörün etkileşimiyle oluştuğu düşünülmektedir (Çetinkaya ve ark., 2006).

Kronik MTX kullanımıyla ilgili karaciğer histolojisindeki temel yan etkiler, yağ infiltrasyonu, inflamasyon, hücresel nekroz ve sonuç olarak fibrozis'dir. Ancak, klinik ve biyokimyasal bulgular yıllarca sessiz kalabilir. Karaciğer toksisitesinin gösterilmesinin tek yolu karaciğer biyopsisidir ve genellikle MTX 10 yıl kullanıldıktan sonra ya da MTX toplam dozu 1,5-2,5 gramı geçtikten sonra önerilmektedir (Uraz ve ark. 2008).

MTX'in karaciğer hasar mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (Çetinkaya ve ark., 2006). MTX karaciğerde enzimatik bir sistem aracılığıyla ana ekstrasellüler metaboliti olan 7-hidroksimetotreksata dönüşür (Chladek et al., 1997). MTX hücre içinde poliglutamat şeklinde tutulur. MTX kullanımı ile hücre içindeki poliglutamat miktarı artar ve folik asit seviyeleri düşer. Bu durum karaciğer epitel hücrelerinde (hepatosit) nekroza sebep olur (Kamen et al., 1981). Ayrıca metotreksat püruvat dehidrogenaz, 2-oksogluterat dehidrogenaz ve sitozolik nikotinamid adenozin difosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazı baskılar. Glutatyon redüktaz enzimi NADP'yi reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucu bir antioksidan olan redükte glutatyon üretilmesinde kullanır (Babiak et al., 1998). MTX kullanımına bağlı olarak düşen NADP seviyeleri, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine (süperoksid anyonları, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hipoklorid radikalleri gibi) karşı duyarlılaştıran glutatyon seviyelerinin düşmesine ve bu da hepatosit hasarına neden olur (Uraz ve ark., 2008).

2.3.4. Metotreksat ve Böbrek Toksisitesi

Yüksek doz metotreksat kullanımının akut böbrek yetmezliğine neden olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda MTX'in yüksek dozda verilmesi serum kreatinin, üre ve hematüri seviyelerinde artışa yol açmaktadır. (Devrim ve ark. 2005)

Akut böbrek yetmezliği gelişmesi antineoplastik kemoterapi alan hastalarda sık görülen bir olaydır. Kemoterapinin tübüller üzerine doğrudan toksik etkisi ya da glomerüllerde harabiyete yol açması sonucu oluşur (Erkurt ve ark., 2009).

Bir araştırmada Metotreksat'ın proksimal tübül hücrelerinde birikerek Akut tübüler nekroz'a neden olabileceği belirtilmiştir (Fillastre and Godin 1998).

Erkurt ve arkadaşları Metotreksat'ın nefrotoksisite mekanizmasını; metotreksat kristallerinin distal tübüle çökmesi sonucu obstrüktif nefropati şeklinde açıklamışlardır (Erkurt ve ark., 2009).

Metotreksat ve ana metaboliti olan 7-hidroksimetotreksat'ın poliglutamat formu, ilaç verildikten bir yıl sonra dahi hepatositlerde saptanmıştır. Metotreksat ve 7-hidroksimetotreksat esas olarak böbrekler yoluyla atılır, bu nedenle özellikle böbrek fonksiyonu bozuk olan kişilerde metotreksatın toksik etkileri artabilir (Göğüş 2001).

Yüksek doz MTX tedavisi sonucu böbreklerde ortaya çıkan hasar mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Devrim ve arkadaşları MTX nedeniyle oluşan böbrek hasarlanmasında oksidatif stresin rolü olabileceğini ortaya koymuşlardır ve MTX alan sıçanların böbrek dokularında nitrik oksit seviyelerinde artış tespit etmişlerdir (Devrim ve ark., 2005). Yapılan son araştırmalarda Taurin ve L-karnitin gibi antioksidan bileşiklerin MTX'in neden olduğu böbrek hasarını azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak için ilacın antioksidan ajanlarla birlikte kullanılması gerekliliği öne sürülmektedir (Yılmaz 2008).

2.3.5. Metotreksat Toksisitesi ve Oksidatif Stres

Antikanser ilaçlarla yapılan toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerine dikkat çekilmektedir. Karaciğer, böbrek, ince barsak ve merkezi sinir sistemi üzerinde MTX'in yan etki mekanizması olarak oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (Miketova et al., 2005, Jahovic ve ark., 2004, Devrim ve ark., 2005, Uz ve ark., 2005). HeLa hücresi mitokondrisinde pirüvat dehidrojenaz, 2-okzogluterat dehidrojenaz ve nikotinamid adenindinükleotid (NAD) bağımlı enzimler ile sitozolik nikotinamid adenozin difosfat (NADP) bağımlı dehidrojenazın MTX tarafından

inhibe edildiği gösterilmiştir. Babiak ve ark. MTX'in HeLa hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutatyon seviyelerini azalttığını göstermişlerdir (Babiak et al., 1998).

Jahovic ve ark. 20 mg/kg tek doz intraperitoneal MTX uygulanan ratların kan, karaciğer, böbrek ve ince barsak dokularında glutatyon seviyelerinde azalma, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan MPO aktivitesinde artma ve MDA seviyelerinde belirgin bir artış olduğunu göstermişlerdir (Jahovic ve ark., 2004). Miyazono ve ark. da sıçanlarda MTX'in yan etkilerinden ince bağırsakta süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerinde artma, GSH seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince barsak hasarında oksidatif stresin önemli rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (Miyazono et al., 2004).

2.4. Oksidatif Stres

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (Janos and Krishnamurti 2005).

Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlerse hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) 'oksidatif stres' denir (Çavdar ve ark., 1997).

Dejeneratif hastalıkların gelişiminde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Nöronlar, yani sinir/beyin hücrelerindeki oksidatif stres kendini nörodegeneratif hastalıklar olarak göstermektedir (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, vb.). Damar iç yüzeyindeki hücrelerde (endotelde) oksidatif hasar damar sertliği (ateroskleroz) gelişiminde rol oynamakta, dolayısıyla kalp-damar, beyin-

damar ve diğ er damar hastalıklarına neden olmaktadır. Hücre DNA'sına gelen oksidatif hasar kanser gelişimine yol açabilmektedir. Hücre DNA'sına toksinlerin verdiği hasar kanser gelişimine yol açabilmektedir.(<http://www.androloji.org.tr>, Erişim tarihi: 25 Mayıs 2010).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur (Çavdar ve ark., 1997, Burçak ve Andican 2004). Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Çavdar ve ark., 1997, Burçak ve Andican 2004).

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna (O_2^-) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonu hızlandırırlar. Ayrıca katalazın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır (Çavdar ve ark., 1997, Burçak ve Andican 2004).

Serbest radikallerin atomlarında elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana

gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikaller, atomik yada moleküler yapılarında çiftlenmemiş tek elektron bölümleri olduklarından başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girerler ve "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri (ROP)" ni içerirler (Çavdar ve ark., 1997).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir (Çavdar ve ark., 1997, Burçak ve Andican 2004).

Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse hücre membran proteinlerini yıkararak, membran lipit ve proteinlerini yok ederek, hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engelleyerek, nükleer membranı geçip nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirerek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok edip bağışıklık sistemini zorlayarak vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler (Çavdar ve ark., 1997, Burçak ve Andican 2004).

2.4.1. Serbest Radikaller'in Hücrede Hasar Oluşturma Mekanizması

3 mekanizma mevcuttur:

- **Membran lipitlerinin peroksidasyonu:** Serbest radikaller hücrenin membranına saldırdıklarında gerçekleşir. Serbest radikaller, hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku bozulmalarına neden olurlar.

- **Disülfit bağ oluşumu:** Glutasyon, tüm memeli hücrelerinde milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Glutasyon (GSH) gibi tiyollerin R-SH oksidasyonu tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir (RSH) ve proteinlerdeki homolitik fisyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları disülfit bağı oluşturur. Bu da proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerini engeller.

- **DNA hasarı:** DNA molekülü yeniden sentezlenemeyen ancak kopyalanabilen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları, mutasyonlara ve genetik bozukluklara neden olmaktadır. Bu yüzden DNA hasarının ROS ile indüklenen hücrel modifikasyonların en ciddi olduğu düşünülmektedir. Oksidatif DNA modifikasyonları memeli DNA'sında siktir. Bu modifikasyonların kardinojenez, diyabet ve yaşlanmanın mekanizmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Özellikle peroksinitrit ve nitrojen oksit gibi reaktif nitrojen türleri DNA hasarına neden olmaktadır. Bununla birlikte dokularda oksidatif DNA düzeylerinin artmış düzeylerinin veya oksidatif modifiye nükleik asit ürünlerinin artmış ürünler atılımının insanlarda kanser gelişimini öngörebileceğine ilişkin epidemiyolojik kanıtlar mevcut değildir. Bu nedenle kanser gelişimi, yaşlanma ve diğer hastalıkların DNA oksidasyonu ile ilişkisini gösteren ileriki çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır (<http://www.androloji.org.tr>, Erişim tarihi: 25 Mayıs 2010).

2.4.2. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

- **Lipidlerde meydana gelen yapısal değişiklikler**

Plazma membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasara lipid peroksidasyonu denilmektedir (Akkuş 1995). Lipid peroksidasyonu, bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks bir olaydır. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (Akkuş 1995). Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehidlere dönüşürler. Bu aldehidler içinde en çok bilineni malondialdehid yani MDA'dır. Dolayısıyla bir dokuda MDA seviyesinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (Slater 1984).

Malondialdehid'in kendisi de üretildiği yerde iki yönlü hareket edebilir; hem dış ortama hem de hücrenin iç kısmına yönelebilir. Hücre içinde bir çok yapıya

zararlı etkileri vardır. Dolayısıyla serbest oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA da daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Hücre membranlarının lipid kısmının büyük çoğunluğu fosfolipid ve bunların yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinden oluşmuştur. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur.

- **Proteinlerde ve nükleik asitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler**

Serbest radikal etkilerine karşı protein ve nükleik asitler, poliansatüre yağ asitlerine göre daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır. Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (Kayalı ve Çakatay 2004).

2.5. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

Antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik antioksidanlar olarak iki ana gruba ayrılabilirler.

2.5.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

Glutasyon: Oksidatif stresin ölçümünde kullanılan antioksidandır. Redükte glutasyon (GSH) /okside glutasyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalır. GSH ve GSSG “high performance lipid chromatography” (HPLC) ve spektrofotometrik yöntemlerle tesbit edilir (Delogu et al., 2004). Glutasyon karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girip onları zararsız ürünlere çevirerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Proteinlerdeki sülfidril gruplarını da indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (Urso and Clarkson 2003).

S-adenozil metionin: Tüm hücrelerde metioninden sentezlenir. Hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rolü vardır. Antioksidan aktivitesi glutasyon prekürsörü olarak tanımlanmıştır (Caro and Cederbaum 2004).

E Vitamini: E vitamini tokoferol yapısındadır. Dört tipi vardır. α -tokoferol en fazla bulunan ve antioksidan etkisi en fazla olan şeklidir. E vitamini dokularda en

önemli zincir kırıcı antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki korunma mekanizmasıdır (Akkuş 1995). Membranların lipid kısmında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Hücre membranlarında O₂, OH⁻ gibi radikalleri inaktive eder ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (Miquel et al., 2006).

C vitamini: Ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalini doğrudan temizleme özelliği vardır (Miquel et al., 2006).

Seruloplazmin: Süperoksit dismutaz benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Demirin +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu inhibe eder. Bu sayede serbest radikal oluşmasını inhibe eder (Misso et al., 2005).

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir (Ayçiçek ve ark., 2005).

Ürik asit: Normal plazma konsantrasyonlarında süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini temizler (Misso et al., 2005).

Albümin: Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit ve hipoklorid toplayıcısıdır (Misso et al., 2005).

Bilirubin: Serbest radikal tutucusudur, süperoksit ve hidroksil radikal toplayıcısıdır (Ayçiçek ve ark., 2005).

Glukoz: Hidroksil radikal tutucusudur (Nakano et al., 1999).

Piruvat: Güçlü antioksidandır ve H₂O₂ bağlayıcı özelliği vardır (Zhou 2001).

Taurin: Yarı esansiyel bir aminoasittir. Lipid peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek antioksidan etkili olduğu gösterilmiştir. Taurin ratlarda MTX'in yol açtığı doku hasarını önlemiştir. Ksenobiotiklere bağlanma yeteneği vardır. Hipoklorit ile de reaksiyona girerek etkisini azaltır (Çetiner ve ark., 2005).

β-Karoten: A vitamininin prekürsörüdür. Hücre membranlarında bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere karşı doğrudan etki ederek onları inaktif hale getirir (Drisko et al., 2003).

Melatonin: Pineal bezden salgılanan indolamin yapısında bir hormondur. Yüksek lipofilik özelliği olup membranları kolaylıkla geçer. Melatonin antioksidan olarak özellikle OH⁻ radikalini ortadan kaldırmada çok etkilidir (Mollaoğlu 2003).

Sistein: Serbest radikal ve hipoklorid toplayıcısıdır (Akkuş 1995).

2.5.2. Enzimatik Antioksidanlar

Başlıca antioksidan enzimler; GSH-Px, Katalaz ve SOD'dur (Urso and Clarkson 2003).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan enzimdir. Hücre zarındaki fosfolipit hidroperoksitlerini alkole indirger (Spallholz 1990).

Tetramerik yapıdadır ve dört selenyum atomu içerir. Sitoplazmada ve mitokondriyonda bulunabilir (Blanco-Coronado et al., 1992). GSH-Px'in fagositoz yapan hücrelerde önemli işlevleri vardır.

Diğer antioksidanlarla birlikte, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositoz yapan hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde, oksidasyona yol açan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px'in enzim etkinliğindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. Aynı zamanda bu enzim, lipit peroksitlerinin indirgenmesini de katalizlemektedir (Rambabu and Rao 1994). Hücre zarına bağlı en önemli bağlı antioksidan olan E vitamini miktarı az olduğu zaman, hücre zarının peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (Spallholz 1990).

Glutasyon peroksidaz yapısında bir metal olan Selenyum'u bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Bu enzim, redükte glutasyonun okside glutatyona çevrildiği in vitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda H₂O₂'yi yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir. GSH'ın GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-Px enzimi H₂O₂'yi suya indirger. Daha sonra glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutasyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (Urso and Clarkson 2003).

Reaksiyon şu şekildedir:



(GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit).

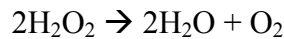
Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonda olması durumunda GSH-Px katalaza göre daha etkilidir (Halliwell 1974).

Katalaz

Katalaz enzimi, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Özellikle Hidrojen peroksit'in (H₂O₂) yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (Halliwell 1974). Okside edici enzimlerin etkisiyle ortamda oluşan hidrojen peroksiti doğrudan suya dönüştürür. Bu enzimin aktivitesi, ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonunun çok fazla arttığı durumlarda belirgin olarak artmaktadır.

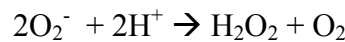
Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunun düşük olduğu hallerde ise hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdaki uzaklaştırırlar (Agar et al., 1986). Katalaz ve GSH-Px enzimleri, benzer etkisi olmasına rağmen hücre içindeki yerleşim yerleri ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. Katalaz enzimi peroksizomlarda daha etkili iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir.

Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



Süperoksit Dismutaz (SOD)

İlk defa 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz enzimi süperoksitin, hidrojenperoksit ve moleküler oksijene dönüşümünde görev alır. Reaksiyonun formülasyonu, şu şekildedir:



Bu reaksiyon ani olarak da gelişebilir fakat SOD tarafından katalizlendiğinde hızı 4000 kat artar. Bunlar, Cu ve Zn içeren izomerler bulundurur (Marklund 1990, Halliwell 1994).

Tek bir enzim değil, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit'e dönüşmesini katalizleyen enzim grubudur. Süperoksit dismutaz enzimi metal ihtiva ettiği için metalloenzim grubundandır. Hücreyi radikallerin etkisinden koruyan savunma mekanizması arasında SOD enzimi ilk rolü oynar.

SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürünün birikimi CAT enzimi tarafından önlenmektedir. (McCord and Fridowich 1969).

Bu enzim grubunun, canlıda bulunduğu bölgeye göre değişiklik gösteren üç farklı izoformu tespit edilmiştir.

1) Cu-Zn SOD: Bakır ve çinko iyonlarını içeren dimerik tiptir ve sitoplazmada bulunur. Siyanit, bu izoformun işlevini baskılar. Hücrede en fazla miktarda bulunan izomerdir.

2) Mn SOD: Mangan iyonu içeren tetramerik tiptir ve mitokondriyonda bulunur. Siyanit tarafından bloke edilmez.

3) Hücre Dışı SOD: Bu izoform, hücre zarındaki kollajene bağlanarak nötrofil ve diğer hücrelerden salınan süperoksitleri kontrol eder.

Enzimin fizyolojik işlevi, oksijeni katabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktır. Bu yolla, lipid peroksidasyonu engellenmiş olur (Niwa et al., 1990). SOD'un etkinliği, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda daha fazladır ve doku PO₂ artışına paralel olarak artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranlarda süperoksit üretimi olmasına rağmen, hücre içi süperoksit seviyeleri düşük tutulur. SOD'un hücre dışı etkinliği ise oldukça düşüktür (Lunec and Blake 1990). SOD, fagosit edilmiş bakterilerin hücre içi ortamda öldürülmesinde de rol oynar. Bundan dolayı, SOD granülosit işlevi için çok önemli bir enzimdir. Lenfositlerde, granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır (Kobayaski et al., 1977).

2.6. Nitrik Oksit

1987 yılına kadar insan vücudunda bulunuş nedeni ve metabolizması hakkında çok az bilgi bulunan NO'nun, 1991 yılından sonra yapılan bilimsel çalışmalar ile insan ve hayvanlar tarafından üretilebilmesinin ortaya konulmasıyla, bilimsel çalışmaların odağı haline gelmiş ve yapılan bu yoğun çalışmalar neticesinde 1992 yılında tanınmış bilim dergisi "Science" tarafından "yılın molekülü" seçilmiştir (Türköz ve Özerol 1997, Aladağ ve ark., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003).

Sonraki yıllarda NO'nun memeli hücrelerinden salgılanan biyolojik bir mediyatör olduğunu ortaya koyan ve bu konudaki önemli katkıları ve araştırmaları nedeniyle 1998 yılında Robert Fuchgott, Louis Ignarro ve Ferid Murad adlı üç bilim adamı Nobel Tıp Ödülüne layık görülmüşlerdir (Alderton ve ark., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003).

Nitrik oksit, 1987 yılında kan damarlarının asetilkolin uygulaması sonrasında endotele bağlı şekilde gevşemesinden sorumlu molekül olarak keşfedilmiştir (Palmer et al., 1987, Ignarro et al., 1987). Bundan kısa bir süre sonra, damar endotel hücrelerinden köken alan NO'nun L-arjinin amino asidinden sentezlendiği gösterildi (Palmer et al., 1988). NO, yarı ömrü birkaç saniye olan, hızla çözünebilen, reaktif ve gaz halinde bir moleküldür. Günümüzde NO'nun memelilerdeki dolaşım, sinirsel işlev ve savunma gibi bazı olayları ve sistemleri de içine alan fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer aldığı bilinmektedir (Wink and Mitchell 1998, Moilanen et al., 1999).

NO gaz tabiyatında bir molekül olup yağda çözünür ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer. Çok kısa yarılanma ömrüne (3-5 s) sahiptir. Basit kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen oldukça farklı ve zıt etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler çoğunlukla basit gibi görünen nitrik oksit kimyasının komplike doğasından kaynaklanır (Lancaster 2000).

Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekül özelliği kazanmaktadır (Türköz ve Özerol 1997).

NO'nun yarılanma ömrü diğer serbest radikaller gibi çok kısadır ve solüsyonlarda hızlı bir şekilde okside olarak NO₂ ve NO₃'e dönüşür. NO'nun düşük konsantrasyonlarda oksijene göre 3000 kat daha hızlı bir şekilde hemoglobine bağlanarak inaktif hale geldiği ve özellikle dolaşımdaki oksihemoglobinin NO için kuvvetli bir inhibitör olduğu bildirilmiştir (Türköz ve Özerol 1997, Özkan ve Yüksekol 2003). NO aynı zamanda serbest radikal süperoksit tarafından da inaktive edilmektedir. Süperoksidi bağladığı için NO'nun serbest radikalleri temizleyen koruyucu bir faktör olduğu düşünülmektedir. Böylece süperoksit dismutaz (SOD) gibi süperoksidi ortadan kaldıran enzimler NO'nun ömrünü uzatabilmektedirler (Kilbourn et al., 1997, Özkan ve Yüksekol 2003, Kuyumcu ve ark., 2004). Nitekim yapılan çalışmalarla L-arginin yokluğunda süperoksit üretiminin arttığı, L-arginin varlığında ise süperoksit üretiminin inhibe olduğu bildirilmiştir (Gölcük ve ark., 2003).

NO ile süperoksit reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit (ONOO⁻) güçlü ve yarılanma ömrü uzun bir oksidandır. Organizmada ONOO⁻, hidroksil radikali gibi davranan hidrosinitrite (HOONO) dönüşür. ONOO⁻'in parçalanması ile yüksek konsantrasyonlarda NO₂ oluşur. Bu reaktif nitrojen bileşikleri lipidler, DNA, tioller, amino asitler ve metallerle reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarını bozar, membran bütünlüğüne zarar verir ve DNA mutasyonuna neden olur. Bunların sonucunda lipid peroksidasyonu başlar (Kilbourn et al., 1997, Özkan ve Yüksekol 2003, Kuyumcu ve ark., 2004).

2.6.1. Nitrik Oksit'in Biyosentezi ve NOS'un İzofomları

Fonksiyonel olarak, NOS yapısal, konstitütif (cNOS) ve indüklenebilir (iNOS) formları şeklindedir. cNOS, Ca⁺² ve kalmodulin bağımlı bir enzim olup saniyeler içerisinde selektif agonist ile reseptör stimülasyonuna bağlı olarak NO'yu femtomolar ve pikomolar konsantrasyonlarda salıverirler. iNOS izoformu ise pretranslasyonel düzeyde düzenlenir ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interferon- γ ve interlökin 1- β gibi proinflamatuvar sitokinler ile indüklenir. iNOS indüklenmesinden birkaç saat sonra nM konsantrasyonlarda proinflamatuvar NO salıverir ve bu uzun süreli (saatler, günler) devam edebilir. (Forstermann et al., 1991, Filep et al., 1993)

cNOS ve iNOS arasında bazı önemli farklılıklar vardır. iNOS vasküler endotelial hücreler, düz kas hücreleri, makrofajlar ve farklı parankim hücrelerini içeren çeşitli hücrelerce eksprese ve aktive edilmektedir. İlk olarak cNOS aktivitesi hücre içi kalsiyum akışına bağılyken iNOS aktivitesi için istirahat halinde hücre içindeki kalsiyum miktarı yeterlidir. cNOS aktivitesi kalsiyum akışı ile tetiklendiğı için aktivite geçicidir ve az miktarda NO üretilir (pikomolar konsantrasyonda). Zıt olarak iNOS aktivitesi uzun sürer ve nanomolar düzeyinde NO oluşur (Moncada et al., 1991).

Konstitütif NOS (cNOS)

Bu izoenzim özellikle damar endotel hücreleri, idrar yolu hücreleri, santral ve periferel sinir sistemi hücreleri, endokard, miyokard, trombosit, mast hücreleri ve nötrofillerde bulunmaktadır. NOS, bu dokularda her zaman mevcuttur. Ancak aktif değildir. Aktif hale gelebilmesi için kalsiyuma (Ca^{2+}) ihtiyaç duyar. Enzimin kalsiyum-kalmodulin ile aktive olması nedeniyle kalsiyuma bağımlı NOS veya konstitütif NOS olarak adlandırılır (Atalık ve Doğan 1997, Türköz ve Özerol 1997, Alderton et al., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003).

Konstitütif NOS'un nöronlarda bulunanı nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve endotel hücrelerinde bulunanı endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) olarak adlandırılır (Atalık ve Doğan 1997, Aladağ ve ark., 2001, Alderton et al., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003, Özkan ve Yüksekol 2003, Kuyumcu ve ark., 2004). nNOS (NOS I) kromozom 12, eNOS (NOS III) kromozom 7 tarafından kodlanır. Ayrıca nNOS 161 kDa, eNOS 133 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Alderton et al., 2001, Bildik 2006).

Konstitütif NOS enzimleri çeşitli organ sistemleri için bazal seviyelerde gereklidir (Kuyumcu ve ark., 2004). nNOS sitoplazmik, eNOS zarsal enzimler olup aktiviteleri düşüktür. Bu enzimler dakikada miligram enzim başına pikomol seviyesinde NO sentezlerler (Kılınç ve Kılınç 2003). Sentez süresinin çok kısa olması, sentezlenen NO miktarının çok düşük olmasına neden olmaktadır. Çünkü hücre içi iyonize Ca konsantrasyonu azalmaya başladığı zaman, enzim inaktif forma geçerek NO sentezi durmaktadır (Atalık ve Doğan 1997, Türköz ve Özerol 1997).

Bu enzimlerin sentezi ve aktivitesi glukokortikoidlerden etkilenmez, ancak çeşitli L-arginin analogları tarafından inhibe edilebilmektedir (Kılınç ve Kılınç 2003).

İndüklenebilir NOS (iNOS):

iNOS enzimi özellikle makrofaj, nötrofil, hepatosit, monosit, damar endotel ile düz kas hücreleri, kalp kası hücreleri, nöronlar ve mikroglial hücrelerden sentezlenmektedir. Diğerlerinin aksine hücre içinde bulunmayan iNOS, endotoksin ve çeşitli sitokinler (IL-1, TNF, IF- γ) tarafından indüklenen ve indüklendiğinde daha uzun sürede ve büyük miktarlarda NO üreten, kalsiyumdan bağımsız bir enzimdir. Enzim bu özelliklerden dolayı indüklenebilir veya kalsiyumdan bağımsız NOS olarak adlandırılır. iNOS kofaktör olarak kalmodulin yerine tetrahidrobiopterine gereksinim duyar (Atalık ve Doğan 1997, Türköz ve Özerol 1997, Aladağ ve ark., 2001, Alderton et al., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003, Bildik 2006).

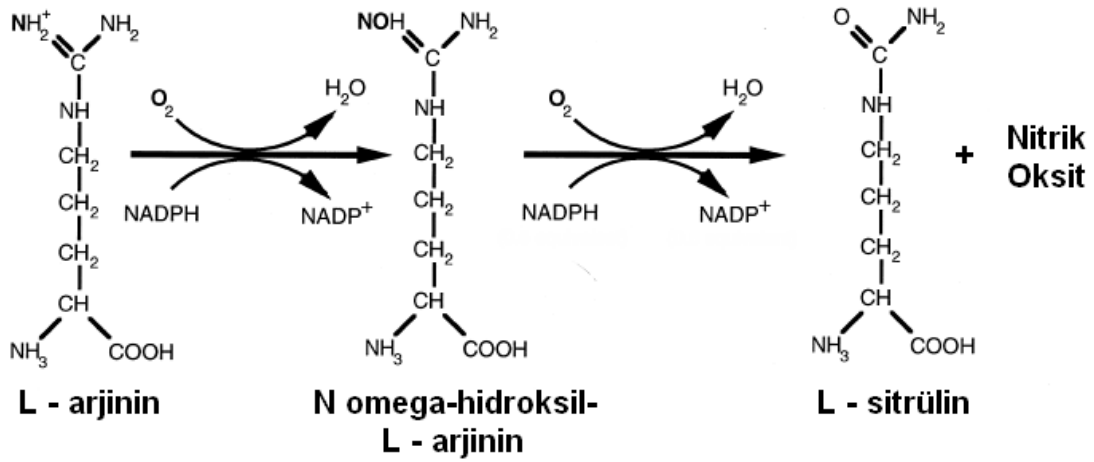
iNOS (NOS II) kromozom 17 tarafından kodlanır ve 131 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Alderton et al., 2001, Bildik 2006). Bu enzim sitoplazmik bir enzim olup aktivitesi yüksektir. Enzimin miligramı başına dakikada nanomol seviyesinde NO sentezlenir (Kılınç ve Kılınç 2003).

NO, L-argininden üç farklı Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. İşlevsel yönden etkin olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi, dimerik şekilde bulunur. Her üç NOS monomerinin molekül yapısında da, oksijenaz içeren bir N- terminal ucu ve kalmodulin tanıma bölgesine sahip bir C-terminal ucu vardır. Enzimlerin redüktaz bölgesinde NADPH, flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid gibi bazı kofaktörler için bağlanma bölgeleri bulunurken, oksijenaz bölgesinde hem ve tetrahidrobiopterin (BH₄) kofaktörlerinin yanı sıra, L-arginin için de bağlanma sahaları vardır (Janssens et al., 1992, Lowenstein et al., 1992, Charles et al., 1993, Alderton et al., 2001).

NO'nun L-argininden sentezlenmesi, iki farklı reaksiyonla gerçekleşir. NOS monooksijenasyon-I reaksiyonu denilen birinci basamakta, L-arginin NO sentezi için bir aracı olan N omega-hidroksil-L-arginine dönüşür. Bu reaksiyon için, NADPH ve oksijen gerekir. NOS monooksijenasyon-II reaksiyonu denilen ikinci basamakta, N omega-hidroksil-L-arginin bileşeni NO ve sitriline oksidize edilir. Flavin adenin

dinükleotid ve flavin mononükleotid, kalmodulin ve BH₄, bu süreçte kofaktör olarak görev yapar (Alderton et al., 2001 Bredt and Synder 1990, Mayer et al. ,1993, Bredt et al, 1991, Stuehr et al., 1991).

NOS enzimleri, üç ana gruba ayrılır. Bunlar nöron kaynaklı NOS (nNOS veya NOS1), endotel kaynaklı NOS (eNOS veya NOS3) ve uyarılabilir NOS (iNOS veya NOS2) şeklinde sınıflandırılmaktadır. NO sentez reaksiyonları temelde her üç NOS çeşidinde de aynıdır ancak NO üretiminin düzenlenmesi enzimler arasında farklılık gösterir.



Şekil 5. Nitrik oksidin L-arjinin amino asidinden sentezlenmesi.

Koçak (2008)'den modifiye edilmiştir.

Damar endotelinin yanı sıra merkezi ve periferik sinir sisteminde ilk keşfedilenler sırasıyla eNOS ve nNOS'tur. Günümüzde, bu enzimlerin çeşitli hücre ve doku tiplerinde üretildikleri bilinmektedir. NO'nun adı geçen NO sentazlar aracılığıyla üretilmesi, çoğunlukla enzim etkinliği seviyesinde düzenlenmektedir ve bu reaksiyonlarda, az miktarda NO üretilmektedir. Hücre içi kalsiyum iyon yoğunluğundaki değişiklikler, NO sentezinde anahtar bir role sahiptir. Endotel hücrelerindeki asetilkolin ve beyindeki glutamat gibi agonist maddeler, etkiledikleri reseptörler aracılığıyla kalsiyum iyonunda artışa yol açar ve bu yolla, NOS enzimlerini ve NO üretimini etkinleştirir. Kalsiyumdaki artış, eNOS ve nNOS gibi kalsiyuma bağımlı enzimlerde olduğu gibi kalmodulinin NOS molekülüne daha kararlı bir şekilde bağlanmasını sağlayarak, NO sentezini başlatır (Bredt and Synder 1990, Abu-Soud and Stuehr 1993). Her iki izoform da, kalp-damar ve sinir

sistemlerindeki fizyolojik süreçlerde yer almaktadır (Alderton et al., 2001, Moncada and Higgs 1995, Christopherson and Bredt 1997). Ayrıca, eNOS ve nNOS sentezi transkripsiyon seviyesinde de bir noktaya kadar düzenlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, nNOS üretiminin (ekspresyonunun) sinirsel faaliyet, steroid hormonları, iltihabi sitokinler ve bakteri türevi olan moleküller gibi çeşitli etkenlerce düzenlenebileceğini ortaya çıkarmıştır (Liu et al., 1996, Xu et al., 1996, Kleinert et al., 2000). Benzer şekilde, eNOS üretiminin düzenlenmesi de yerel çevresel şartlardan etkilenebilmektedir. Kan damarlarının, hücresel büyümenin, büyüme faktörlerinin, TNF- α 'nın (tümör nekroz faktörü alfa) ve hipoksinin yol açtığı etkilerin, eNOS üretimini yönlendirdiği bulunmuştur (Liu et al 1996, Kleinert et al., 2000, Le Cras et al., 1996, Alonso et al., 1997). Uyarılabilir NO üretimi, esas olarak iNOS ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla kontrol edilmektedir. iNOS istirahat halindeki hücrelerde tespit edilememektedir fakat bu enzimin ekspresyonu lipopolisakaritler, inflamasyona öncülük eden sitokinler, hipoksi ve yabancı DNA veya RNA gibi bazı unsurlar tarafından uyarılabilmektedir. iNOS, aralarında makrofajların, karaciğer epitel hücrelerinin, kondrositlerin, epitel hücrelerinin, mezangiyel hücrelerin ve düz kas hücrelerinin de olduğu çeşitli hücre tiplerince üretilmektedir.

iNOS uyarıldığı zaman, uzun bir zaman dilimi boyunca ve fazla miktarda NO üretimine yol açar. Bu yolla üretilen NO çeşitli patofizyolojik süreçlerle ilgili olup, antibakteriyel ve antiviral etkinlik, mitokondriyon solunumunun engellenmesi, protein nitrasyonu ve doku hasarlanmasının uyarılması gibi çeşitli olaylarla bağlantılıdır (MacMicking et al., 1997, Karupiah et al., 1993, Clementi et al., 1998, Boughton-Smith et al., 1993, Kooy et al., 1997). iNOS enzim etkinliğinin düzenlenmesi, eNOS ve nNOS'takinden farklıdır. Kalmodulinin iNOS'a sıkı bir şekilde bağlanmasına ve NO sentezi için gerekli bir molekül olmasına rağmen, iNOS'un etkinliği kalsiyum iyonlarından bağımsızdır (Ruan et al., 1996). iNOS eksprese edildikten sonra, birkaç saatten günlere kadar değişebilen zaman periyotları boyunca NO üretimine yol açabilir ve üretimin olduğu hücrelerde, programlı hücre ölümü anlamına gelen apoptoz olayını uyarabilir (Moilanen et al., 1999, Alderton et al., 2001, MacMiking et al., 1997). Ayrıca yapılan çalışmalarda ağız yoluyla etanol verilen fare karaciğerinde nekroz, inflamasyon ve yağlı dejeneratif değişikliklerin

görüldüğü, iNOS geni yönünden eksikliği olan (-/-) farelerde ise bu tür değişikliklerin meydana gelmediği bildirilmiştir (McKim et al., 2003).

Yakın geçmişte, NOS enzim polimorfizminin bazı klinik durumlarla bağlantısının olduğu öne sürülmüştür. iNOS promotör (öncül) geninde yer alan 954(G-C) bp bölgesinde görülen bir nokta mutasyonunun, sıtma hastalığına karşı korunma özelliğiyle bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Kun et al., 2001). eNOS ve iNOS genlerindeki polimorfizmler, kalp ve damar hastalıklarında sorumlu tutulmuştur (Wang and Wang 2000, Rutherford et al., 2001). Bunun yanında, nNOS genindeki polimorfizmin astım hastalığıyla ilgisinin olabileceği bildirilmiştir (Gao et al., 2000, Wechsler et al., 2000).

Nitrik oksit, renal kan akımı, renal otoregülasyon, glomerüler filtrasyon, renin salgılanması ve tuz ıtrahı gibi renal fonksiyonların kontrolünde en önemli parakrin modülatör ve mediyatördür. NO ayrıca diyabetik nefropati, inflamatuvar glomerüler bozukluk, septik şokta görülen akut böbrek yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği ilaçların nefrotoksik etkileri gibi birtakım böbrek bozukluğu durumlarında da önemli rol oynar. NO, bazen hemodinamik fonksiyonlarından dolayı faydalı olabilirken iNOS'tan salgılandığı durumlardaki yüksek miktarlarda zararlı olabilmektedir (http://www.tfd.org.tr/mersin_kitap.pdf. Erişim tarihi: 23 Mayıs 2010).

NO'nun böbrek dokusunda önemli görevlere sahip olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar neticesinde L-argininden sentezlenen NO'nun böbrek fizyolojisi ve patolojisinde önemli rolleri olduğu ortaya çıkarılmıştır (Can ve ark., 2000, Gabbai 2001, Klahr 2001, Kılınç ve Kılınç 2003, Sharma 2004).

Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda böbrekte NOS izoenzimlerinin her üç formunun da bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. Bunlardan eNOS renal damarlarda, glomerüler endotelial hücrelerde, proksimal tübüler hücrelerde, henle kulbunun çıkan kalın kolunda ve toplayıcı kanallarda, nNOS'un makula densa, toplayıcı kanalın prinsipal hücreleri ve renal pelvik sinirlerde bulunduğu tespit edilmiştir. iNOS ise proksimal tübüllerde, distal tübüllerde ve toplayıcı kanallardaki hücrelerde, kısaca makula densa ve damarlar hariç genel olarak geniş bir alanda bulunmaktadır (Star 1997, Weight and Nicholson 1998, Sharma 2004, Ghaznavi and Kadkhodae 2007).

Böbrekte eNOS GFR'nın düzenlenmesi, bölgesel damar basıncı ve renal kan akımı için önemli iken, nNOS tübüloglomerüler feedback ve renin salınması yoluyla glomerüler hemodinamiğin kontrolünde rol oynamaktadır.

Böbrek dokusunda iNOS fizyolojik şartlarda tübüllerde, patolojik durumlarda ise infiltre olan makrofaj ve glomerüler mezenşimal hücrelerde tespit edilmiştir. Ancak iNOS'un tübüllerdeki fizyolojik işlevlerinin hala açıklanamadığı bildirilmiştir (Cherla and Jaimes 2004).

Böbreğin epitelyal, mezenşimal ve endotelial hücrelerinden NO sentezlenmektedir. NOS enzimlerinin farmakolojik inhibitörlerinin kullanılması, böbrek dokusunda NO'nun fizyolojik ve patolojik rollerinin belirlenmesine büyük katkı sağlamıştır. Yapılan çalışmalarla böbrekte iNOS inhibisyonunun epitelyal hasarda azalma yaptığı ve renal fonksiyonlarda iyileşmeye yol açtığı, ancak eNOS inhibisyonunun ise epitelyal hasarı artırdığı bildirilmiştir (Sadovnikoff and Gelman 2000, Gabbai 2001).

Araştırmalarda NO seviyesinin yükselmesi veya iNOS aktivitelerinin artışının böbrekte eNOS aktivitelerini inhibe ederek renal vazokonstriksiyon ve GFR'de azalmaya yol açtıkları bildirilmiştir (Gabbai 2001). NO'nun arteriyel basıncı artırması tübüllere etki ederek Na^+ geri emilimini azaltan eNOS oluşumunun artmasına yol açar. NO'nun bu etkisini renin salınmasını azaltarak oluşturduğu tespit edilmiştir (Sireli ve ark., 2002).

NO'in septik böbrek yetmezliğinin patofizyolojisinde önemli rolleri vardır. L-NAME NOS'un genel inhibitörü, Aminoguanidin (AG) ise iNOS'un selektif inhibitörüdür. Nonselektif NOS inhibitörleri hem cNOS hem de iNOS'u bloke etmektedir. Böbrekte özellikle eNOS yoluyla üretilen NO, böbrek dokusunun fizyolojik fonksiyonlarının sürdürülmesi için oldukça önemlidir. Bu nedenle böbrek hastalıklarında eNOS inhibisyonunun zararlı olabileceği, iNOS inhibitörlerinin kullanılmasının daha uygun olacağı belirtilmektedir (Bremer et al., 1997, Turner et al., 1997, Cohen et al., 2001).

Sağlıklı hayvanlarda nonselektif NOS inhibisyonu afferent ve efferent arteriyollerde tonus artışına, GFR'nin azalmasına, hipertansiyona ve sonuçta ABY'ye neden olmaktadır. Bu sebeple nonselektif iNOS inhibitörlerinin renal

fonksiyonları daha da kötüleştirdiği söylenmektedir. Selektif iNOS inhibitörlerinin ise sepsiste GFR'yi koruyarak kan basıncını düzenlediği ve trombozu önlediği bildirilmiştir. (Gölcük ve ark., 2003).

Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir deneysel çalışmada, endotoksemide artan NO₂/NO₃ düzeyleri ve organ bozukluklarına karşı iki değişik dozda (50–150 mg/kg) uygulanan nonselektif NOS inhibitörü L-NAME'nin, artan NO₂/NO₃ düzeylerini anlamlı derecede düşürdüğü, gelişen karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluklarında ise belirgin bir etki oluşturmadığı gözlenmiştir. NO'nun selektif inhibitörü L-kanavanin kullanılmasının ise düşük (100 mg/kg) dozda serum NO₂/NO₃ düzeylerini daha da artırdığı, böbrek ve karaciğer işlevlerinin de bozulmasına neden olduğu, yüksek dozda ise (300 mg/kg) ölçülen parametrelerde olumlu bir etkinlik göstermediği belirlenmiştir (Özek ve ark., 2001).

Böbrekte glomerüler damarlardan cNOS salınımının, böbrekte kan akımının otoregülasyonunu sağlaması ve glomerüler kapiller basıncı azaltması nedeniyle koruyucu etkide bulunduğu, bununla beraber çeşitli sitokinlerin uyarımı ile iNOS tarafından aşırı NO salınımının ise zararlı etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Yang et al., 1998).

Glomerulonefritis oluşturulan farelerde içme suyuna 1 g/L dozunda AG verilen diğer bir çalışmada, AG verilen grupta glomerüler iNOS, idrar NO₂ üretimi ve glomerülosklerozezin derecesi ile proteinüri önemli derecede azalmıştır. Bu da AG uygulamasının glomerüler NO üretimini baskılaması nedeniyle glomerülosklerozezin ilerlemesini azalttığını göstermiştir. Scr seviyesinin kontrol ve AG grubunda (0.82±0.07–0.79±0.07 mg/dl) normal değerlerde olduğu saptanmıştır. İdrarda protein/kreatinin ve nitrit/kreatinin oranlarının AG ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Protein/kreatinin oranı kontrol grubunda 4.61±1.85 mg/mg, AG grubunda 0.25±0.03 mg/mg olduğu, nitrit/kreatinin oranı ise kontrol grubunda 99.9±16.5 µg/mg, AG grubunda ise 58.4±13.0 µg/mg olduğu belirlenmiştir (Yang et al., 1998).

Bremer ve arkadaşları, nefrotoksik nefritiste (NTN) NO'nun inhibisyonu ve glomerüler hasarda NO üretiminin rolü üzerine yaptıkları çalışmada, ratlara 5 mg/kg dozunda L- NAME ve 60 mg/kg dozunda AG vermişler ve her iki NOS

inhibitörünün de idrar ve böbrek NO₂ miktarını azalttığını belirlemişlerdir. İdrar NO₂ konsantrasyonunun NTN grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2. günde (2.19±0.64-0.59±0.08µmol/gün) önemli derecede arttığı, 4. günde (2.60±0.87-0.70±0.18) pik seviyeye ulaştığı ve 8. günde ise tekrar (0.62±0.11) azaldığı belirlenmiştir. Nefrotoksik nefritisli grupla karşılaştırıldığında NTN+L-NAME ve NTN+AG’li gruplarda idrar NO₂ atılımının önemli derecede azaldığı ve L-NAME ile AG verilmesinin idrar NO₂ atılımında önemli derecede azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. İdrar protein atılımının 2. günde önemli derecede artması ve çalışma süresince yüksek kalması, NO inhibisyonunun proteinüriyi azaltmaması ve proteinürinin açıkça NO üretimine bağlı olduğunu göstermiştir (Bremer et al., 1997).

Nitrik oksit’in karaciğerde birçok etkisi ve hücrel kaynağı vardır ve hepatosit hasarında aracı olabilir. NO, karaciğerin birçok hücresinde üretilir ve mikroorganizmalar, parazitler ve tümör hücrelerine karşı savunma mekanizmaları içinde bir “ikincil elçi” olarak görev alır. Fakat, literatürde NO’nun karaciğer hücre hasarının birincil bir aracısı mı yoksa hasar verici uyarıya karşı güçlü bir koruyucu mekanizma mı olduğu konusunda çelişkiler vardır (Işıksal 2003).

On yıl kadar önce, periferik arteriyel vazodilatasyonun sirozlu hastalardaki asit oluşumunun patofizyolojisinde önemli olduğu görüşü ortaya atılmıştır. Aynı zamanda, nitrik oksitin vasküler tonüsün düzenlenmesinde önemli rollere sahip olan potent bir vazodilatör olduğu bulunmuş ve NO’nun sirozlu hastalarda görülen hiperdinamik sirkülatuar durumdan sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Bundan sonra, çeşitli hayvan ve insan deneyleri ile, sirozda görülen hemodinamik değişikliklerde ve asit oluşumuna yol açan sodyum ve su retansiyonunda NO’nun çok önemli rolleri olduğunu gösteren deliller elde edilmiştir (Chatila et al., 2000). Sirozlu ratlarda ve asiti bulunan insanlarda plazma NO seviyesi de yükselmektedir (Chu et al., 1997, Campillo et al., 1996). Sirozlu hastalarda bu yükseliş bir çok farklı çalışmada gösterilmiş olmakla beraber klinik önemi ve sebebi net olarak saptanamamıştır. Akarsu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sirozlu hastalarda serum nitrit ve nitrat seviyeleri sağlıklı kontrol vakalarının serum nitrit ve nitrat seviyelerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (18.8 nmol/ml’e karşılık 2.87 nmol/ml). Aynı çalışmada, hem kompanse hem de dekompanse karaciğer sirozu bulunan hastalarda serum nitrit ve nitrat seviyeleri ile sistolik,

diyastolik ve ortalama kan basınçları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır (Akarsu ve ark., 1999).

Vücutta NO, inflamatuvar ve mitojenik uyarılara bir cevap olarak üretilir ve karsinogenezde rol oynayabilir. Ancak, hepatit C virüs kaynaklı hepatoselüler karsinomanın gelişiminde NO'nun rolü net değildir. Yapılan bir çalışmada kronik hepatit C'li 20 hasta, karaciğer sirozlu 30 hasta, hepatoselüler karsinomalı 22 hasta ve 8 sağlıklı kontrol vakasında plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ölçülmüştür.

Kronik hepatit C'li hastaların plazma nitrit ve nitrat seviyeleri sağlıklı kontrol vakalarının değerlerinden istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Yine, kronik hepatit C hastalarında alfa interferon tedavisi alanların plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ile tedavi almayanların değerleri arasında da anlamlı fark bulunamamıştır. Sirotik hastaların plazma nitrit ve nitrat seviyeleri kronik hepatit C'li hastalarinkine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş, ancak sirozun sebebi ile sonuçlar arasında ilişki bulunamamıştır. Hepatoselüler karsinomalı hastaların plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ise sirotik hastalarinkinden de yüksek olarak saptanmış, plazma NO seviyeleri ile serum alanin aminotransferaz seviyeleri arasında ise herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Oysa, plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ile serum alkalin fosfataz, bilirubin ve gama glutamil transferaz seviyeleri arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (Moussa et al., 2000). Bu bulgular karaciğer parankim hasarının NO yapımı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

2.6.2. NO ve Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyon yoluyla yıkılması işlemidir ve oldukça zararlı zincirleme bir reaksiyondur. Hücre zarında lipit peroksidasyonu yoluyla meydana gelen hasarlanma geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1994). Malondialdehit, reaktif oksijen türlerinin hücre zarıyla etkileşiminden kaynaklanan membran lipit peroksidasyonunun bir belirteci olup, membranda hasarlanmaya yol açarak, hücredeki yaşam dengesinin bozulmasına yol açabilir.

Hücre zarında hasarlanma, işlev bozukluğu ve hücreler arası neksus haberleşmesinin kaybı, kalsiyum ve diğer iyon taşıma sistemlerinin de kaybına yol açar (Stephen et al., 1997). Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin

peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen MDA meydana gelir. Bu reaksiyon, lipit peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. Lipit peroksidasyonu, çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan hücre zarı yapısını bozma ve dolaylı olarak da reaktif aldehitler üretme yoluyla, diğer hücre bileşenlerine zarar verir.

Peroksidasyonla oluşan MDA, hücre zarı bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu durum iyon taşınması, enzim etkinliği ve hücre yüzey bileşenlerinin birikimi gibi iç kaynaklı membran özelliklerini değiştirir.

Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (Drapper and Hadley 1990).

NO'nun, lipit peroksidasyonunu hem artırıcı ve hem de engelleyici bir yönü vardır. Nitrik oksit, lipit peroksil radikallerini yakalayıcı işlevi yönüyle lipit peroksidasyonuna ait zincir reaksiyonlarını önleyici etkiye sahiptir ve aynı zamanda, peroksidaz enzimleri gibi pek çok potansiyel tetikleyici unsurları da engelleyebilmektedir. Fakat ortamda süperoksidin bulunması durumunda, NO peroksinitrit sentezine yol açmakta ve lipit peroksidasyonunu başlatıcı etki göstermektedir (Hogg and Kalyanaraman 1999). Karbon tetraklorür'ün NO'yu engelleyen N^G-nitro-L-arjinin metil esteri ve aminoguanidinle birlikte verildiği bir çalışmada, NO'nun engellenmesinin karaciğerdeki oksidatif hasarlanmayı artırdığı bulunmuştur (Muriel 1998).

NO'nun ve onun süperoksitle girmiş olduğu reaksiyonun bir ürünü olan peroksinitritin (ONOO⁻), toksik hedef molekül reaksiyonlarına yol açtığı gösterilmiştir. Oldukça hızlı gerçekleşen bu reaksiyonda peroksinitrit oluşum hızı 6.7×10^9 L/mol/sn olup, difüzyon sınırlıdır (Hue and Padmaja 1993). Bu maddelerin üretimi, İnflamasyon veya diğer patolojik olaylar esnasında genellikle artmaktadır (Rubbo et al., 1994). Sonuçta, hücredeki proteinlerin tirozin kalıntılarının nitratlanması, hücrede işlev bozukluğuna ve ölüme yol açabilir (Beckman et al., 1993, Patel et al., 1999).

2.6.3. Nitrik Oksit Sentaz Enzim İnhibitörleri ve Önemleri

NO'nun salınması için gerekli olan L-arginin / NO yolu arginin ve sitrüllin aminoasit türevleri ile aminoasit yapısında olmayan çeşitli bileşikler tarafından inhibe edilebilmektedir (Aladağ ve ark., 2001, Alderton et al., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003). Argininin guanidin grubuna küçük kimyasal grupların takılması ile hazırlanan L-arginin analogları NOS enzimlerinin en geniş inhibitör grubunu oluştururlar. Bunun yanı sıra AG, alkil guanidinler, flavin ve kalmodulin antagonistleri, imidazol, fenilimidazoller, glukokortikoidler ve bazı antifungal ajanlar da NOS'u inhibe edebilmektedirler (Aladağ ve ark., 2001, Alderton et al., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003).

Başlıca önemli NOS inhibitörleri; L-NMMA, L-NAME, L-NIO, L-NNA, LNAA, N-metil-L-arginin (L-NMA), S-metil-L-tiyositrulin (L-SMTC), 7-nitroindazole (7-NI), N-iminoethyl-L-Lysine (L-NIL), L-2-chloropropionic asid (L-CPA), 1400W, ARL 17477 ve AG'dir (Atalık ve Doğan 1997, Kilbourn et al., 1997, Türköz ve Özerol 1997, Roussel et al., 2000, Aladağ ve ark., 2001, Alderton et al., 2001, Özkan ve Yüksekol 2003).

Tüm izoenzimlere etki eden NOS inhibitörlerinin uygun derişimlerde kullanıldığında, izoenzimler arasında kısmen de olsa bir seçicilikleri vardır (Aladağ ve ark., 2001, Alderton et al., 2001, Kılınç ve Kılınç 2003). Bu inhibitörlerden LNMMA, L-NAME, L-NMA ve L-NIO gibi bazıları her üç NOS izoenzimini inhibe etmektedir. Ancak eNOS ve nNOS enzimlerini inhibe etmeyen AG ise iNOS için oldukça seçici bir inhibitördür (Kilbourn et al., 1997, Alderton et al., 2001, Gölcük ve ark., 2003, Kılınç ve Kılınç 2003).

NOS inhibitörleri in vivo NO sentezini kontrol etmek amacıyla fizyolojik ve patolojik durumlarda da kullanılmıştır. Fizyolojik koşullarda inhibitörlerin kullanılması, NO bağımlı olayların inhibisyonuna neden olarak, NO'nun fizyolojik fonksiyonlarının tanımlanmasına yardımcı olur. Patolojik durumlarda kullanılması ise artan NO sentezinin toksik etkilerine karşı doku ve hücreleri koruduğu bildirilmektedir (Gabbai 2001, Kılınç ve Kılınç 2003).

Farklı NOS enzimleri normal koşullarda ve hastalıklarda, farklı dokularda farklı amaçlarla NO sentezlerler. Bu nedenle izoenzimlere özgül inhibitörlerin

kullanımı, hastalığın tedavisi sırasında komplikasyonlara neden olmaması açısından son derece önemlidir. Ayrıca NOS inhibitörleri NO sentezinin mekanizmasının ve koenzimlerin bağlama bölgelerinin tanımlanmasında da kullanılmıştır (Kılınç ve Kılınç 2003). Fizyolojik derişimin üzerinde NO sentezi her üç NOS izoenziminde de görülür. İzoenzimlere spesifik inhibitörlerin bulunması, bu inhibitörlerin klinikte tedavi amacıyla kullanılmasını daha güvenli duruma getirmiştir (Kılınç ve Kılınç 2003).

2.7. Aminoguanidin

Aminoguanidin (AG) ilk defa 1892 yılında nitroguanidin molekülünün indirgenmesi ile elde edilmiştir (Lieber and Smith, 1939). Temel yapısında bir guanidin parçası ve hidrazin grup ihtiva eder (Ou and Wolff, 1993; Jianmongkol et al., 2000). Bu molekülün en belirgin biyolojik etkisi diamin oksidaz enzimi üzerine olup, bu enzimi baskılayıcı rolü 1950 yılında rapor edilmiştir (Nilsson, 1999). Aminoguanidin'in diğer önemli biyolojik etkisi indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi üzerine olan baskılayıcı etkisidir (Mustafa et al., 2002; Sanha et al., 2004).

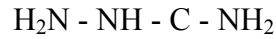
Aminoguanidin'in diyabet patogenezinde etkili olan artan glikozilasyon son ürünleri birikimini (advanced glycation end products, AGEs) engellemesi büyük ilgi uyandırmaktadır (Scaccini et al., 1994, Nilsson 1999, Burcham et al., 2002, Jedidi et al., 2003). Aminoguanidin'in deneysel olarak oluşturulan diyabet ile ilgili olarak, antioksidan özelliği göz önüne alındığında, damar ve sinir komplikasyonlarında iyileştirici etkisi gözlenmiştir (Nordberg and Arner 2001). Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada aminoguanidin verilen ratların vücut ağırlıklarının arttığı belirtilmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Atasayar ve ark., 2008).

Yapılan bazı hayvan çalışmaları Aminoguanidin'in karaciğerde toksik etkili olduğunu belirtmektedir (Arruda et al., 1992, Schuppe-Koistinen et al., 2002). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Asetaminofen'in tek başına karaciğerde lipid peroksidasyonu (LP) oluşturmadığı, Aminoguanidin ile birlikte verilen Asetaminofen'in ise karaciğerde lipid peroksidasyonunu belirgin olarak arttırdığı bulunmuştur (Hinson et al., 2002). Ratlar üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Sisplatin'in karaciğerde Malondialdehid seviyelerini arttırdığı; ancak

Aminoguanidin ile Sisplatin verilen ratların karaciğer MDA seviyelerindeki artışı engellediği belirtilmiştir (Atasayar ve ark., 2008). Yapılan araştırmalarla ilgili olarak, özellikle karaciğerde toksik etki oluşturan kimyasallar kullanıldığında; Aminoguanidin'in karaciğerde zararlı etkisinin olup olmadığının test edilmesi gerekliliği vurgulanmıştır. (Atasayar ve ark, 2008).

Kimyasal özellikleri ve tarihçesi

AG ilk kez 1892'de nitroguanidinin redüksiyonu ile elde edilmiştir. Kimyasal formülü CH_6N_4 şeklindedir. Yapısında % 16,21 C, % 8,16 H, % 75,62 N içermektedir (Lieber and Smith 1939). AG'nin ayrıca guanidine benzer bileşiklerin hidrasyonu veya hidrolizi ile sentezlenebileceği belirtilmiştir (Nilsson 1999). AG pek çok guanidin türevlerinden biri olmasına rağmen, benzer özellikleri nedeniyle hidrazilere benzetilmiştir ve sık sık hidrazin bileşikleri sınıfına sokulmaktadır (Lieber and Smith 1939, Nilsson 1999). AG kristal bir yapıya sahip olup, su ve alkolde çözünürken eterde çözünmez (Budavari et al., 1989). Güçlü bazik özellikte olan AG, açık havada kızarıp ısıtıldığında ise amonyak açığa çıkarır. Klorür ve sülfat tuzları suda çözünmektedir (Nilsson 1999).



Şekil 6. Aminoguanidin'in yapısı.

Eroğlu (2006)'dan modifiye edilmiştir.

AG yapısal olarak L-arjinin aminoasiti ile benzerlik göstermektedir. L-arjinin biyolojik olarak NOS'un katalitik etkisiyle oluşan nitrik oksidin oluşumunda önemli bir moleküldür (Budavari et al., 1989, Nilsson 1999).

Lieber ve Smith, ilk kez 1892'de Thiele tarafından sentezlenen AG ve türevlerinin patlayıcı olarak kullanılabileceğini açıklamışlardır. Ancak bu yayın hazırlandığında AG'nin biyolojik fonksiyonları konusunda bilinenler sınırlı olup, hayvan modellerinde kan basıncını, solunum hızı ve miktarını değiştirmesi ve pernisyöz anemi (B12 vitamini eksikliğine bağlı) benzeri kan tablosu oluşturması şeklindeydi. Biyolojik fonksiyonuna ilişkin fark edilen ilk bulgu, 1950'de biyolojik

diaminlerin (histamin, putreskin vb.) oksidatif deaminasyonunu katalizleyen diamin oksidazı (DAO) inhibe ettiğinin gösterilmesi olmuştur (Nilsson 1999).

Aminoguanidin'in antioksidan etkisi

Aminoguanidin'in ROB (reaktif oksijen bileşikleri) oluşumunu, hücre ve dokudaki lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, (Giardino et al., 1998, Jedidi et al., 2003) ayrıca H₂O₂ türevi hidroksil radikallerini süpürücü etkisiyle oksidanların indüklediği apoptoza karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Giardino et al., 1998, Mayuser et al., 1999).

AG'nin lipid peroksidasyonu (LPO) sonucu oluşan reaktif aldehidik yapıli bileşiklerle yarışmalı olarak reaksiyona girerek inaktive ettiği gösterilmiştir (Jedidi et al., 2003, Scaccini et al., 1994)

İmmünomodülatör bir ajan olan azatiyopirin (15 mg/kg, i.p.) uygulanan sıçanlarla yapılan bir çalışmada, karaciğer LPO ve ALT (Alanin aminotransferaz), AST (Aspartat aminotransferaz) düzeylerinde artış gözlenmiş, aynı çalışmada antioksidan olarak 100 mg/kg i.p. AG ve 100 mg/kg i.p. N-asetilsistein'in (NAC) bu artışı ortadan kaldırdığı görülmüştür. Çalışmada, AG'nin güçlü bir süperoksit ve hidroksil radikali süpürücüsü olduğu ve eritrositlerde güçlü bir MDA inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, azatiyopirin ile azalan GSH depolarının, AG ve NAC ile korunduğu belirtilmiştir (Raza et al., 2003).

AG'nin antioksidan özelliklerinin incelendiği diğer bir çalışmada, glikozla konjuge olmuş proteinlerin oluşturduğu serbest radikallerin LPO'ya neden olduğu ve AG'nin ileri glikozilasyon son ürünlerini (AGE) inhibe ederek de LPO'yu önlediği gösterilmiştir (Panagiotopoulos et al., 1998, Jedidi et al., 2003, Scaccini et al., 1994).

iNOS'un AG tarafından baskılanması

NOS inhibitörlerinin en önemli sınıfını arjinin analoglarının (N-metil, L-Arjinin, N-nitroarjinin) yanı sıra, hem aksiyal ligandları (CO, NO, imidazol) oluşturmaktadır (Katsumoto et al., 2003). AG, L-arjinine (NO substratı) yapısal olarak çok benzer olduğundan, iNOS'u L-kanavanin gibi diğer inhibitörler kadar inhibe edebilir (Raza et al., 2003, Mustafa et al., 2002, Nabekura 2003). Nitekim, Corbett tarafından, (Corbett et al., 1992) L-arjinin ve AG'nin kimyasal yapılarının

benzer olduğu (her iki kimyasal yapıda da eşdeğer guanidin azotu bulunur) ve AG'nin enzime substratı yerine geçerek yarışmalı olarak bağlanabileceği ileri sürülmüştür (Jianmongkol et al., 2000).

AG'nin iNOS'a olan seçiciliği bazı çalışmalarda kısıtlı olarak gösterilmiş ve hala tartışılmakta ise de çeşitli modellerde onaylanmıştır (Wolffenbuttel et al., 1993, Jianmongkol et al., 2000, Samel et al., 2003, Sanha et al., 2004, Abd El-Gavad and El-Sawalhi 2004). Köpek ve kemiricilerle yapılan çalışmalarla, AG'nin iNOS'u diğer NOS'lara göre 100 kat daha güçlü inhibe ettiği gösterilmiştir (Xiao-Ling et al., 2001). Yine yakın zamanda AG'nin selektif olarak iNOS inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (Al-Shabanah 2000, Wei et al., 2005, Jianmongkol et al., 2000, Sakaguchi et al., 2000, Sanha et al., 2004, Abd El-Gavad and El-Sawalhi 2004, Wang et al., 2005).

Aminoguanidin'in İleri Glikozilasyon Son Ürünleri (AGE) Baskılanması

Aminoasitlerin, peptitlerin ve proteinlerin amino gruplarının indirgenmiş şekerlerle enzimatik olmayan reaksiyonu, kompleks kahverengi pigmentler ve çapraz bağlı proteinlerin oluşumuyla sonuçlanır (Al Abed and Bucala 1997, Ulrich and Cerami 2001, Jakus and Rietbrock 2004). AGE türevi (AGE'den oluşan) bileşiklerin birikmesi hücre proteinlerinin yapı ve işlevlerinin değişmesi ve hücresel yanıtın uyarılması gibi bir dizi mekanizma ile hücre hasarına kadar varabilir. Pek çok çalışma glikoproteinlerden fizyolojik koşullarda reaktif oksijen radikallerinin oluştuğunu göstermektedir (Singh et al., 2001, Agardh et al., 2002). Küçük nükleofilik bir bileşik olan AG'nin de, reaktif karbonil bileşiklerince oluşturulan glukoz aracılı doku hasarı ve diyabetin küçük komplikasyonlarını önlediği gösterilmiştir (Picard et al., 1992, Imanaga et al., 2000, Lunceford and Gugliucci 2005, Liptakova et al., 2002, Yamauchi et al., 1997, Unlucerci 2001).

AG pimgedin olarak ta bilinir. AG, 3-DG, glioksal, metilglioksal ve glikozla konjuge olmuş proteinlerin α , β -dikarbonil grupları ile reaksiyona girerek, 3-amino-1,2,4-triazin türevlerini oluşturur (Thornalley et al., 2000). Dolayısıyla AGE'lerin oluşumunu önler (Al Abed and Bucala 1997, Scaccini et al., 1994, Miyoshi et al., 2002, Kumari et al., 1991, Miller and Gerrard 2005). AG'nin AGE oluşumunu inhibe ettiği *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilebilir olmasına rağmen bu reaksiyonun

kinetiği ile ilgili kısıtlı sayıda bilgi bulunmaktadır (Scaccini et al., 1994, Thornalley et al., 2000).

Diamin Oksidaz (DAO) Baskılanması

AG potent bir DAO inhibitörüdür (Baynes and Horpe 2000, Nilsson 1999, Mansour et al., 2002, Ou and Wolff 1993, Nilsson et al., 1999). DAO böbrek, adrenal bezi, bağırsak, plasenta ve timusta yüksek aktiviteye sahiptir (Eroğlu 2006). Enzimin karbonil gruplarına bağlandığı sanılmaktadır. Ayrıca enzimin substrat bağlama bölgesine bağlanabilir. Araştırmacılar, sıçan bağırsağında AG tarafından DAO inhibisyonunun nonkompetitif olduğu, ayrıca AG'nin gerçekleştirdiği inhibisyonun en az iki fazdan oluştuğu ve AG'nin enzimi yalnız inhibe etmediğini, inaktive de edebileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak, yine de AG'inn DAO inhibisyonu mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Nilsson 1999).

AG'nin Toksisitesi

Pek çok kaynakta, AG'nin yararlı biyolojik etkileri rapor edilmektedir. Örneğin, AGE oluşumunu inhibe ederek, diyabete bağlı retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonların gelişimini, tüm bunlara neden olan AGE oluşumunu önleyerek azalttığı gösterilmiştir (Arruda et al., 1992). AG'nin toksisitesi konusunda oldukça az bilgi bulunmakta ve toksisitesi kullanımını kısıtlamaktadır (Arruda et al., 1992).

Yapılan çalışmalarla AG'nin kemiriciler için LD50 değerinin 1800 mg/kg olduğu tespit edilmiştir (Ou and Wolff 1993, Arruda et al., 1992). Bu nedenle neredeyse nontoksik kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda subakut veya kronik toksisite göstermemesine rağmen AG'nin etkilerinin araştırılmasına devam edilmesi gerektiği düşünülmüştür (Ou and Wolff 1993). Bu düşünceye paralel olarak, asetaminofen hepatotoksisitesi üzerine iNOS inhibitörlerinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada asetaminofen, karaciğerde yalnız başına LPO'yu indüklemeyenken, aminoguanidinle birlikte verildiğinde LPO (MDA düzeyi) belirgin derecede artırmıştır (Hinson et al., 2002). Dölleniş tavuk yumurtalarına AG sülfatın enjekte edildiği bir çalışmada, yüksek mortalite oranı dışında, vücut ve karaciğerde gelişim geriliği ve dalak genişlemesi görülmüş, safra kesesinin oluşmadığı tespit edilmiştir (Sugiyama et al., 1986, Sugiyama et al., 1985). Genç fare ve sıçanlara intraperitoneal

olarak sırasıyla 750 mg/kg ve 500 mg/kg dozda AG sülfat uygulandığında letalitenin düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, tavuk embriyolarında ortaya çıkan eksternal anomaliler, kemirici fetüslerinde ortaya çıkmamıştır. Bu da kemiricilerde AG'nin metabolize edilmeksizin vücutlarından hızla dışarı atılmasına bağlanmıştır (Sugiyama et al., 1986). İlginç olarak bazı araştırmacılar, AG'nin diyabette glukoz tarafından proteinlerin metallerle indüklenen oksidasyon reaksiyonunda rol oynayan H₂O₂ oluşumunu artırarak protein oksidasyonuna katkıda bulunduğu, bunu aynı zamanda katalazı inhibe ederek de gerçekleştirdiğini belirtmiştir. Bu mekanizmaların AG'nin olası kronik toksisitesine ışık tutabileceği, fakat ileri araştırmalara gerek olduğu ifade edilmiştir (Scaccini et al., 1994, Ou and Wolff 1993).

Aminoguanidinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; i.p. 7.5 mg/kg sisplatin enjeksiyonu yapılan sıçanların serum üre ve kreatinin düzeyleri 2.5 ve 3.3 kat artış göstermiş, böbrek GSH düzeyleri de %21 gibi önemli bir oranda azalmıştır. Ayrıca, böbrekte GST, katalaz, GPx aktiviteleri de azalmış ve LPO göstergesi olan MDA düzeyleri önemli ölçüde artmıştır. Sisplatin enjeksiyonundan önce ve sonra 5 gün boyunca 100 mg/kg dozda aminoguanidin verilen sıçanlarda ise, serum üre ve kreatinin ve böbrek MDA düzeylerinde düşüş görülmüş ve sisplatinin nefrotoksik etkisine karşı aminoguanidinin koruyucu bir ajan olabileceği ileri sürülmüştür (Mansour et al., 2002)

Yapılan bir çalışmada Sisplatin uygulaması sonucu ilk gözlenen etki deney süresince hayvanların vücut ağırlıkları üzerine olmuştur. Aminoguanidin veya vitamin kombinasyonu uygulanan gruplarda, vücut ağırlıklarında hafif artışlar görülmüştür. Bu bulgu, sisplatin uygulamasını takiben deney hayvanlarının vücut ağırlıklarında azalma olduğunu gösteren çalışmaları desteklemektedir (Sueishi et al., 2002, Bogin et al., 1994).

Sisplatinin 7.5 mg/kg tek doz uygulandığı sıçanlarda eritrosit, plazma, böbrek ve karaciğer MDA düzeyleri kontrole göre önemli derecede artmıştır. Sisplatin ile birlikte aminoguanidin uygulandığında ise plazma, eritrosit, böbrek ve karaciğer MDA düzeyleri önemli ölçüde azalmıştır. Bu bulgular, aminoguanidinin sisplatinin oluşturduğu oksidatif stresi azalttığına ilişkin bilgileri destekler yöndedir

(Mansour et al., 2002). Sisplatin ile birlikte verilen E ve C vitaminleri de, plazma, eritrosit, böbrek ve karaciğer MDA düzeylerinde önemli düşüşler sağlamıştır.

Tüm bu etkilerine rağmen AG'nin diyabetik hastalarda kullanımında tereddütler de vardır. Çünkü AG'nin pridoksini bağlaması nedeniyle hayvanlarda uzun süre uygulamalarında vitamin B₆ eksikliği ve nörotoksisite geliştiği gösterilmiştir (Jakus and Rietbrock 2004). Ayrıca klinik tedavide AG'nin, gastrointestinal rahatsızlık, karaciğer fonksiyon testi anormallikleri, grip benzeri semptomlar ve nadiren vaskülit yaptığına dair yan etkileri rapor edilmiştir (Thornalley 2003).

AG'nin spermidin ve spermin gibi kompleks poliaminlerin sentezinde anahtar bir enzim olan S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC) enzimi üzerine de etkileri mevcuttur. AG'nin SAMDC enzimini stabilize ederek seviyesini arttırdığı fare lösemi hücrelerinin kültüründe gösterilmiştir (Stjernborg and Persson 1993, Svensson et al., 1997).

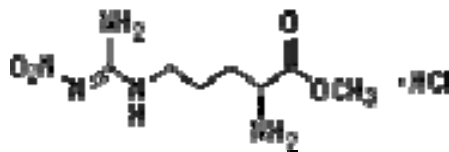
2.8. N^G-Nitro L-Arjinin Metil Ester (L-NAME)

L-Name metil ester yapısında, nonselektif, kompetitif NOS inhibitörüdür. Hem cNOS hem de iNOS'u inhibe ederek etki göstermektedir. NOS'un substratı olan arjininle benzer yapıdadır. L-NAME, NOS inhibitörü olarak bilinmesine rağmen, başta dopaminerjik sistem olmak üzere, başka birçok nörotransmitter sisteme de etki edebilir.

NOS inhibitörü olarak etkileri ilk gözlenen L-arginin analogu, yapısında metil grubu bulunduran N-monometil-L-arginindir (L-NMMA). L-arginin aminoasitinin yapısına çeşitli gruplar dahil edilerek değişik L-arginin analogları oluşturulmuş ve bunlarında nitrik oksit sentezi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. L-NMMA dışında L-nitro-L-arginin (L-NA), N-amino-L-arginin (L-NAA), N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) ve N-iminoetil-L-ornitin'dir (L-NIO). NO sentezini inhibe eden bu L-arginin analoglarından L-NIO sadece konstitütif izoformlara etki ederken, L-NAA, LNA, L-NMMA ve L-NAME hem konstitütif hemde indüklenebilen NOS izoformlarını inhibe ederler.

NOS inhibitörü olarak NO'nun septik şoktaki fizyolojik rolünün belirlenmesinden sonra NOS inhibitörlerinin kullanımı gündeme gelmiştir. Bu amaçla ilk olarak L-NAME gibi L-Arginin analogları kullanıldı. Başlangıçta hayvan çalışmaları olumlu gözükmiştir, ancak sonraki çalışmalarda elde edilen verilerin değişkenliği sorunu ortaya çıkmış bu da kullanılan hayvan modellerinin farklılığı ve uygulanan dozların çeşitliliğine bağlanmıştır (Kirkeby ve Strand 1996). Ancak NO'nun sepsiste önem kazanan vazodilatasyon, hipotansiyon, vazopresör ajanlara yanıtızlık, miyokard kontraktilitesinde bozulma gibi negatif etkilerine karşı, immun sistemde patolojik ajanlarla savaşması, organlarda mikroperfüzyonun düzenlenmesi, küçük arteriyollerde trombozun önlenmesi gibi yararlı özellikleri de vardır. Non selektif nos inhibitörleri ile yapılan Faz III klinik bir çalışmada bu ilaçların ortalama arteriel kan basıncını artırdıkları, sistemik damar direncini dramatik bir şekilde yükselttikleri ve kardiyak outputu düşürdükleri belirlenmiştir. Ancak hemodinamik düzelmeye rağmen hastalarda ölüm oranı %100 olmuştur (Gereulanos ve ark 1992). Klinik çalışmalar değerlendirildiğinde örneklem sayısı azlığı nedeniyle morbidite ve mortalite üzerine bu ilaçların etkisini değerlendirmek mümkün olamamıştır. Hatta bir hayvan sepsis modelinde L-NAME'nin yüksek dozlarda mortalitede artışa neden olduğu bildirilmiş ve bu ilaçların terapötik pencerelerinin darlığı belirtilmiştir (Nava ve ark 1992) . Septik şokta nitrik oksit ve NOS inhibitörlerinin etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için toksik olmayan, kısa etkili, dozu titre edilebilir nitelikte ve daha selektif iNOS inhibitörlerinin geliştirilmesi ve denenmesi gerekmektedir.

L-NAME bir L-arjinin analogu olup bütün cNOS (eNOS ve nNOS) izoformlarını (enzimlerini) benzer bir yolla inhibe eder. Aminoguanidin de bir L-arjinin analogudur, ancak sadece iNOS izoformu için inhibitör etki gösterir. L-NAME non selektif bir nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olup yapılan çalışmalarda iNOS baskılanmasında L-NAME'nin, Aminoguanidin ile aynı etkiye sahip olduğu cNOS baskılanmasında ise Aminoguanidin'in baskılayıcı etkisinin L-NAME'ye kıyasla 1/40 düzeyinde düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 7. L-NAME'nin yapısı (NG-Nitro L-Arjinin Metil Ester Hydrochloride).

Nadeem ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, oksidatif hasarın L-NAME gibi NOS inhibitörleri ve antioksidanların uygulanması ile düzelebileceği tespit edilmiştir (Nadeem et al., 2005). L-Name'nin hayvan deneylerinde iskemiye % 47 oranında azalttığı saptanmıştır ($p < 0.01$) (Tümer 2002). İskemi-reperfüzyon sonrası doku hasarında lipit peroksidasyonunun rolü birçok organa ait çalışmada bildirilmiştir. Serbest radikal süpürücüler reperfüzyon süresince OH^- iyonu ile indüklenen elektrofizyolojik değişiklikleri geciktirirler. Reperfüzyon uygulanan sıçan kalbinde, reperfüzyonu takiben 20 saniye içinde serbest oksijen radikalleri oluşurken, lipit peroksidasyonunun 10 dakika içinde olduğu rapor edilmiştir. Serbest radikallerin ortaya çıkmasından çok uzun zaman sonra membran hasarı ortaya çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada L-NAME ile tedavi edilen grupta, lipit peroksidasyonunun, kontrol düzeyine gerilediğini düşündürecek kanıtlar bulunmuştur (Fadıloğlu ve ark., 2001).

Connors ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, L-NAME'nin serbest radikallere bağlı doku hasarını azalttığını bulmuşlardır (Connors et al., 2005). Başka bir çalışmada L-NAME'nin yüksek dozda verilmesi, pulmoner arter basıncı ve pulmoner vasküler direncini artırdığı görülmüştür. Pulmoner vazokonstriksiyona bağlı olan bu durum, pulmoner hipertansiyona ve sonuç olarak sağ kalp fonksiyonlarında bozulmaya neden olmuştur. Ancak L-Name infüzyonu esnasında, pulmoner hipertansiyona rağmen, arteriyel oksijenasyonun arttığı saptanmıştır. Buna paralel olarak da V/P oranının düzeldiği ve şantların azaldığı görülmüştür (Avontuur et al., 1998).

Sıçanlarda oluşturulan bir iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde, kas dokusunda NOS aktivitesinin reperfüzyonun ikinci saatinden itibaren artmaya başladığı gösterilmiştir (Joneschild et al., 1999). NOS N-metil- arginin, L- nitro-L- arginin ve N-amino-L-arginin gibi L-arginin analoglarınca inhibe edilebilmektedir (Moncada 1992, Marsden et al., 1993). Bu işlem NO'nun biyolojik olaylardaki rolünü anlamak açısından önemli olabilir. Böylece NOS inhibitörlerinin hücrel hasarı engelleyebileceği gösterilebilir. Nitrik oksit sentaz enziminin inhibitörü olan N-nitro L-arginin metil ester ile yapılan çalışmalarda bu maddenin hücrelerde oluşan zararı azalttığı gösterilmiştir (Palmer and Vanucci 1993). L-NAME'nin reperfüzyondan 30 dakika önce ve reperfüzyondan 3 saat sonra verilmesiyle dokuyu

hasardan koruduğu gösterilmiştir (Huk et al., 1997). Ozaki ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları bir çalışmada iskemi-reperfüzyon sonrası yüksek oksijen düzeylerinin L-NAME uygulanması ile onlendiği bulunmuştur (Ozaki et al., 2002). Yapılan başka bir çalışmada fare gastroknemius kasında iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oluşan doku hasarı, dem ve myeloperoksidaz aktivitesi L-NAME ile onlenmiş ve NO'nun zararlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Knight et al., 1992).

İlk defa 1992 yılında iki ayrı araştırma grubu kronik NOS inhibisyonun yeni bir arteriyel hipertansiyon modeli olarak kullanılabilceğini bildirmiştir (Roberto and Baylis 1998). Bu bulgu NO'nun kan basıncının uzun dönem düzenlenmesinde gerekli olduğu verileriyle uyumludur. Sıçanlarda farklı dozlarda verilen NOS inhibitörünün hipertansiyona yol açmasının yanında yüksek dozları daha ağır hipertansiyona ve böbrek hasarına neden olur (Roberto and Baylis 1998). Bu verilerin değişik araştırmacılar tarafından doğrulanması kronik NOS inhibisyonun yeni bir arteriyel hipertansiyon modeli olarak yerleşmesini sağlamıştır. Sıçanlarda hipertansiyon oluşturmak için kullanılan ilk NOS inhibitörü bir L-arginin analoğu olan L-NAME'dir (Roberto and Baylis 1998, Gardiner et al., 1992). L-NAME'nin suda çözünmesi ve içme suyuyla kolayca hayvanlara verilebilmesi takip eden yıllarda bu modelin yaygın olarak kullanılmasına yol açtı. Bunun dışında L-NAME'nin intraperitoneal enjeksiyonuyla da sıçanlarda hipertansiyon oluşturulabilir (Sakuma et al., 1994).

alışmalarında sıçanlardaki L-NAME hipertansiyon modelini kullanan araştırmacılar bu inhibitörün değişik dozlardaki ve uygulama srelerindeki etkisini de incelemiştir. Araştırmalarda değişik kan basıncı değerleri saptanmasının yanında gözlenen net etki kan basınçlarını anlamlı olarak yükselten, uygulama süresi ve doza bağımlı bir etkidir. Fakat yinede aynı veya yakın yaştaki sıçanlara L-NAME'nin yakın dozlarının verilmesiyle çok benzer veriler elde edilmemiştir. Sıçanlarda aynı dozda uygulanan L-NAME farklı soylarda değişik hipertansif cevaplara yol açar. Bu farklı kan basıncı artışlarına rağmen kronik olarak uygulanan yüksek dozdaki L-NAME'nin daha büyük vasküler ve renal patolojilerin gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir (Roberto and Baylis1998, Gardiner et al., 1992, Sakuma et al., 1994).

Pinelli ve arkadaşları yaptıkları çalışmada L-NAME uygulaması ile plazma NO seviyesinde azalma, kolesterol ve kan basıncında artış, HDL miktarında azalma ve adezyon moleküllerinde artış belirtilmiştir. Kolesterol katabolizmasındaki azalmanın 7-hidroksilaz enzim aktivitesinin inhibisyonu sonucu olduğu belirtilmiştir. Düşük NO seviyelerinde adezyon moleküllerindeki artışın hiperkolesterolemi ile bağlantılı olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca azalan NO miktarının renin-anjiyotensin sistemini inhibe ettiği endotelin konstriktör etkisini harekete geçirdiği belirtilmiştir. L-NAME'nin muskarinik reseptör antagonisti olduğunun bilinmesi nedeniyle kan basıncındaki artışın asetilkolinin vazodilatasyon etkisinin inhibisyonu ile meydana geldiği belirtilmiştir (Pinelli et al., 2003).

Aminoguanidin ve L-NAME'nin NOS enzimleri üzerine olan baskılayıcı etki mekanizmaları, katalitik alanlarda demirin hem kısmına bağlandıklarını ya da L-arjinin ile yarışıl olarak bağlanma gösterdiklerini düşündürür (Dambrova et al., 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deneysel kısmı Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Yöntem

Çalışmada; 8-12 haftalık ortalama 250 gr ağırlığında 54 adet Wistar albino türü erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23°C) bulunduruldu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Deney süresince farelerin su ve yeme (Yem Kurumu Standart Fare Yemi) sınırsız erişimine (ad libitum) izin verildi. Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı ve tüm çalışma boyunca etik kurallara uyuldu.

Kullanılan Kimyasallar

Deney hayvanlarına uygulanan kimyasallar aşağıda belirtilmiştir.

- Metotreksat (Emthexate-S 50 mg 1 Flakon-MED İLAC)
- Aminoguanidin bikarbonat 97 %, Aminoguanidin-hydrogencarbonat, 97 %, Sigma
- L-NAME (N^G-Nitro L-arginine methyl ester) hydrochloride, Sigma

Deney Planı

Çalışmada her grupta dokuz sıçan (n=9) olmak üzere beş deney grubu ve bir kontrol grubu oluşturuldu ve toplam ellidört sıçan (n=54) kullanıldı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada sıçanlar 6 gruba ayrıldı. Grup-I (kontrol, n=9), Grup-II (MTX, n=9), Grup-III (MTX+AG, n=9), Grup-IV (MTX+L-NAME, n=9), Grup-V (AG, n=9) ve Grup-VI (L-NAME, n=9) olarak belirlendi.

Grup-I (kontrol grubu): Bu gruptaki sıçanlara serum fizyolojik (MTX volümüne ml/kg eşit olacak şekilde) tek doz ilk gün intraperitoneal olarak verildi.

Grup-II (20 mg/kg MTX verilen grup): Metotreksat ilk gün tek doz, 20 mg/kg intraperitoneal olarak (Yeğen ve ark., 2004) verildi .

Grup-III (20 mg/kg MTX ve 20 mg/kg AG verilen grup): Çalışmanın birinci günü metotreksat verilmeden bir saat önce aminoguanidin (serum fizyolojikte çözülmüş olarak) tek doz 20 mg/kg intravenöz (ketamin/ksilazinle hafif anestezi ile sıçanların lateral kuyruk venine) olarak verildi (Islas-Carbajal et al., 2005). MTX ise 20 mg/kg tek doz intraperitoneal yolla verildi.

Grup-IV (20 mg/kg MTX ve 3.5 mg/kg L-NAME verilen grup): Çalışmanın birinci günü metotreksat verilmeden bir saat önce L-NAME (serum fizyolojikte çözülmüş olarak) tek doz 3,5 mg/kg intraperitoneal olarak verildi (Saleh and El-Demerdash 2005). MTX, 20 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulandı.

Grup-V (20 mg/kg AG verilen grup): Çalışmanın birinci günü AG tek doz 20 mg/kg intravenöz uygulandı (MTX'ten bir saat önce).

Grup-VI (3,5 mg/kg L-NAME verilen grubu): Çalışmanın birinci günü L-NAME tek doz 3.5 mg/kg intraperitoneal olarak verildi (MTX'ten bir saat önce).

Deney başlangıcında ve beşinci gün (deneyin bitiminde) sıçanların ağırlıkları ölçüldü.

Tablo 1: Deney planı.

Deney Grupları	Hayvan Sayısı	Verilen İlaç Türü	Verilen Doz Miktarı	Süre
I	9	Serum fizyolojik	20 mg/ml	Tek doz
II	9	Metotreksat	20 mg/kg	Tek doz
III	9	Metotreksat+AG	20 mg/kg	Tek doz
IV	9	Metotreksat + L-NAME	(MTX) ve 20 mg/kg (AG) 20 mg/kg (MTX) ve 3,5 mg/k(LNAME)	Tek doz
V	9	Aminoguanidin	20 mg/kg	Tek doz
VI	9	L-NAME	3,5 mg/kg	Tek doz

İntraperitoneal olarak uygulanan % 10'luk ketamin, (Alfamin Alfasan IBV.) % 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında çalışmanın beşinci günü deney sonlandırıldı. Sıçanların median hattın yapılan insizyonla batinları açıldı ve histolojik ve biyokimyasal incelemeler için karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Karaciğer ve böbrek dokularının bir kısmı histolojik çalışmalar için % 10'luk nötral formaldehit içerisinde tespit edildi, geriye kalan kısımlar biyokimyasal incelemeler için alınarak cam tüplerdeki fosfat tamponuna konuldu ve çalışmalar yapılana kadar -20°C 'de saklandı.

Histolojik çalışmalar

%10'luk nötral formaldehit solüsyonunda immersiyon fiksasyon yöntemi uygulanarak tespit edilen dokular yıkama işleminden sonra aşağıda gösterilen işlemlerden geçirildi.

A) Dehidratasyon

Dokular dereceli alkollerde aşağıdaki sürelerde bekletildi.

Alkol derecesi	Süre
%50	→ 1 saat
%70	→ 1 saat
%80	→ 1 saat
%90	→ 1 saat
%96	→ 1 saat
%100	→ 1 gece

B) Şeffaştırma

Ksilolde yaklaşık 5 dakika

C) Emdirme

Ksilol+parafin (60°C etüvde) 15 dakika

Yumuşak parafin (60°C etüvde) 1 saat

Sert parafin (60°C etüvde) 4 saat

D) Gömme

Sert parafin kullanılarak dokular bloklandı.

Hazırlanan parafin bloklardan, Leica marka kızaklı mikrotom kullanılarak 4-5 µ (mikron) kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlara Hematoksilen- Eozin ile rutin boyama yapıldı. Boyanan rnekler Olympus BX50 tipi binoküler mikroskopta incelendi ve fotoğraflar elde edilerek değerlendirildi.

Biyokimyasal alışmalar

Karaciğer ve böbrek doku numuneleri, kanın uzaklaştırılması amacıyla önce soğuk distile su ile yıkandı. Daha sonra, doku örnekleri 150 ml'lik soğuk potasyum fosfat tamponu içine alınarak -20 °C'de muhafaza edildi. Derin dondurucudan çıkarılan karaciğer ve böbrek doku örnekleri, buzlarının çözülmesinin ardından üç kez soğuk distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurulandı. Kurulanan karaciğer ve böbrek doku örnekleri tartılarak, hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde fosfat tamponu içine alındı ve buz üzerinde homojenizatrle 16,000 devir/dk hızında iki dakika boyunca homojenize edildi. Elde edilen homojenatlardan, TBARS lm yapıldı (Drapper and Hadley 1990).

TBARS lm

Deneyin ilkesi: MDA seviyelerinin lm, Draper ve Hadley'in metoduna göre yapıldı (Drapper and Hadley 1990). Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehid, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm'de en üst seviyede dalgaboyu emilimine yol açan renkli bir kompleks oluşturur.

Doku örneklerindeki lipit peroksidasyon seviyeleri, tiobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) yoğunlukları ölçülerek tespit edildi (Drapper and Hadley 1990).

TBARS lm için, 2.5 ml yüzde 10'luk TCA (Trikarboksilik asit) ve 1 ml yüzde 0.67'lik TBA (Tiobarbitürik asit) reaktifleri kullanıldı. Homojenat, 15 dakika kaynar suda bekletildi ve daha sonra, 5000 devir /dk'da 10 dakika boyunca santrifüje edildi. 2 ml süpernatant alınıp, 15 dakika kaynar suda bekletildi ve hemen soğutuldu. 532 nm'de numune yerine distile su konularak, hazırlanan krve karşı absorbansları okutuldu. MDA-TBA (TBARS) kompleksinin 532 nanometredeki ekstrinksiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) yola çıkılarak, nmol / ml cinsinden MDA

değeri bulundu. Lowry ve arkadaşları tarafından kullanılan yöntem ile elde edilen sonuçların ml'deki protein miktarına bölünmesi yoluyla, nmol / mg protein cinsinden TBARS değeri bulundu (Lowry et al., 1951).

İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel değerlendirmeler "SPSS 15.0 for Windows" paket programı kullanılarak yapıldı. Histolojik bulguların analizinde gruplar nonparametrik testlerden "Kruskal - Wallis testi" ile karşılaştırıldı ve iki grup arasındaki ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında "Mann - Whitney U testi" kullanıldı. Anlamlılık değeri $p < 0.01$ olarak alındı.

4. BULGULAR

Sıçanlardaki ağırlık değişiklikleri

Deney sonucunda gruplarda yer alan sıçanların ortalama ağırlıkları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($p>0,01$). Sıçanların çalışmaya başlamadan ve kesim öncesi ortalama ağırlıkları (aritmetik ortalama ile) tabloda gösterilmiştir.

Tablo 2: Çalışma öncesi ve çalışma sonrası sıçanların ortalama ağırlıkları.

Gruplar	Grup açıklaması	Çalışma öncesi ağırlık (g)	Çalışma sonrası ağırlık (g)
Grup-I	Kontrol	271	282
Grup-II	MTX	308	303
Grup-III	MTX+AG	253	244
Grup-IV	MTX+L-NAME	269	261
Grup-V	AG	270	277
Grup-VI	L-NAME	226	237

Histolojik Bulgular

Kontrol grubu ve deney grubuna ait karaciğer ve böbrek doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirildi (Abdel-Wahhab et al., 1999). Gruplar arasında gözlenen değişikliklerin “p” değerleri aşağıda verilmiştir.

DeneySEL parametrelerin histolojik (yapısal) değerlendirilmesi skorlandı.

(-) skor (negatif skor): Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,

(+) skor (1 pozitif skor): Hafif derecede,

(++) skor (2 pozitif skor): Orta derecede,

(+++) skor (3 pozitif skor): Ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

Deney sonucu kontrol grubunda yer alan sıçanların karaciğerinde bu organa özgü histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmadı.

MTX grubunda yer alan sıçanların karaciğerinde belirgin olarak hepatositlerde granüler dejenerasyon, parankim ve perivasküler bölgelerde inflamatuvar hücre infiltrasyonları, vasküler konjesyon, sinuzoidal dilatasyon ve düşük seviyede piknotik çekirdekler gözlemlendi. MTX+AG grubunda yer alan sıçanların karaciğerinde düşük seviyede hepatositlerde granüler dejenerasyon, parankim ve perivasküler bölgelerde inflamatuvar hücre infiltrasyonları ile vasküler konjesyon gözlemlendi. MTX+L-NAME grubunda yer alan sıçanların karaciğerinde düşük seviyelerde hepatositlerde granüler dejenerasyon, parankim ve perivasküler bölgelerde inflamatuvar hücre infiltrasyonları ve vasküler konjesyon gözlemlendi. Aminoguanidin grubunda yer alan sıçanların karaciğerinde herhangi bir yapısal değişikliğe rastlanmadı. L-NAME grubunda yer alan sıçanların karaciğerinde de herhangi bir yapısal değişikliğe rastlanmadı.

Tablo 3: Kontrol ve deney gruplarında karaciğerde gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskal-Wallis p değerleri.

Deney grupları	Grup-I (Kontrol)	Grup-II (Mtx)	Grup-III (Mtx+Ag)	Grup-IV (Mtx+L-name)	Grup-V (Ag)	Grup-VI (Lname)	Kruskall- Wallis P Değerleri
Parametreler/Skor	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	
Granüler dejenerasyon	9 0 0 0	- 0 0 0 9	+++ 0 7 2 0	+ 0 8 1 0	+ 8 0 0 0	- 9 0 0 0	p<0,01
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	9 0 0 0	- 0 0 0 9	+++ 0 6 3 0	+ 0 7 2 0	+ 8 0 0 0	- 9 0 0 0	P<0,01
Vasküler konjesyon	9 0 0 0	- 0 0 8 1	++ 0 8 1 0	+ 0 8 1 0	+ 8 0 0 0	- 9 0 0 0	P<0,01
Sinuzoidal dilatasyon	9 0 0 0	- 0 6 2 1	+ 9 0 0 0	- 9 0 0 0	- 8 0 0 0	- 9 0 0 0	P<0,01
Piknotik çekirdekler	9 0 0 0	- 0 9 0 0	+ 9 0 0 0	- 9 0 0 0	- 8 0 0 0	- 9 0 0 0	P<0,01

Tablo 4: Gruplar arasında karaciğerde gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri.

Gruplar	Granüler dejenerasyon	İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	Vasküler konjesyon	Sinuzoidal dilatasyon	Piknotik çekirdekler
Grup I-II	p<0,01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup I-III	p<0.01	p<0.01	p<0.01	AD	AD
Grup I-IV	p<0.01	p<0.01	p<0.01	AD	AD
Grup I-V	AD	AD	AD	AD	AD
Grup I-VI	AD	AD	AD	AD	AD
Grup II-III	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup II-IV	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup II-V	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup II-VI	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup III-IV	AD	AD	AD	AD	AD
Grup III-V	p<0.01	p<0.01	p<0.01	AD	AD
Grup III-VI	p<0.01	p<0.01	p<0.01	AD	AD
Grup IV-V	p<0.01	p<0.01	p<0.01	AD	AD
Grup IV-VI	p<0.01	p<0.01	p<0.01	AD	AD
Grup V-VI	AD	AD	AD	AD	AD

AD: Anlamlı değil

Deney sonucu kontrol grubunda yer alan sıçanlara ait böbrek doku kesitlerinin histolojik incelenmesinde, bu organa özgü histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. MTX grubunda yer alan sıçanların böbreğinde belirgin olarak proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, parankimde inflamatuvar hücre infiltrasyonları, vasküler konjesyon ile düşük seviyelerde proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon gözlemlendi. MTX+AG grubunda

yer alan sıçanların böbreğinde düşük seviyelerde vasküler konjesyon ile proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon gözlemlendi. MTX+L-NAME grubunda yer alan sıçanların böbreğinde düşük seviyelerde vasküler konjesyon ile proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon gözlemlendi. Aminoguanidin grubunda bulunan sıçanların böbreğinde yapısal değişikliğe rastlanmadı. L-NAME grubundaki sıçanlara ait böbrek doku kesitlerinde de herhangi bir yapısal değişikliğe rastlanmadı ($p<0,01$). AG ve L-NAME'nin böbrekte de benzer etkide buldukları gözlemlendi.

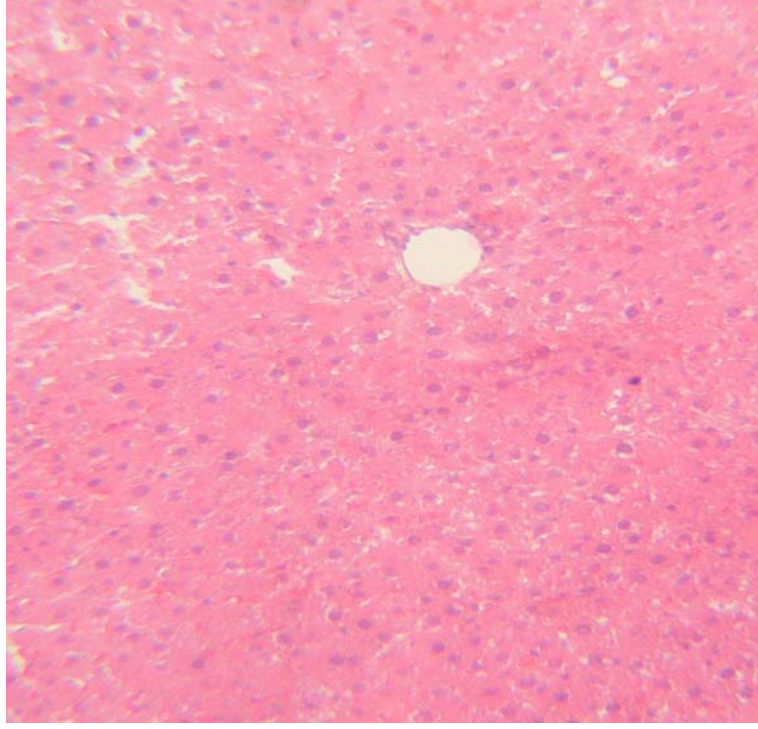
Tablo 5: Kontrol ve deney gruplarında böbreklerde gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskal-Wallis p değerleri.

Deney grupları	Grup-I (Kontrol)	Grup-II (Mtx)	Grup-III (Mtx+Ag)	Grup-IV (Mtx+L-name)	Grup-V (Ag)	Grup-VI (Lname)	Kruskall- Wallis P Değerleri
Parametreler/	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	- + ++ +++ O	
Skor							+
Hidropik dejenerasyon	9 0 0 0	- 0 0 0 9	+++ 0 7 2 0	+ 0 9 0 0	+ 8 0 0 0	- 9 0 0 0	- $P<0,01$
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	9 0 0 0	- 0 8 1 0	+ 9 0 0 0	- 9 0 0 0	- 8 0 0 0	- 9 0 0 0	- $P<0,01$
Vasküler konjesyon	9 0 0 0	- 0 0 0 9	+++ 0 8 1 0	+ 0 9 0 0	+ 8 0 0 0	- 9 0 0 0	- $P<0,01$
Tübüllerde dilatasyon	9 0 0 0	- 0 9 0 0	+ 8 1 0 0	- 7 2 0 0	- 8 0 0 0	- 9 0 0 0	- $P<0,01$

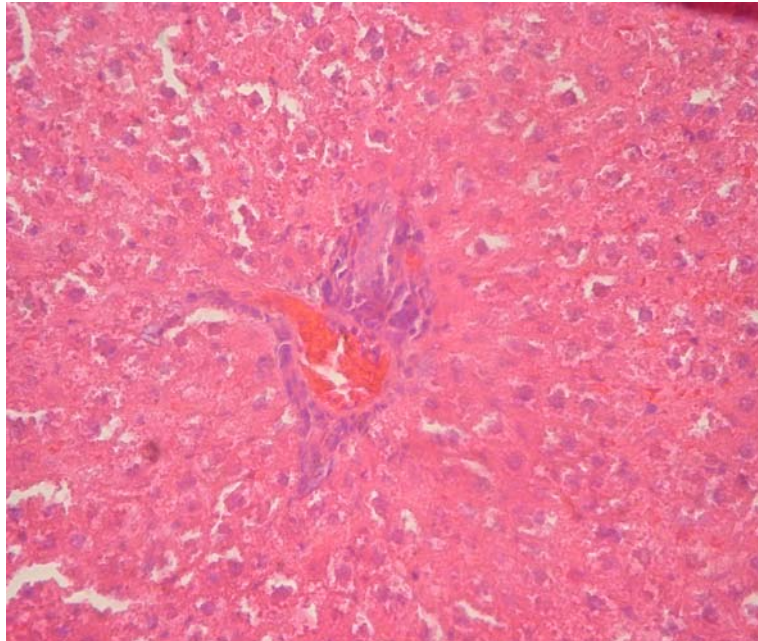
Tablo 6: Gruplar arasında böbreklerde gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri.

Gruplar	Hidropik dejenerasyon	İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	Vasküler konjesyon	Tübüllerde dilatasyon
Grup I-II	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup I-III	p<0.01	AD	p<0.01	AD
Grup I-IV	p<0.01	AD	p<0.01	AD
Grup I-V	AD	AD	AD	AD
Grup I-VI	AD	AD	AD	AD
Grup II-III	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup II-IV	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup II-V	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup II-VI	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
Grup III-IV	AD	AD	AD	AD
Grup III-V	p<0.01	AD	p<0.01	AD
Grup III-VI	p<0.01	AD	p<0.01	AD
Grup IV-V	p<0.01	AD	p<0.01	AD
Grup IV-VI	p<0.01	AD	p<0.01	AD
Grup V-VI	AD	AD	AD	AD

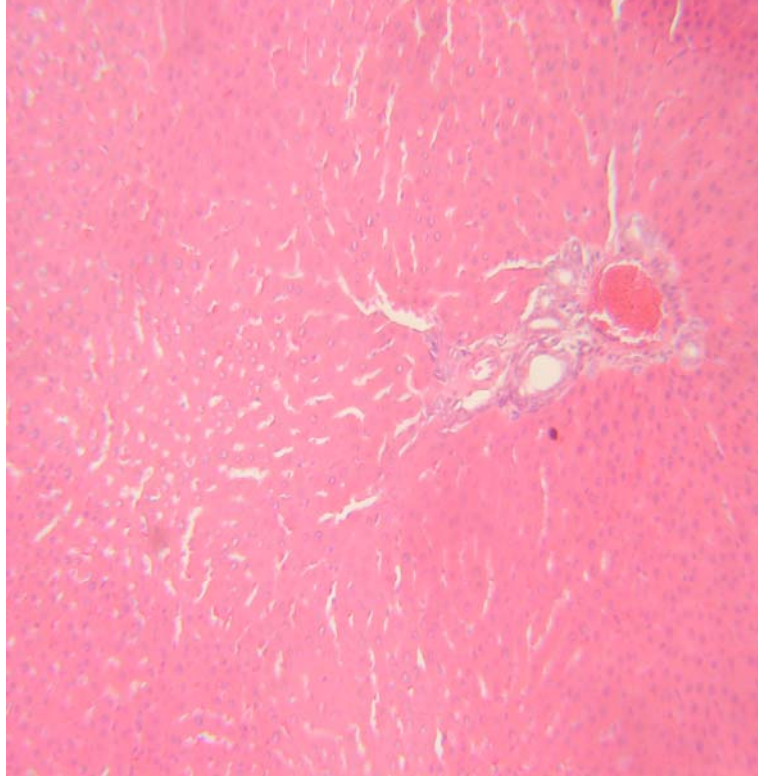
AD: Anlamlı değil.



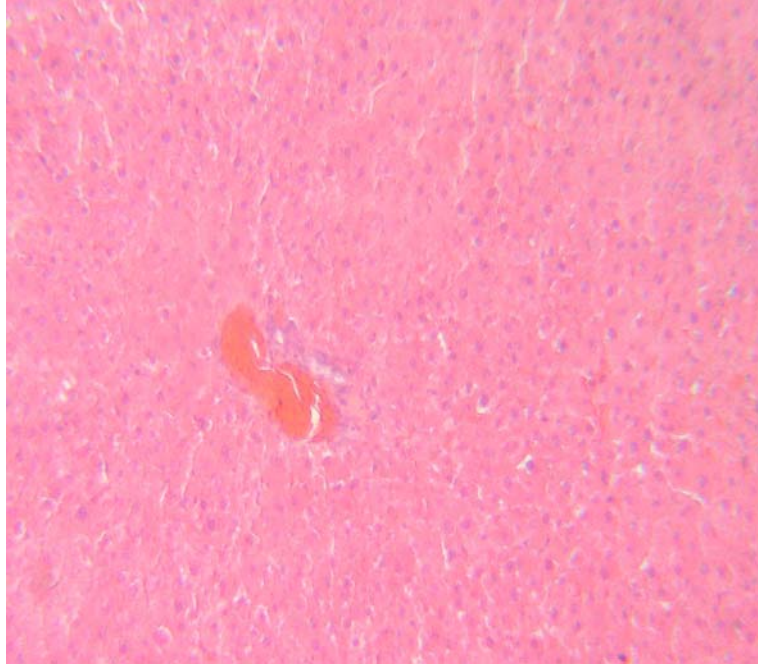
Resim 1: Kontrol grubuna (Grup-I) ait normal karaciğer dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (hematoksilen-eozin, x240).



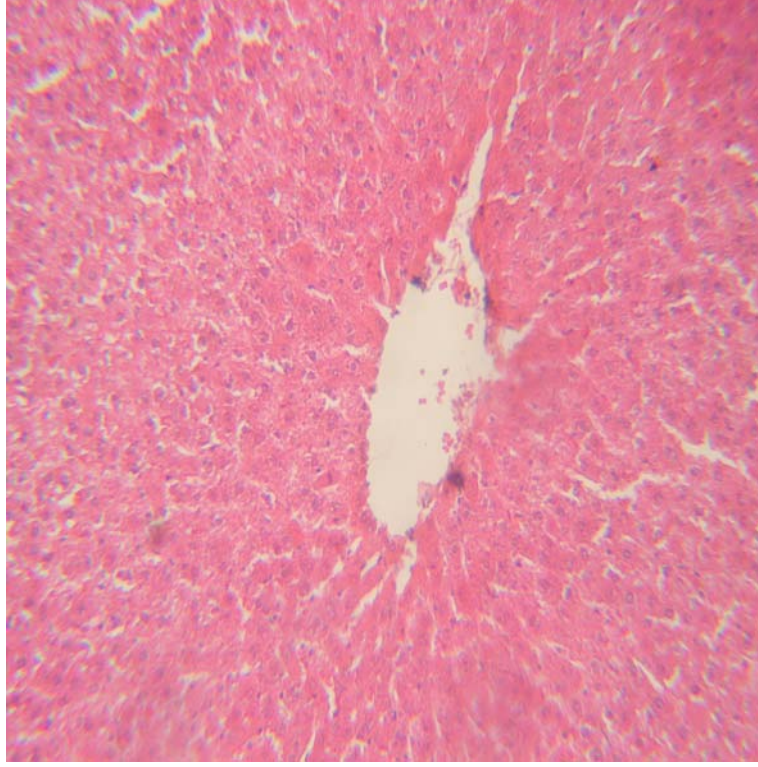
Resim 2: Grup-II'ye ait (20 mg/kg Metotreksat uygulanan) karaciğer dokusu. Belirgin olarak hepatositlerde granüler dejenerasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vasküler konjesyon gözlenmekte (hematoksilen-eozin, x480).



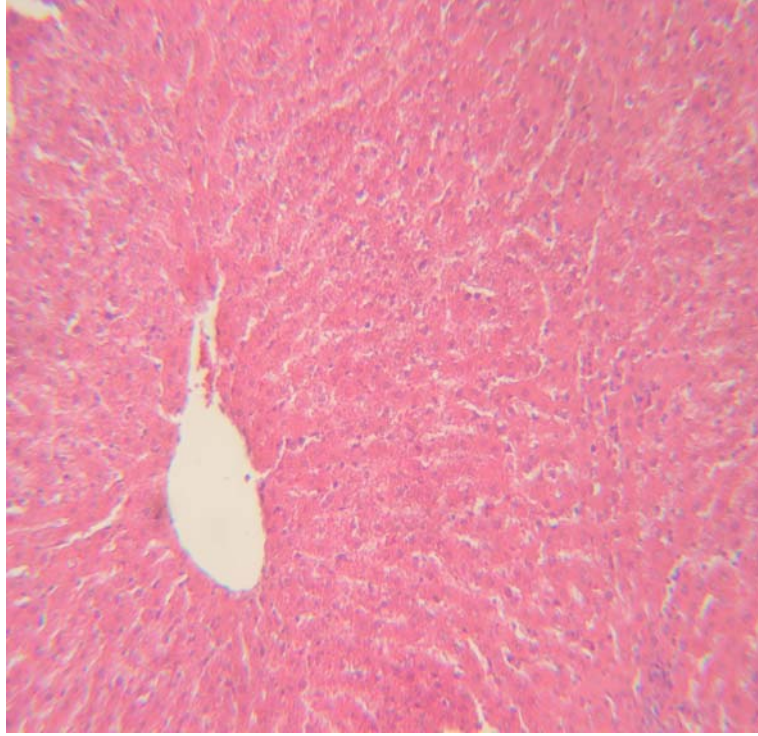
Resim 3: Grup-III'e ait (20 mg/kg MTX ve 20 mg/kg Aminoguanidin uygulanan) karaciğer dokusu. Hepatositlerde düşük düzeylerde granüler dejenerasyon görülmekte (hematoksilen-eozin, x240).



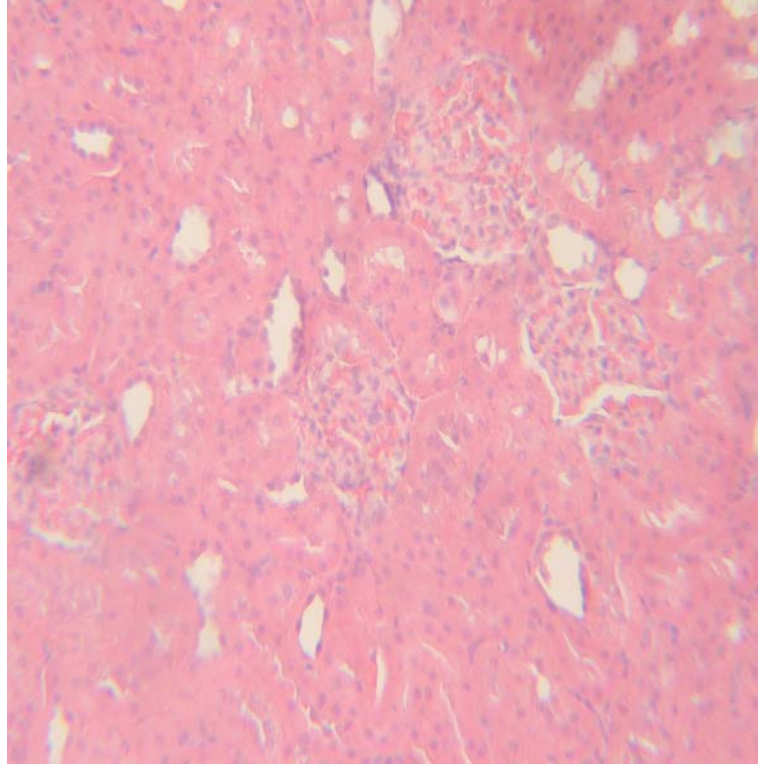
Resim 4: Grup-IV'e (20 mg/kg MTX ve 3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) ait karaciğer dokusu. Hepatositlerde düşük düzeylerde granüler dejenerasyon ve vasküler konjesyon görülmekte (hematoksilen-eozin, x240).



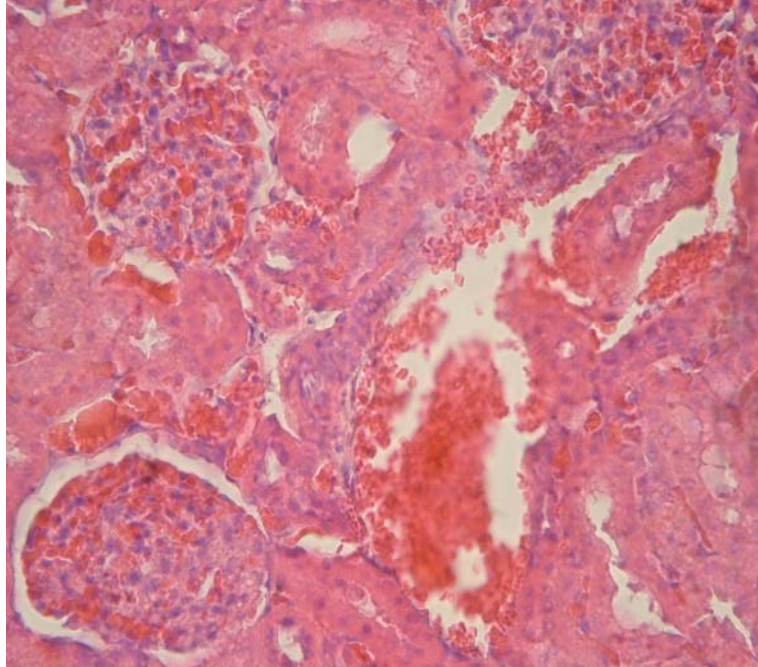
Resim 5: Grup-V'e ait (20 mg/kg Aminoguanidin uygulanan) karaciğer dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (hematoksilen-eozin, x240).



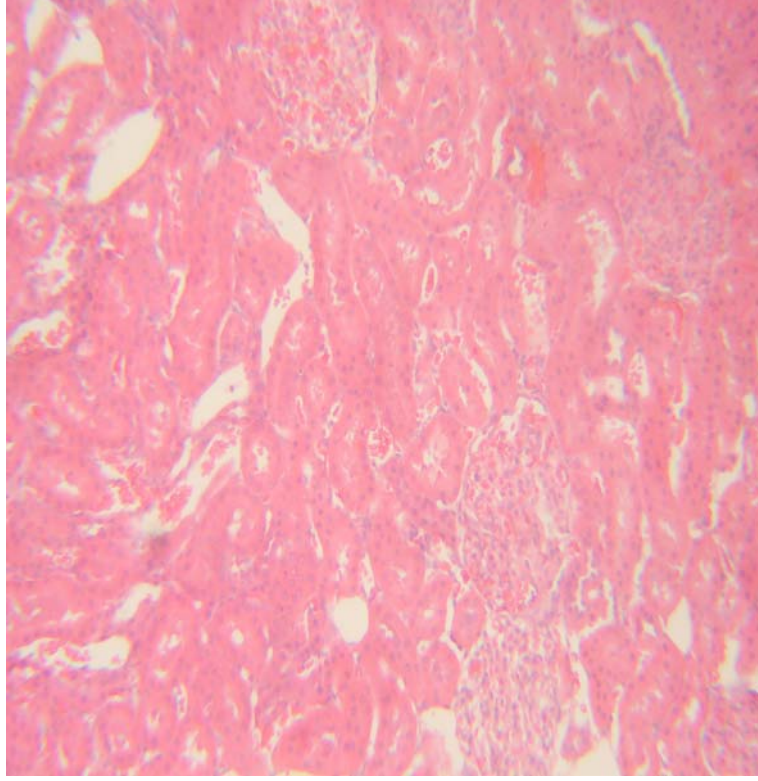
Resim 6: Grup-VI'ya ait (3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) karaciğer dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (hematoksilen-eozin, x240).



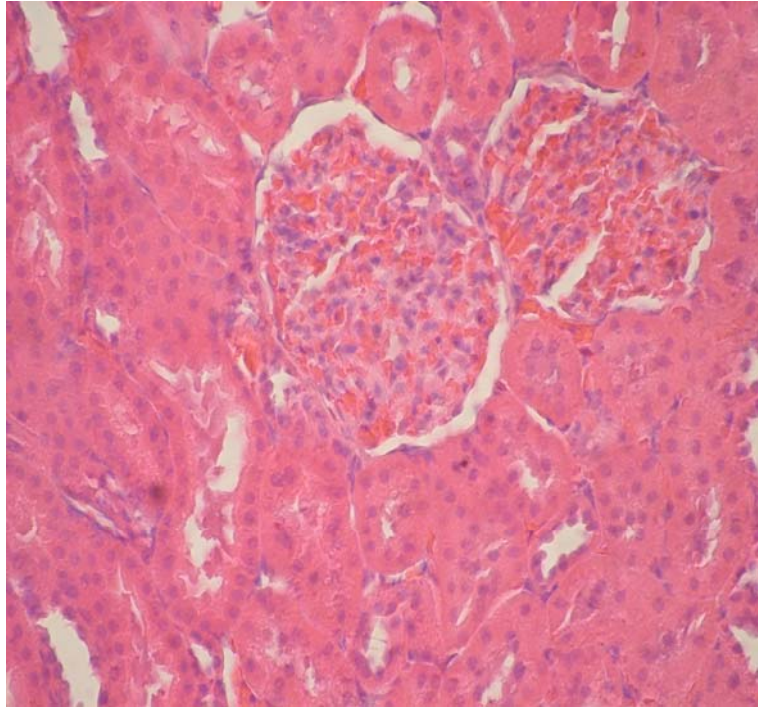
Resim 7: Kontrol grubuna (Grup-I) ait normal böbrek dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (hematoksilen-eozin, x240).



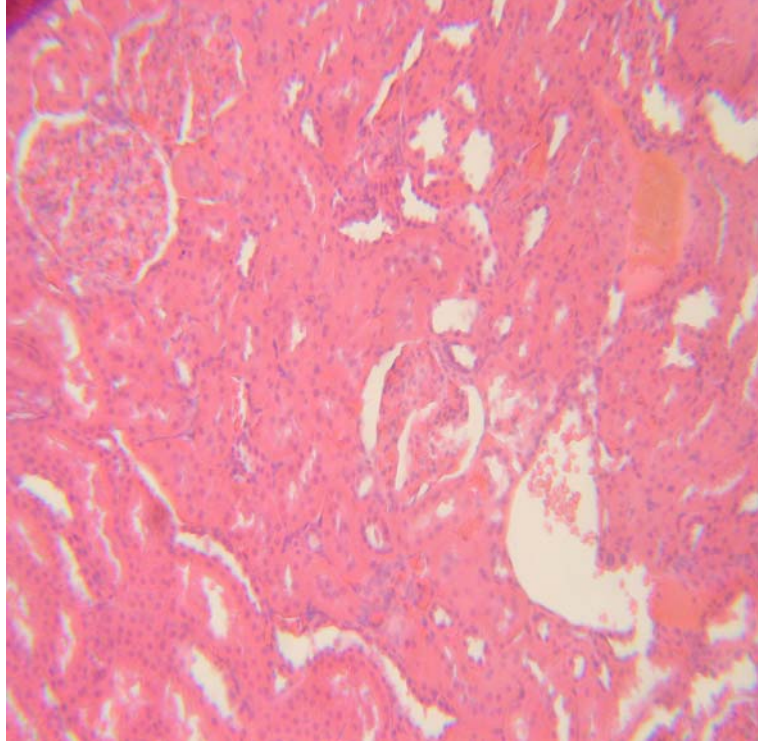
Resim 8: Grup-II'ye ait (20 mg/kg MTX uygulanan) böbrek dokusu. Proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon, parankimde inflamatuvar hücre infiltrasyonları ve vasküler konjesyon belirgin olarak gözlenmekte (hematoksilen-eozin, x480).



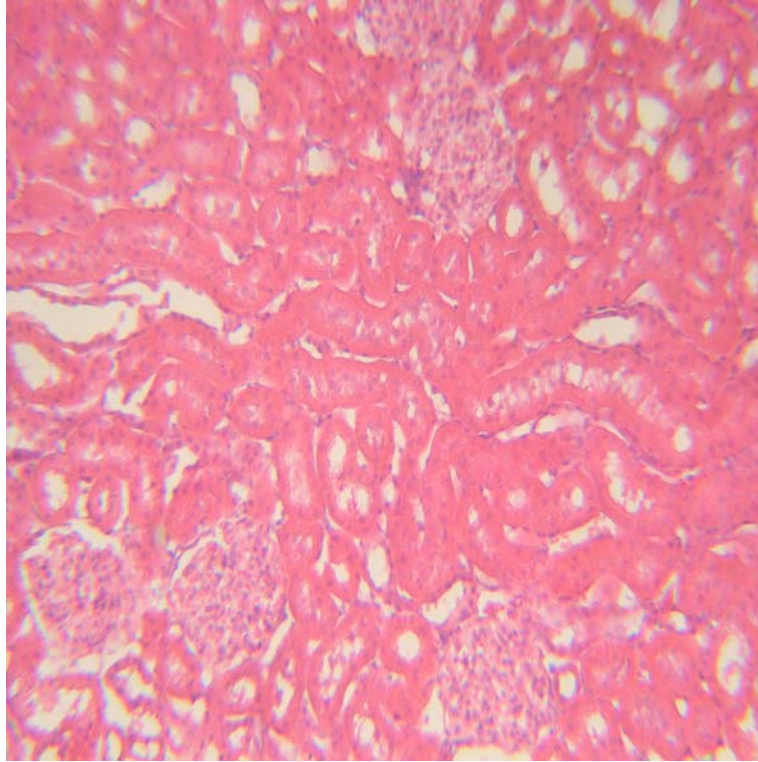
Resim 9: Grup-III'e ait (20 mg/kg MTX ve 20 mg/kg AG uygulanan) böbrek dokusu. Düşük düzeylerde proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve vasküler konjesyon görülmekte (hematoksilen-eozin, x240).



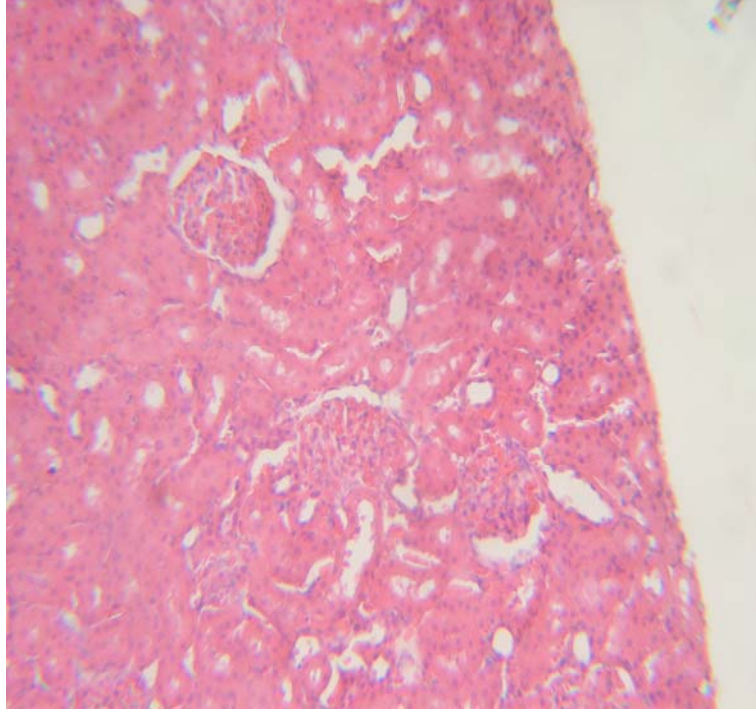
Resim 10: Grup-IV'e ait (20 mg/kg MTX ve 3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) böbrek dokusu. (Düşük düzeylerde proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve vasküler konjesyon görülmekte (hematoksilen-eozin, x480).



Resim 11: Grup-IV'e ait (20 mg/kg MTX ve 3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) böbrek dokusu. (Düşük düzeylerde proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve vasküler konjesyon görülmekte (hematoksilen-eozin, x240).



Resim 12: Grup-V'e ait (20 mg/kg Aminoguanidin uygulanan) böbrek dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (hematoksilen-eozin, x240).



Resim 13: Grup-VI'ya ait (3,5 mg/kg L-NAME uygulanan) böbrek dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (hematoksilen-eozin, x240).

Biyokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait karaciğer ve böbrek dokusu TBARS düzeylerinin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: Karaciğer ve böbrek dokusundaki TBARS düzeyleri (n mol/mg protein).

Gruplar	Karaciğer	Böbrek
	TBARS nmol/mgprotein	TBARS nmol/mgprotein
I (Kontrol)	7,54±0,66	29,4±2,78
II (MTX)	7,18±0,76	52,5±23,7
III (MTX+AG)	10,9±0,90	56,3±22,4
IV (MTX+LNAME)	9,98±0,96	46,5±6,36
V (AG)	6,93±1,06	33,1±4,14
VI (L-NAME)	9,56±0,39	49,3±11,08

Deney sonucu karaciğer ve böbrek dokusundaki TBARS aktivitesi gruplar arasında incelenmiş olup, böbrekte gruplar arası TBARS düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,01$). Karaciğer dokusundaki gruplar arası TBARS aktivitesi Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8: Gruplar arasında karaciğerde gözlenen TBARS aktivitesinin Mann Whitney U testine göre p değerleri.

GRUPLAR	TBARS nmol/mgprotein
I-II	AD
I-III	P<0,01
I-IV	AD
I-V	AD
I-VI	AD
II-III	P<0,01
II-IV	AD
II-V	AD
II-VI	AD
III-IV	AD
III-V	AD
III-VI	AD
IV-V	P<0,01
IV-VI	AD
V-VI	AD

AD: Anlamlı değil.

Sıçanların böbrek dokusunda TBARS düzeylerinde kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,01$). Bu sebeple gruplar arası karşılaştırma yapılamadı.

Sıçanların karaciğer dokusunda TBARS düzeylerinde MTX+AG grubunda kontrol grubuna göre bir yükselme olduğu ($p<0,01$) diğer gruplarda istatistiksel bir farklılık olmadığı saptandı ($p>0,01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

MTX lösemiler, çeşitli solid tümörler, psöriazis, romatoid artrit ve diğer bazı otoimmün hatalıkların tedavisinde 40 yıldan daha uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin Metotreksat'ın psöriaziste kullanım dozu genellikle haftada bir 10-25 miligramdır. Tedavinin etkinliği için başlangıçta parenteral (iv veya im) uygulama tercih edilir. Metotreksat oral olarak da kullanılabilir (Tekin 2000).

Oral MTX'in emilim hızı ve miktarı kişiden kişiye kişiye büyük farklar gösterir. Ayrıca doza bağımlı ve satüre olabilen bir intestinal absorpsiyonu vardır. Yiyeceklerle de metotreksat absorpsiyonu azalır. İntramüsküler uygulanan MTX ise hızla emilir ve iki saatte kanda en yüksek değerine ulaşır. Dermatolojide kullanılan dozlarda kanda yarılanma ömrü 6-7 saattir. %50-70 oranında plazma proteinlerine, özellikle de albümine bağlanır. Hücrelere bir taşıyıcı aracılığı ile girer. En yüksek doku seviyesine karaciğer ve böbrekte rastlanır. (Camisa 1994, Gibson and Perry 1992).

Metabolizasyonu başlıca karaciğerde gerçekleşir. Atılımı başlıca böbrek yoluyla olur. 24 saat içinde 7-OH metotreksat olarak renal filtrasyon, sekresyon ve konsantrasyona bağlı tübüler reabsorpsiyonla atılır. Eliminasyon pek az oranda safra yoluyla tamamlanır (Camisa 1994, Gibson and Perry 1992).

Metotreksatın en sık görülen yan etkisi hepatotoksisitedir. Hastalarda tedaviden vazgeçilmesinin birinci nedenidir. Karaciğer toksisitesi kümülatif dozla ilgilidir. Diğer risk faktörleri yaş, obezite, tedavi sırasında alkol kullanımı, diabet, daha önce geçirilmiş karaciğer veya böbrek hastalığıdır. Kümülatif doz 1,5 grama ulaşınca karaciğer biyopsisi önerilir (Tekin 2000).

Şener ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada metotreksat 20 mg/kg/i.p tek doz olarak uygulanmış ve sonrasında beş gün süre ile L-Karnitin 500 mg/kg uygulanmış ve çalışma sonunda karaciğer dokuları alınarak histolojik açıdan incelenmiştir. Çalışmada MTX grubunda dejeneratif hepatositler, sinüzoidlerde dilatasyon, vasküler konjesyon, bulgularının olduğu gözlenmiştir (Şener ve ark., 2006).

Metotreksat'ın böbrekler üzerindeki hasar oluşturma mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, böbrek tübüllerinde presipitasyonu ile metabolitin (7-OH MTX) ya da doğrudan toksik etkisinin bu hasarı oluşturabileceği belirtilmiştir (Lankelma et al., 1980, Messmann and Allegra 2001). MTX aracılığı ile oluşan karaciğer ve böbrek hasarlanmasında oksidatif stresin önemli rolü olduğu ve MTX'in dokuda lipid peroksidasyonu yoluyla hasar oluşumuna yol açtığı belirtilmiştir (Jahovic et al., 2003).

MTX'in böbrek tübüllerinde ve glomerüllerinde histolojik olarak hasar oluşturduğu gösterilmiştir (Kolli et al., 2009).

Psöriazisteki gibi düşük doz tedavilerde nefrotoksisite görülmesi nadirdir. Böbrek toksisitesinin nedeni filtrasyon yetmezliği, 7-OH metotreksatın doğrudan toksik etkisi ya da metotreksatın asit idrarda erimeden kalıp tübüllerde krisitalizasyonuna bağlı olabilir. Bu riski önlemek için hastalar bol su içmelidir veya bikarbonat ile idrar alkalizasyonu yapılabilir (Tekin 2000).

MTX verilen sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında artmış MDA ve azalmış GSH seviyeleri tespit edilmiş ve melatoninin bu etkileri önlediği belirtilmiştir (Jahovic ve ark., 2003).

Kanser tedavisinde etkin olarak kullanılan ilaçlardan birisi de metotreksattır. MTX kanser tedavisi dışında romatoid artrit (Tuncay ve ark., 2006, Tilling et al., 2006), psoriazis (Şendur ve ark., 2002), ektopik gebelik (Al-Motagabani 2006), Crohn hastalığı ve ülseratif kolit (Al-Motagabani 2006) gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılan bir ilaçtır. Fakat MTX'in etkinliği toksik skalası ve yan etkilerinden dolayı sınırlanmıştır. Örneğin MTX kullanımıyla oluşan ince barsak hasarı malabsorbsiyon ve diyare ile sonuçlanır. Böylece kilo kaybı meydana gelir.

Çalışmalarda yüksek doz uygulanan MTX ile akut böbrek yetmezliklerinin görüldüğü rapor edilmiştir (Behnam and Eliason 2004). Yüksek doz MTX'in hepatotoksisiteye yol açması sık olarak gözlenir ve bu durum kanser hastasının sağlık durumunu olumsuz yönde bozabilmektedir (Al-Ali et al., 2005).

MTX, kemoterapötik ve immunosupresif madde olarak pek çok romatizmal, dermatolojik ve hematolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan antimetabolit bir ilaçtır. Buna rağmen, steatozis (vücutta aşırı yağ toplanması), kolestazis (safra

akımının kesilmesi), fibrozis (bağ dokusu artımı) ve sonuç olarak siroz gibi ciddi yan etkilere sebep olabilir (Çetinkaya ve ark., 2006). Bu yan etkileri nedeniyle kullanımı sınırlıdır.. İlaç sadece malign hücrelere karşı değil tüm hücrelere karşı etki göstererek hepatotoksisiteye sebep olur. Özellikle yüksek oranda kendini yenileyebilen kemik iliği hücreleri, mukozal hücrelere de toksik etki gösterirler.

Epitel hücrelerindeki çoğalma-farklılaşma arasındaki dengesizlik; epitel hücrelerinin erken ölümüne neden olur. Bu da mukozal bariyerdeki yaralanmalara ve enterekolite sebep olur. Yüksek doz uygulanan MTX renal tübüllerde çökmeye neden olup akut renal yetmezlik ile sonuçlanabilir (Öktem et al., 2006, Devrim et al., 2005). MTX eliminasyonundaki gecikme sonucunda nefrotoksisite oluşur. MTX'in toksik etkilerinin görülebilmesi, doz skalası ve tedavinin uzunluğu, hastanın risk faktörleri ve hastalığın tipi ve genetik faktörler gibi bazı faktörlere bağlıdır. Renal yetersizlik, alkol tüketimi, diyabet, yaşlılık da toksisiteye eşlik eden diğer faktörlerdir. MTX'in yan etkilerinden kaçınmak için folik asit tedavisi önerilmektedir. Eklenen folik asit takviyesi ile gastrointestinal yan etkilerden, kemik iliği depresyonu ve mukozitten kaçınılabılır fakat hepatotoksik gelişim etkileri sınırlıdır.

Son zamanlarda MTX ile oluşturulmuş hepatotoksisitenin serbest oksijen radikallerinin artmasına bağlı olarak meydana gelen oksidatif stresten kaynaklandığı rapor edilmiştir. Karaciğer, toksik kimyasal maddelerin atılımı ve detoksifikasyonunda önemli rolü olan bir organdır. MTX ve metabolitlerinin vücuttan atılımında hepatobiliyer sistem, böbrekler ile birlikte çalışır. MTX böbreklerden sonra en fazla karaciğerde biriktiğinden dolayı, yüksek doz uygulanması hepatotoksisiteye neden olabilir (Süzer 2002, Uz ve ark., 2002).

Metotreksat kullanımının karaciğer ve böbreklerde önemli patolojik değişikliklere neden olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmektedir (Widemann et al., 2004, Kolli et al., 2009, Şener ve ark., 2006). MTX kullanımı sonucu karaciğer ve böbreklerde ortaya çıkan hasardan birçok faktör sorumlu tutulmakla birlikte, oksidatif stresin de bu hasarlanmadan sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Jahovic et al., 2003). MTX aracılı böbrek hasarında, oksidatif stres ile nötrofil infiltrasyonunun, etken bir rol oynadığı belirtilmiştir (Kolli et al., 2009).

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerinin ortadan kaldırılabilmesi veya en aza indirgenebilmesi için alternatif yollar denenmektedir. Bunlardan biri de istenmeyen yan etkileri önleyecek veya azaltacak diğer bir ajanın antineoplastik ajan ile birlikte kullanılmasıdır. Literatürde kanser tedavisinde kullanılan MTX'ın hepatotoksik etkilerini azaltmak amacıyla L-Karnitin (Şener ve ark., 2006), nikotinamid (Kröger et al., 1999), metionin (Kröger et al., 1999), melatonin (Jahovic et al., 2003), ursedoksikolik asit (UDCA) (Uraz ve ark., 2008), folik asit (Sultana et al., 2001) gibi antioksidan maddelerin koruyucu etkilerinin olduğunu gösteren birçok deneysel çalışmalar yapılmıştır.

Metotreksat, Nitrik oksit sentaz'ın temel kofaktörü olan tetrahidrobiopterin sentezini baskılayarak, özellikle indüklenbilir nitrik oksit sentaz enzim aktivitesinin artmasına yol açar (Mayer and Werner 1995, Prefeilschifter et al., 1996).

Nitrik oksit başta epitel hücreler olmak üzere çeşitli hücreler tarafından salınan önemli bir moleküldür. Molekül en fazla kabul edilen görüşe göre pikomolar düzeylerde cNOS ile fizyolojik ve koruyucu etki gösterirken, milromolar düzeylerde iNOS üzerinden proinflatuvar ve hasar oluşturuvcu etkiler göstermektedir. Nitrik oksit hem mukus salgısını hem de epitelyal hücrelerde sıvı ekresyonunu artırmak suretiyle mikroplara, toksinlere ve safra tuzları gibi irritan maddelere karşı koruyucu etki gösterir. Nitrik oksit oksidatif stres altında ise;

- Apoptozisi artırır.
- Sitotoksiteyi artırır.
- DNA hasarını artırır.
- Demir sülfür içeren enzimlerin fonksiyonunu değiştirir.
- Mitokondriyal solunumu bozarak zararlı etkiler göstermektedir. (<http://www.gata.edu.tr>, Erişim tarihi: 22 Mayıs 2010).

Yaptığımız bu çalışmada; seçici olan ve olmayan NOS inhibitörleri kullanılarak, NO yapımının önlenmesi ve bunun karaciğer ve böbrek hasarına olan etkileri değerlendirilmiştir. Nitrik oksitin (NO) karaciğer ve böbrek dokularında hasar oluşmasında önemli role sahip olduğu bilinmektedir (Yang et al., 1998, Devrim ve ark., 2005). Ancak fizyolojik koşullarda da birçok olumlu ve koruyucu etkileri

vardır (Murakami and Traber 2003, Brett et al., 1998, Özkan ve Yüksekol 2003, Moncada and Higgs 2002).

Selektif bir iNOS baskılayıcısı olan aminoguanidinin, böbreklerde mekloreタミンle oluşan doku hasarına karşı iyileştirici etkisi olduğu histolojik olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA seviyeleri aminoguanidin grubunda düşük bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Selektif iNOS inhibitörü olan AG'nin bu modelde hasarı azaltması, akut renal toksik etkinin patogenezinde iNOS indüksiyonu ile artmış NO üretiminden kaynaklanabileceği şeklinde açıklanmıştır (Korkmaz ve ark., 2007). Polat ve arkadaşları, sıçanlarda Gentamisin ile oluşan böbrek hasarına karşı AG'nin koruyucu rolü olduğunu, hasar oluşumunu engellediğini belirtmişlerdir (Polat ve Ark., 2006).

Aminoguanidin'in antioksidan özelliği ile ilgili olarak hidroksil radikal süpürücüsü olduğu belirtilmiştir (Courderot-Masuyer et al., 1999). Yılmaz ve arkadaşları sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, AG'nin oksidatif stresi azalttığını IL-1 α , IL 6 ve TNF- α gibi sitokinlerin seviyelerinde azalmaya neden olarak koruyucu etki gösterebileceğini belirtmişlerdir (Yılmaz ve ark., 2007). Dambrova ve arkadaşları ratlar üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında, LPS (lipolisakkarit) ile artan NO seviyelerine karşı; Aminoguanidin'in baskılayıcı etki ile nitrik oksit seviyelerini azalttığını göstermişlerdir (Dambrova et al., 2003).

Seçici olmayan bir NOS inhibitörü olan L-NAME'nin sıçanlarda yapılan bir çalışmada ortalama nitrik oksit seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Gökçimen ve ark., 2006). Connors ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, L-NAME'nin serbest radikallere bağlı doku hasarını azalttığını bulmuşlardır (Connors et al., 2005).

Kutlubay ve arkadaşları, etanolün karaciğer ve böbrekte oluşturduğu hasara karşı L-NAME'nin koruyucu etkili olduğunu histolojik olarak göstermişlerdir (Kutlubay ve ark., 2008). Tavşanlar üzerinde L-NAME'nin doku ve plazma MDA düzeylerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, LNAME'nin plazma ve doku nitrit/nitrat düzeylerini azalttığını, ayrıca L-NAME verilen gruplarda plazma ve doku MDA düzeylerinde kontrole göre istatistik olarak azalma olduğu saptanmıştır (Selvi ve ark., 2007).

Nitrik oksit oluşumunu tamamen baskıladığı düşünülen L-NAME ile sadece indüklenabilir NOS enzimini bloke edip yapısal NOS enzimini etkilemediği düşünülen Aminoguanidin kullanımı sonucu oluşan etkiler değerlendirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalarda MTX ratlara farklı dozlarda ve farklı uygulama şekilleri ile verilmiştir. Biz de çalışmamızda ratlara MTX'i daha önceden doku toksisite çalışmalarında tanımlandığı gibi intraperitoneal yolla tek seferde 20 mg/kg dozunda uyguladık (Jahovic et al., 2003, Çetinkaya ve ark., 2006, Şener ve ark., 2006).

MTX'in hepatotoksik ve nefrotoksik etkisinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamayan karmaşık bir sistemdir (Çetinkaya ve ark., 2006, Devrim ve ark., 2005). Kemoterapi ilaçlarının yan etkilerinin oluşmasından oksidatif stres de sorumlu tutulmaktadır. Bazı çalışmalarda; karaciğer, böbrek, ince barsak ve merkezi sinir sistemi üzerindeki MTX toksisitesinden oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (Devrim ve ark., 2005, Uz ve ark., 2005). Biz de çalışmamızda daha önceki çalışmalarda antioksidan özelliği gösterilmiş olan Aminoguanidin ve L-NAME'nin, MTX'in hepatotoksik ve nefrotoksik etkisini azaltıp azaltamayacağını araştırmayı hedefledik.

Çalışmamızda sıçanlara 20 mg/kg tek doz MTX uygulaması ile karaciğer dokularında histolojik bulguları tespit ettik; Kontrol grubunda yer alan sıçanların karaciğer dokuları normal histolojik görünümde incelendi. MTX grubunda yer alan sıçanlarda karaciğer dokusunda hepatositlerde granüler dejenerasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonları belirgin olarak gözlemlendi. MTX+AG ve MTX+L-NAME gruplarında ise histopatolojik bulgularda önemli ölçüde düzelme gözlemlendi. AG ve L-NAME gruplarında yer alan sıçan dokularında ise, normal histolojik yapı dışında herhangi bir yapısal değişiklik oluşmadığı tespit edildi. Dokularda histolojik olarak Aminoguanidin ve L-NAME'nin benzer etkiler gösterdiği, her ikisinde hasar oluşumunda benzer derecelerde koruyucu olduğunu tespit ettik.

Deneyimizdeki sıçanların böbrek dokularında ise kontrol grubunda normal histolojik görünüm izlendi. MTX grubunda ise sıçanların böbrek dokularında proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde belirgin hidropik dejenerasyon,

parankimde inflamatuvar hücre infiltrasyonları ve vasküler konjesyon gözlemlendi. MTX+AG ve MTX+L-NAME gruplarında ise histopatolojik bulgularda önemli ölçüde düzelme gözlemlendi. AG ve L-NAME gruplarında yer alan sıçan dokularında ise, normal histolojik yapı dışında herhangi bir yapısal değişiklik oluşmadığı tespit edildi. Dokularda histolojik olarak Aminoguanidin ve L-NAME'nin benzer etkiler gösterdiği, her ikisinde hasar oluşumunda benzer derecelerde koruyucu olduğunu tespit ettik.

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda MTX 'in lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA seviyelerini artırdığı ve bazı antioksidan maddelerin MDA seviyelerini düşürdüğü saptanmıştır.(Çetinkaya ve ark., 2006, Şener ve ark., 2006, Jahovic et al., 2003). Çalışmamızda da sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında MDA seviyelerine bakıldı. Böbrek MDA seviyelerinde kontrol grubu ve deney grupları arasında istatistiksel bir fark saptanamadı ($p>0,01$). Gruplar arasında karaciğer MDA seviyeleri istatistiksel olarak bir farklılık gösterdi ($p<0,01$). MTX+AG grubunda, kontrol ve deney gruplarına göre MDA en yüksek seviyede tespit edildi.

Metotreksat uygulaması ve bu uygulamaya bağlı MDA aktivitesi ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda ratların kesim işlemleri intraperitoneal ilaç uygulamalarından 48 saat sonra gerçekleştirilmişti. Bizim çalışmamızda sadece MTX grubunda yüksek seviyelerde MDA gözlenmeyişiinin nedeninin deney süresi ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü yapılan çalışmaların bir kısmında karaciğer ve böbrek dokularındaki biyokimyasal analizlerin, MDA aktivitesinin deney başlangıcında MTX enjeksiyonundan 48 saat sonra yalnız MTX grubunda en yüksek seviyede olduğu gözlenmiş ve 24-72 saat gibi daha erken ya da daha geç olan farklı zaman dilimlerinde aynı etki gözlenmediği belirtilmiştir (Pinheiro et al., 2010, Miyazono et al., 2004). Biyokimyasal analizlerden lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyesinin MTX grubunda yüksek olmaması, deney süresi ile ilgili olabileceği gibi, L-NAME ve Aminoguanidin MDA seviye farklılıklarında deney süresi ve maddenin uygulanma şekli, dozu ya da etki süresi ile ilgili olabilir.

Deney süresi olan, MTX enjeksiyonundan sonraki 5 günü dikkate alarak beşinci gün deneyi sonlandırdık (Jahovic et al., 2003). Literatür taramalarında karaciğer ve böbrekte Aminoguanidin ve L-NAME'nin birlikte MTX toksisitesi

üzerine etkilerini araştıran bir çalışma saptayamadık. Ancak her iki NOS inhibitörünün farklı çalışmalarda ayrı ayrı olsa da farklı yollardan uygulanmaları ile doku hasarında koruyucu rolleri olduğuna ilişkin çalışmalara rastladık (Yılmaz ve ark., 2007, Connors et al., 2005).

Günümüzde MTX'in toksik etkilerini azaltmak için folik asit gibi antioksidanlar yaygın şekilde kullanılmaktadır. MTX'in karaciğer ve böbrek dokusundaki hasar oluşturucu etkisine karşı, yapılacak olan daha farklı araştırmalarla Aminoguanidin ve L-NAME gibi ajanların kullanımı ile, MTX'in dokudaki toksik etkilerinin azalabileceği düşünölmektedir.

Sonuç olarak mevcut çalışmada L-NAME ve aminoguanidinin, metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek toksisitesi üzerine sadece yapısal olarak koruyucu bir etkisinin olduğunu gözlemledik.

ÖZET

Sıçanlarda Metotreksat İle Oluşturulmuş Karaciğer ve Böbrek Hasarlanmasına L-NAME ve Aminoguanidin'in Etkilerinin İncelenmesi

MTX çeşitli kanser türlerinde ve bazı inflamatuvar hastalıklarda, antineoplastik ve antiinflamatuvar ajan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekler üzerine toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekler üzerinde oluşturduğu hasara karşı AG ve L-NAME'nin etkilerinin incelenmesidir.

Bu çalışmada toplam 54 adet Wistar albino türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 6 gruba ayrıldı: **Grup I** (kontrol, n=9), **Grup II** (20 mg/kg MTX, n=9), **Grup III** (20 mg/kg MTX+ 20 mg/kg AG, n=9), **Grup IV** (20 mg/kg MTX+ 3,5 mg/kg L-NAME, n=9), **Grup V** (20 mg/kg AG, n=9) ve **Grup VI** (3,5 mg/kg L-NAME, n=9). Çalışmanın beşinci günü anestezi altında deney sonlandırılarak sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Histolojik incelemeler için alınan dokular % 10'luk nötral formaldehit içerisinde tespit edildi. Biyokimyasal inceleme için alınan dokularda lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehid (MDA) seviyeleri incelendi.

Histolojik incelemede; kontrol, AG ve L-NAME gruplarında karaciğer ve böbrek dokuları normal histolojik görünümde izlendi. MTX grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, karaciğer ve böbrek dokularında hasarlanma tespit edildi. MTX+AG ve MTX+L-NAME gruplarında bu hasarlanmanın azaldığı gözlemlendi ($p<0,01$). Biyokimyasal olarak kontrol ve diğer grupların böbrek dokusu MDA düzeylerinde bir farklılık bulunamadı ($p>0,01$). Karaciğer dokusunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MTX+AG grubunda bir artış olduğu ($p<0,01$) diğer gruplarda bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p>0,01$).

L-NAME ve Aminoguanidin'in, metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek toksisitesi üzerine sadece yapısal olarak koruyucu bir etkisinin olduğunu gözlemledik.

Anahtar sözcükler: Aminoguanidin, böbrek, karaciğer, L-NAME, metotreksat.

ABSTRACT

Research of L-NAME and Aminoguanidine Effects with Methotrexate-Induced Liver and Kidney Damage in Rats

Methotrexate (MTX) is widely used as an antineoplastic and anti-inflammatory agent in a variety of cancers and certain inflammatory disorders. MTX's toxic effects on the liver and kidneys are known. The purpose of this study is to examine Aminoguanidine's (AG) and N^G Nitro L-Arginine Methyl Ester's (L-NAME) effects on the MTX's liver and kidney damages.

In this study 54 male Wistar albino rats were used. The rats were divided into six groups: **Group I** (control, n=9), **Group II** (20 mg/kg MTX, n=9), **Group III** (20 mg/kg MTX+ 20 mg/kg AG, n=9), **Group IV** (20 mg/kg MTX+ 3,5 mg/kg L-NAME, n=9), **Group V** (20 mg/kg AG, n=9) and **Group VI** (3,5 mg/kg L-NAME, n=9). At the end of the fifth day, liver and kidney tissues of the rats were collected under the anesthesia. Tissues taken for histological examination, were fixed in 10 % neutral formaldehyde. Lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) levels were examined in the tissues taken for biochemical analysis.

When compared with the control group's tissues, damage were present in the MTX group's liver and kidney tissues, in the tissues of the MTX+AG and MTX+L-NAME groups, damage were decreased, AG and L-NAME group's tissues were histologically normal ($p < 0,01$). Biochemically control's and other groups kidney tissue MDA levels were not different from each other ($p > 0,01$). When compared with the control group, MDA levels in the liver tissue's of MTX+AG group, a significant increase ($p < 0,01$) and other groups were not different from each other ($p > 0,01$) was observed.

We observed only morphological protective effect's of Aminoguanidine and L-NAME on methotrexate induced liver and kidney toxicity.

Key words: Aminoguanidine, kidney, liver, L-NAME, methotrexate.

KAYNAKLAR

- Abd El-Gawad HM, El-Sawalhi M. Nitric oxide and oxidative stress in brain and heart of normal rats treated with doxorubicin: role of aminoguanidine. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*2004; 18(2): 69-77.
- Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats m. *J Appl Toxicol* 1999; 19: 7-12.
- Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MM, Hafez MM, Omran FM. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology.* 2007; 234: 124–134.
- Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10769-72.
- Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest*, 7u7 1986; 77: 319-321.
- Agardh CD, Stenram U, Torffvit O, Agardh E. Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. *J. Diabetes Comp.*2002; 16: 395-400.
- Akarsu E, Okçu N, Akgöz K, Kiki Đ, Kızıltunç A, Gündoğdu M. Karaciğer sirozunda serum nitrik oksit ve kan basıncı ile ilişkisi. *Turk J Gastroenterl*, 1999; 10 (4):315-8.
- Akkuş İ. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Mimoza Yayınları, Konya 1995; s. 1-132.
- Akpınar D, Yargçoğlu P, Derin N, Aslan M, Agar A. Effect of aminoguanidine on visual evoked potentials (VEPs), antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. *Brain Res.* 2007; 1186: 87–94.
- Al- Motagabani M.A. Histological and Histochemical Studies on the Effects of Methotrexate on the Liver of Adult Male Albino Rat. *Int. J. Morphol*, 2006; 24(3), 417-422.
- Al-Abed Y, Bucala R. Efficient scavenging of fatty acid oxidation products by aminoguanidine. *Chem. Res. Toxicol.* 1997; 10: 875-879.
- Aladağ MA, Türkoz Y, Özerol IH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. *T. Klin. J. Med. Sci.* 2001; 20: 107-111.
- Al-Ali SY, Hassan IM, Sadek S. Ultrastructural changes in rat livers perfused in vitro and in vivo with a high dose of methotrexate. *Histol Histopatho*, 2005; 20: 1131-1145.

- Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem. J*, 2001; 357: 593-615.
- Alonso J, De Miguel LS, Monton M, Casado S and Lopez-Farre A. Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: Regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5719-26.
- Al-Shabanah O, Alam K, Nagi MN, Al-Rikabi AC. Al-Bekairi AM. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Life. Sci.* 2000; 66(3): 265-270.
- Anderson RJ and Barry DW. Clinical and laboratory diagnosis of acute renal failure. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*. 2004; 18(1): 1-20.
- Ara C, Karabulut AB, Kırmıhoğlu H, et al. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress in an experimental peritoneal adhesion model in rats. *Cell Biochem Funct.* 2006; 24: 443-448.
- Arruda WA, Engelstad J, Dyck PD. Neuropathologic and morphometric effects of aminoguanidine on rat nerves. *J. Neurol. Sci.* 1992; 113: 80-84.
- Atalık KE ve Doğan N. Nitrik oksit ve fizyolojik etkileri. *Genel Tıp Derg*, 1997; 7(3): 167-169.
- Atasayar S, Gürer-Orhan H, Orhan H, Gürel B, Girgin G, Özgüneş, H. Preventive effect of amino guanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2009; 61(1):23-32.
- Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, Buijk SL, Kanhai KJ, Bruining HA; Effect of L NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on cardiopulmonary function in human Septic shock; *Chest.* 1998; 113(6): 1640-6.
- Ayçiçek A, Erel O, Koçyiğit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005; 164:775-778.
- Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stres. *Cell Biochem Funct.* 1998 Dec;16(4): 283-293.
- Baggott JE, Morgan SL, Ha TS, Alarcón GS, Koopman WJ, Krumdieck CL. Antifolates in rheumatoid arthritis: a hypothetical mechanism of action. *Clin Exp Rheumatol.* 1993 Mar-Apr;11 Suppl 8:S101-105.
- Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev.* 1999; 31: 971-997.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxyinitrite. *Nature* 1993; 18: 195-99.

- Behnam SE, Eliason MA Comparison of the hepatotoxicity caused by different schedules of methotrexate administration. *J Am Acad Dermatol*, 2004; 22: 552.
- Bicik Z. ve Ersan S. Akut renal yetmezlik. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 1999; 3: 113-117.
- Blanco-Coronado JL, Repetto M, Ginestal RJ, Vicente JR, Yelamos F, Lardelli A. Acute Intoxication by Endosulfan. *J Toxicol Clin Toxicol* 1992; 30(4): 575-83.
- Bogin E, Marom M, Levi Y. Changes in serum, liver and kidney of cisplatin treated rats, effect of antioxidants. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1994; 32: 43-51.
- Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJ, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 1993; 342: 338-40.
- Bram J, Allegra CJ, Fine RL, Chabner BA. Effects of methotrexate on intracellular folate pools in purified myeloid precursor cells from normal bone marrow. *J Clin Invest* 1987; 79: 692-697.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Synder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-18.
- Bredt DS, Synder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulinrequiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-85.
- 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.
- Brett SJ, Quinlan GJ, Mitchell J et al. Production of nitric oxide during surgery involving cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med.* 1998; 26: 272–278.
- Brier ME, Mayer PR, Brier RA, Visscher D, Luft FC and Aronoff GR. Relationship between rat renal accumulation of gentamicin, tobramycin, and netilmicin and their nephrotoxicities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*1985; 27(5): 812-816.
- Brion N, Barge J, Godefroy I, Dromer F, Dubois C, Contrepolis A and Carbon C. Gentamicin, netilmicin, dibekacin, and amikacin nephrotoxicity and its reabsorption in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1984; 25(2): 168-172.
- Brodiak IV, Sybirna NO. Effect of aminoguanidine on oxidative modification of proteins in experimental diabetes mellitus in rats [Article in Ukrainian]. *Ukr Biokhim Zh.* 2006; 78: 114-119.
- Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. The Merck Index, *Merck & Co Inc*, NJ, 1989.

Burcham PC, Kaminskas LM, Fontaine FR, Peterson DR, Pyke SM. Aldehyde sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. *Toxicology*. 2002; 181-182: 229-236.

Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35(4): 159-169.

Camisa C. *Psoriasis*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1994; s. 285-300.

Campillo B, Bories PN, Benvenuti C, Dupeyron C. Serum and urinary nitrate levels in liver cirrhosis: endotoxemia, renal function and hyperdynamic circulation. *J Hepatol* 1996; 25: 707-14.

Can C, Sen S, Nese B and Isık T. Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 390: 327-334.

Cantini C, Kieffer P, Corman B, Liminan P, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene, I. Aminoguanidine and aortic wall mechanisms, structure, and composition in aged rats. *Hypertens*.2001; 38: 943-948.

Caro AA, Cederbaum AI. Antioxidant properties of S-adenosil-L-methionine in Fe (+2) initiated antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1303-1316.

Chabner B, Wilson W, Supko J. Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ, Kaushansky K. *In Williams Hematology*. 7th Edition. Mc Graw Hill Company, United States. 2007; 249-51.

Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest*. 1985 Sep;76(3): 907-912.

Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S. Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419-23.

Chatila R, Ferayorni L, Gupta T, Groszmann RJ. Local Arterial Vasoconstriction Induced by Octreotide in Patients With Cirrhosis. *Hepatology*, 2000; 31 (3):572-6.

Cherla G and Jaimes EA. Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease. *J. Nutr*, 2004; 134: 2801-2806.

Christopherson KS, Bredt Ds. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997; 100: 2424-29.

Chu CJ, Lee FY, Wang SS, et al. Hyperdynamic circulation of cirrhotic rats: role of substance P and its relationship to nitric oxide. *Scand J Gastroenterol*, 1997; 32:841-5.

Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7631-36.

Cohen RI, Hassell AM, Marzolk K, Marini C, Liu SF and Scharf SM. Renal effects of nitric oxide in endotoxemia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2001; 164: 1890-1895.

Connors W, Whitebeck C, Chicester P et al; L-name, A Nitric Oxide Synthase Inhibitor, Diminishes Oxidative Damage In Urinary Bladder Partial Outlet Obstruction; *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290(2): F357-63.

Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido, Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, Williamson JR, McDaniel ML. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes*.1992; 41: 552-556.

Courderot-Masuyer C, Dalloz F, Maupoil V, Rochette L. Antioxidant properties of aminoguanidine. *Fundam Clin Pharmacol*. 1999; 13: 535-540.

Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association* 1997; 3-4: 92-95.

Çetiner M, Şener G, Şehirli AO, Ekşioğlu-Demiralp E, Ercan F, Sirvancı S, Gedik N, Akpulat S, Tecimer T, Yeğen BC. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005; 209: 39-50.

Çetinkaya A, Bülbüloğlu E, Kurutaş EB, Kantarçeken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit*. 2006; Aug;12(8):BR274-278.

Dambrova M, Kırjanova O, Baumann L, Liepinsh E, Zvejniece L, Muceniece R, Kalvanish I, Wikberg JES. EPR Investigation of in vivo inhibitory effect of guanidine compounds on nitric oxide production in rat tissues. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2003; 54(3): 339-347.

Delogu G, Antonucci A, Moretti S, Marandola M, Tellan G, Signore M, Famularo GJ. Oxidative stress and mitochondrial glutathione in human lymphocytes exposed to clinically relevant anesthetic drug concentrations. *Clin Anesth* 2004; 16(3):189- 194.

Deprem O. Köpeklerde nefritislerin tanı, ayırıcı tanı ve sağaltım olanakları üzerine çalışmalar. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg*, 1987; 13(1): 31-50.

Devrim E, Çetin R, Kılıçoğlu B, Ergüder BI, Avcı A, Durak I. Methotrexate Causes Oxidative Stress in Rat Kidney Tissues. *Renal Failure*, 2005; 27: 771- 773.

Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, et al. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J Dent Res*. 2004; 83: 343-348.

Drapper HH, Hadley M. Melondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-31.

Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecologic Oncol* 2003; 88: 434-439.

Dutz JP, Ho VC. Immunosuppressive agents in dermatology. An update. *Dermatol Clin*. 1998; Apr;16(2): 235-251.

Erkurt MA, Kuku I, Kaya E, Aydoğdu I. Kanser Kemoterapisi ve Böbrek. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*.2009; 16(1): 63-68.

Eroğlu C, Yıldız OG, Saraymen R, Soyuer S, Kılıç E, Özcan S. Aminoguanidine ameliorates radiation-induced oxidative lung damage in rats. *Clin Invest Med*. 2008; 31: E182–E188.

Eroğlu C. Tüm Vücut Işınlaması Yapılan Ratlarda Radyasyona Bağlı Akciğer Hasarına Karşı Aminoguanidinin Etkisi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri, 2006.

Ertekin A, Karaca M, Akkan HA, Cemek M ve Ormancı N. Köpeklerde gentamisin nefrotoksikozisinde lipit peroksidasyonu, antioksidan maddeler, antioksidan vitaminler ve bazı hematolojik-biyokimyasal parametre düzeylerinin araştırılması. *Türk J Vet Anim Sci*, 2003; 27: 535-540.

Evenepoel P. Acute toxic renal failure. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*, 2004; 18(1): 37-52.

Fadıloğlu E, Erdoğan H, Emre MH, Özyurt H. L-Name ile hipertansif yapılan sıçanlarda kalpte iskemi- reperfüzyon sonrası kalp dokusu ksantin oksidaz aktivitesi ve malondialdehit düzeyleri. *Ege tıp dergisi*. 2001; 40(2): 75-81.

Filep JG, Battistini B, Sirois P. Induction by endothelin-1 of epithelium-dependent relaxation of guinea-pig trachea in vitro: Role for nitric oxide. *Br J Pharmacol*,1993; 109: 637-644.

Fillastre JP, Godin M. Drug-induced nephropathies. In Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, et al. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. New York: Oxford University Press 1998; 2645-2657.

Flores F, Kerdel FA. Other novel immunosuppressants. *Dermatol Clin*. 2000 Jul;18(3):475-483.

Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase: Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*,1991; 42: 1849-1857.

Gabbai FB. Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2001; 16: 10-13.

Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh Y, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-oka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 761-63.

Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada S. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattieboro rats. *Eur J Pharmacol.*1992; 213: 449-451.

Gardner CR, Heck DE, Feder LS, Mc Closkey TW, Laskin JD, Laskin DL. Differential regulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate production by hepatic macrophages and endothelial cells. In: Jesaitus A, Dratz E, eds. The molecular basis of oxidative damage by leukocytes. *Boca Raton, Florida: CRC Press* 1992: 267-72.

Ghaznavi R and Kadkhodae M. Comparative effects of selective and nonselective nitric oxide synthase inhibition in gentamicin-induced rat nephrotoxicity. *Arch. Toxicol*, 2007; 81(6): 435-457.

Ghaznavi R, Faghihi M, Kadkhodae M, Shams S and Khastar H. Effects of nitric oxide on gentamicin toxicity in isolated perfused rat kidneys. *J. Nephrol*, 2005; 18: 548-552.

Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant induced apoptosis. *Diabetes.*1998; 47: 1114-1120.

Gibson LE, Perry HO. Papulosquamous eruptions and exfoliative dermatitis. In: Moschella SL, Hurley HJ, eds. *Dermatology* (3rd edition). Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992:607-622.

Goto E, Tomojiri S, Okamoto I, Tanaka K. Methotrexate poisoning with acute hepatorenal dysfunction. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2001; 39: 101–104.

Göğüş F, Metotreksat ve Osteopati, *Romatizma*, 2001; 16(1): 52.

Gökçimen A, Kocak A, Bayram D, Cim A, Kılbaş S, Kutluhan S, Kılbaş A, Koçkar C. Effect of lisinopril on rat liver tissues in L-NAME induced hypertension model. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2007; 296: 159–164.

Gölcük M, Toprak S, Sahin M ve Pasaoglu H. Sepsiste indüklenebilen nitrik oksit sentaz inhibitörü (İNOS) ve antioksidanların böbrek hasarı ve fonksiyonlarına etkileri. *Genel Tıp Derg*, 2003; 13(3): 95-103.

Hall PM, Jenner MA, Ahern MJ. Hepatotoxicity in a rat model caused by orally administered methotrexate. *Hepatology.* 1991; 14: 906–910.

Halliwell B. Free Radical, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause, Consequence. *The Lancet* 1994; 344: 721-24.

Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto*, 1974; 73: 1075-1086.

Hazıroğlu R ve Milli ÜH. *Veteriner Patoloji II*. Cilt. Tamer Matbaacılık, Yayıncılık. Tan. Hiz. Tic.ve Paz. Ltd. Şti, Ankara, 1998.

Hempel L, Misselwitz J, Fleck C, et al. Influence of high dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Med Pediatr Oncol*. 2003; 40: 348-354.

Higuchi Y, Hattori H, Kume T, Tsuji M, Akaike A, Furusho K. Increase in nitric oxide in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain and suppression by 7-nitroindazole and aminoguanidine. *Eur J Pharmacol*.1998; 342: 47-49.

Hins JA, Bucci TJ, Irwin LK, Michael SL, Mayeux PR. Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen induced hepatotoxicity in mice. *Nitric Oxide*. 6(2), 160-167, 2002.

Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3): 378-84.

Horoz M ve Özgür Ö. Akut böbrek yetmezliği. *Harran Tıp Fak. Derg*, 2004; 1(3): 48-63.

<http://www.androloji.org.tr/images/File/37.Say%C4%B1/i2.pdf> 25/05/2010.

<http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/dersler/39.pdf> 22/05/2010.

http://www.tfd.org.tr/mersin_kitap.pdf, 23/05/ 2010.

Hue RT, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993; 18: 1620-24.

Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C et al. L-Arginine treatment alters the kinetic of nitric oxide and superoxide release and reduces ischaemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation*. 1997; 96: 667-675.

Hytiroglou P, Tobias H, Saxena R, Abramidou M, Papadimitriou CS, Theise ND. The canals of hering might represent a target of methotrexate hepatic toxicity. *Am J Clin Pathol*. 2004 Mar;121(3):324-329.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chadhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-69.

Imanaga Y, Sakata N, Takebayashi S, Matsunaga A, Sasaki J, Arakawa K, Nagai R, Horiuchi S, Itabe H, Takano T. In vivo and in vitro evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerosis plaques. *Atherosclerosis*. 2000; 150: 343-350.

Islas-Carbajal MC, Grijalva G, Rincon-Sanchez AR, Covarrubias A, Alvarez-Rodriguez A, Armendariz-Borunda J. Nitric oxide synthases inhibition results in renal failure improvement in cirrhotic rats. *Liver international*. 2005; 25: 131-140.

Işıksal FY. Gastroenteroloji ve Hepatoloji’de Serum Nitrit/Nitrat Ölçümünün Klinik Önemi. *T Klin Gastroenterohepatoloji* 2003; 14: 218-224.

Jahovic N, Çevik H, Şehirli AO, Yeğen BC, Şener G. Melatonin prevents methotrexate induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*. 2003 May; 34(4): 282-287.

Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end products and progress of diabetic vascular complications. *Physiol. Res*. 2004; 53: 131-142.

Janos Z, Krishnamurti D. Oxidative Stress and Disease 10: *Nutrients and cell signaling*. Taylor & Francis, 2005: Önsöz.

Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 14519-22.

Jedidi I, Therond P, Zarev S, Cosson C, Couturier M, Massot C, Jore D, Gardes Albert M, Legrand A, Bonnefont-Rousselot D. Paradoxal protective effect of aminoguanidine toward low-density lipoprotein oxidation: inhibition of apolipoprotein B fragmentation without preventing its carbonylation. Mechanism of action of aminoguanidine. *Biochemistry*. 2003; 42: 11356-11365.

Jianmongkol S, Vuletic JL, Bender AT, Demady DR, Osawa Y. Aminoguanidine-mediated inactivation and alteration of neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 2000; 275(18): 13370-13376.

Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med*. 1983 Nov; 3;309(18): 1094-1104.

Joneschild ES, Chen L-E, Seaber AV et al. Effect of a NOS inhibitor, LNMMA, on the contractile function of reperfused skeletal muscle. *J Reconstr Microsurg*. 1999; 15: 55-60.

Kane D, Gogarty M, O'leary J, Silva I, Birmingham N, Bresnihan B, Fitzgerald O. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum*. 2004 Oct; 50(10): 3286-3295.

Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 1993; 261: 1445-48.

Kato S, Ohkawa F, Ito Y, Amagase K, Takeuchi K. Role of endothelial nitric oxide synthase in aggravation of indomethacin-induced gastric damage in adjuvant arthritic rats. *Journal of Physiology And Pharmacology*. 2009; 60(4), 147-155.

Katsumoto S, Smith SME, Martasek P, Salerno JC. Competition and binding of arginine, imidazole and aminoguanidine to endothelial nitric oxide synthase: aminoguanidine is a poor model for substrat, intermediate, and arginine analog inhibitor binding. *Nitric Oxide*. 2003; 8: 149-154.

Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 8. Baskı, Cilt 1-2, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Şirketi, Ankara, 1998.

Kayalı R, Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpasa J Med* 2004; 35: 83-89.

Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Effect of aminoguanidine on erythrocyte lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Clin Chem Lab Med*. 1998; 36: 771-775.

Kendall HK, Marshall RI and Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Diseases*, 2001; 7: 2-10.

Kılınç A ve Kılınç K. *Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 2003.

Kilbourn RG, Traber DL and Szabo C. Nitric oxide and shock. *Disease-A Month*. 1997; 47: 277-348.

Kintzel PE. Anticancer drug-induced kidney disorders. *Drug Safety*. 2001; 24: 19-38.

Klahr S. The role nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol. Dial. Transplant*, 2001; 16(1): 60-62.

Kleinert H, Boissel J-P, Schwarz PM, Förstermann U. Regulation of the expression of nitric oxide synthase isoform. In: *Nitric Oxide. Biology and Pathobiology*. San Diego: *Academic Press* 2000; 105-28.

Knight KR, Zhang B, Morrison WA, et al. Ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone. *Eur J Pharmacol*. 1997; 332: 273-278.

Kobayashi Y, Ishigame Y, Usui T. Superoxide Dismutase Activity of Human Granulocytes and Lymphocytes. *The Lancet* 1977; 16: 865-66.

Koçak A. Değişik dozlardaki Asetaminofen'in karaciğer nitrik oksit sentaz (İNOS) enzimi üzerindeki etkisinin immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi, Isparta, 2008.

Kolli VK, Abraham P, Selvakumar D, Isaac B. Neutrophil Infiltration and Oxidative Stress May Play a Critical Role in Methotrexate-Induced Renal Damage. *Chemotherapy* 2009; 55:83-90.

Kooy NW, Lewis SJ, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: Evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit Care Med* 1997; 25: 812-19.

Korkmaz A, Topal T, Uçar M, Göçgeldi E, Oğur R, Yaren H, Kurt B. Bir kimyasal savaş ajanının böbrekler üzerindeki akut toksitesinin araştırılması. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 2007; 6 (4): 227-232.

Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* 1986 Jul;29(7): 832-835.

Kröger H, Hauschild A, Ohde M., et al. Nicotinamide and Methionine Reduce the Liver Toxic Effect of Methotrexate. *General Pharmacology*, 1999; 33: 203-206.

Kumari K, Umar S, Bansal V, Sahib MK. Inhibition of diabetes associated complications by nucleophilic compounds. *Diabet.* 1991; 40: 1079-1084.

Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB, Kremsner PG. Nitric oxide synthase 2 (Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis* 2001; 184: 330-36.

Kurtdede A ve Börkü K. *Üriner Sistem Hastalıkları*, Ed. İmren HY. *Kedi ve Köpek Hastalıkları*, Medisan Yay, No: 32, Ankara, 1998.

Kutlubay R, Oğuz EO, Kocamaz E, Turgut G. Karaciğer ve böbrek üzerine etanolün toksisitesi ve L-NAME'nin koruyucu etkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2008;15(4)/11-17.

Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM ve Besler HT. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulus Travma Derg*, 2004; 10(3): 149-159.

Kürsat T. *Veteriner Klinik Laboratuvar Teshis.* 2. Baskı. Bahçivanlar Basımsanayi AŞ, Konya, 2000.

Lameire NH and Vanholder R. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology.* 2004; 18 (1), 21-36.

Lancaster JR. *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*, 2000.

Lankelma J, van der Klein E, Ramaekers F: The role of 7-hydroxymethotrexate during methotrexate anti-cancer therapy. *Cancer Lett* 1980; 9: 133–142.

Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 1996; 270: 164-70.

Lieber E, Smith GBL. The chemistry of aminoguanidine and related substances. *Chem. Rev.* 1939; 25: 213-271.

Liptakova A, Carsky J, Ulicna O, Vancova O, Bozek P, Durackova Z. Influence of β -resorcylic acid aminoguanidine on selected metabolic parameters and antioxidant status of rats with diabetes mellitus. *Physiol. Res.* 2002; 51: 277-284.

Liu SF, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Crit Care Med* 1996; 24: 1219-25.

Loehry CA, Creamer B. Three-dimensional structure of the rat small intestinal mucosa related to mucosal dynamics in the rat after the administration of methotrexate. *Gut.* 1969; 10: 112-116.

Lowenstein CJ, Glatt Cs, Bredt DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6711-15.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Radall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.

Luft FC, Patel V, Yum MN and Kleit SA. (1976). Nephrotoxicity of cephalosporin gentamicin combinations in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1976; 9(5): 831-839.

Lunceford N, Gugliucci A. Ilex paraguarensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia.* 2005; 76: 419-427.

Lunec J, Blake D. Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes. In: Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease. London: Balliere Tindall 1990; 189-212.

MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5243-48.

Maden M. Deneysel Gentamisin Nefrotoksisitesinde Üriner Enzim Aktivitelerinin Önemi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, 1994.

Mansour M, Daba MH, Gado A, Al-Rikabi A, Al-Majed A. Protective effect of L-arginine against induced by cyclosporine in normal rats. *Pharmaco. Res* 2002; 45(6): 441-446.

Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol.* 2002; 132: 123-128.

Marklund SL. Analysis of Extracellular Superoxide Dismutase in Tissue Homogenates and Extracellular Fluids. *Methods Enzymol* 1990; 186: 260-65.

- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW: Structure and chromosomal localization of human constitutive endothelial nitric oxide synthases gene. *J Biol Chem.* 1993; 15: 268: 17478-88.
- Mayer B, Schmid M, Klatt P, Schmidt K. Reversible inactivation of endothelial nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine. *FEBS Lett* 1993; 333(1-2): 203-6.
- Mayer B, Werner ER. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. Naunyn-Schmiedeberg's *Arch Pharmacol* 1995; 351:453-63.
- Mayuser CC, Dalloz F, Maupoil V, Rochette L. Antioxidant properties of aminoguanidine. *Fundam. Clin. Pharmacol*, 1999; 13: 535-540.
- McCord JM, Fridowich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem*, 1969; 224: 6049-6055.
- McKim SE, Gäbele E, Isayama F, Lambert JC, Tucker LM, Wheeler MD, Connor HD, Mason RP, Doll MA, Hein DW, Arteel GE. Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: Studies with knockout mice. *Gastroenterology* 2003; 125(6): 1834-44.
- Messmann R, Allegra C: Antifolates; in: Chabner B, Longo D (eds): *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 139-184.
- Mistik R. Aminoglikozid antibiyotikler ve günde tek doz kullanımları. *Klinik Dergisi.* 2000; 13(2): 43-45.
- Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, Moore IM. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs.* 2005 Jan;6(3): 187-195.
- Miller AG, Gerrard JA. Assessment of protein function following crosslinking by α -dicarbonyls. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005; 1043: 195-200.
- Mingeot-Leclercq MP and Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1999; 43(5): 1003-1012.
- Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr*, 2006; 42: 289-306.
- Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 2005; 26:257-264.
- Mitchell JR, Jallow DJ, Gillette JR, Brodie BB. Drug metabolism as a cause of drug toxicity. *Drug Metab Disposition.* 1973; 1: 418-423.

- Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004 Nov; 39 (11): 1119-1127.
- Miyoshi H, Taguchi T, Sugiura M, Takeuchi M, Yanagisawa K, Watanabe Y, Miwa I, Makita Z, Koike T. Aminoguanidine pyridoxal adduct is superior to aminoguanidine for preventing diabetic nephropathy in mice. *Horm. Metab. Res,* 2002; 34:371-377.
- Moilanen E, Whittle BJR, Moncada S. Nitric oxide as a factor in inflammation. In: *Inflammation: Principles and Clinical Correlations. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.* 1999; 787-800.
- Mollaoğlu H. GSM 900 MHz telefonların oluşturduğu manyetik alanın etkisiyle meydana gelen oksidatif değişiklikler üzerine melatoninin etkisi. *Uzmanlık tezi. Süleyman Demirel Üniv. Tıp Fak. Fizyoloji AD. Isparta,* 2003.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
- Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9: 1319-30.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.*1991;43: 109-143.
- Moussa YI, Plevris JN, Hayes PC. Plasma nitrites/nitrates in HCV infection and hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol,* 2000; 12 (2):159-63.
- Murakami K, Traber DL. Pathophysiological basis of smoke inhalation injury. *News Physiol Sci.* 2003; 18:125-129.
- Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 1998; 56(6): 773-79.
- Mustafa A, Gado AM, Al-Shabanah OA, Al-Bekairi AM. Protective effect of aminoguanidine against paraquat induced oxidative stress in the lung of mice. *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2002; 132: 391-397.
- Nabekura T, Koizumi Y, Nakao M, Tomohiro M, Inomata M, Ito Y. Delay of cataract development in hereditary cataract UPL rats by disulfiram and aminoguanidine. *Exp. Eye Res.* 2003; 76: 169-174.
- Nadeem A, Masood A, Giliani A, Shah ZA. Immobilizasyon stress causes extraceluleroxidant-antioxidant imbalance in rats: Restoration by L-Name and vitamin E. *Eur. Neurophysiopharmacol.* 2005; 16(4): 260-267.

- Nakano A, Koyama I, Matsunaga T, Nakajima T, Hirose H, Sato M, Komoda T. Expression of reactive oxygen-related enzymes in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured with high concentrations of glucose. *Rinsho Byori*, 1999; 7: 676-681.
- Naruhashi K, Nadai M, Nakao M, Suzuki N, Nabeshima T, Hasegawa T. Changes in absorptive function of rat intestine injured by methotrexate. *Clinical Experimental Pharmacology Physiology*. 2000; 27: 980-986.
- Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkewcz IM, Shear NH. Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatotoxicity. *Clin Biochem*. 1999; 32: 519–536.
- Nilsson BO, Kockum I, Rosengren E. Inhibition of serum daimin oxidase discloses a constitutive putrescine release from cultured vascular smooth muscle cells. *Inflamm. Res*. 1999; 48: 176-180.
- Nilsson BO. Biological effects of aminoguanidine: an update. *Inflamm. Res*. 1999; 48: 509-515.
- Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T. Induction of Superoxide Dismutase in Leukocytes by Paraquat: Correlation with Age and Possible Predictor of Longevity. *Blood* 1990; 76: 835-41.
- Ohkawa W, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-58.
- Olas B, Nowak P, Wachowicz B. Resveratrol protects against peroxynitrite-induced thiol oxidation in blood platelets. *Cell Mol Biol Lett*. 2004; 9: 577–587.
- Ou P, Wolff SP. Aminoguanidine: a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochem. Pharmacol*. 1993; 46(7): 1139-1144.
- Ozaki M, Kawashima S, Hirase T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am J Pathol*. 2002; 160:1335-1344.
- Öktem F, Yilmaz H. R, Özgüner F. ve ark. Methotrexate – Induced Renal Oxidative Stres in Rats The Role of a Novel Antioxidant Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Toxicol Ind Health*, 2006; 22: 241-247.
- Özek M, Üresin Y ve Güngör M. Deneysel endotoksemide nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin etkileri. *İst. Tıp. Fak. Mecmuası*. 2001; 64(4): 301-306.
- Özkan M ve Yüksekol İ. Nitrik oksit ve akciğerler. *Toraks Dergisi*. 2003; 4(1): 88-94.

Palmer C, Vanucci RC. Potential therapies of perinatal asphyxia. *In Clinics in Perinatology*. Eds: Shankaran S. WB Saunders Company, Philadelphia 1993; 411-32.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-66.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-26.

Panagiotopoulos S, O'Brien RC, Bucala R, Cooper ME, Jerums G. Aminoguanidine has an antiatherogenic effect in the cholesterol fed rabbit. *Atherosclerosis*.1998; 136:125-131.

Papaconstantinou HT, Xie C, Zhang W, et al. The role of caspases in Methotrexate-induced gastrointestinal toxicity. *Surgery* 2001; 130: 859-65.

Parks DA, Granger DN. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. *Hepatology*. 1988; 8: 680-682.

Patel RK, McAndrew J, Sellak H, White CR; Jo H, Freeman BA, Darley- Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 385-400.

Pfeilschifter J, Eberhardt W, Hummel R, Kunz D, Mühl H, Nitsch D *et al*. Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase—potential for a novel class of anti-inflammatory agents. *Cell Biol Int* 1996;20:51-8.

Picard, S, Parthasarathy S, Fruebis J, Witztum JL. Aminoguanidine inhibits oxidative modifications of low density lipoprotein protein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavenger receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*1992; 89: 6876-6880.

Pinelli A, Trivulzio, Tomasoni L, Bertolini B, Brenna S, Bonacina E, Accini R. Drugs Modifying Nitric Oxide Metabolism Affect Plasma Cholesterol Levels, Coagulation Parameters, Blood Pressure Values And The Appearance of Plasma Myocardial Necrosis Markers in Rabbits: Opposite Effects of L-NAME And Nitroglycerine. *Cardiovasc. Drugs Ther.*2003; 17: 15-23.

Pinheiro FV, Pimentel VC, De Bona KS, Moretto MB, Scola G, Salvador M, Funchal C. Decrease of adenosine deaminase activity and increase of the lipid peroxidation after acute methotrexate treatment in young rats: protective effects of grape seed extract. *Cell Biochem Funct* 2010; 28: 89-94.

Polat A, Parlakpınar H, Tasdemir S, et al. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Histochem.* 2006; 108: 365-371.

Radi R, Beckman JS, Bush KM. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 288: 481-485.

Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 1451–1464.

Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration: *Proc. Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4003–4008.

Rambabu JP, Rao MB. Effect of an Organochlorine and Three Organophosphate Pesticides on Glucose, Glycogen, Lipid and Protein Contents in Tissues of The Freshwater Snail *Bellamya Dissimilis*. *Bull Environ Contam Toxicol* 1994; 53(1): 142-48.

Raza M, Ahmad M, Gado A, Al-Shabanah OA. A comparison of hepatoprotective activities of aminoguanidine and N-acetyl-cysteine in rat against the toxic induced by azathioprine. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003; Part C, 134: 451-456.

Reinartz M, Ding Z, Floegel U, Goedecke A, Schrader J. Nitrosative stress leads to protein glutathiolation, increased s-nitrosation, and up-regulation of peroxiredoxins in the heart. *J Biol Chem.* 2008; 283: 17440–17449.

Roberto Z, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension.* 1998; 32(6): 958-964.

Roenigk HH, Bergfield WF, St Jacques R, Owens FJ, Hawk WA. Hepatotoxicity of methotrexate in the treatment of psoriasis. *Arch Dermatol.* 1971; 103: 250–261.

Roussel DB, Rupin A, Fabiani JN and Verbeuren TJ. Urinary nitrate excretion in cholesterol-fed rabbits: Effect of a chronic treatment by N-iminoethyl-L-lysine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology.* 2000; 388: 275-279.

Ruan J, Xie Q, Hutchinson N, Cho H, Wolfe GC, Nathan C. Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free Ca²⁺. *J Biol Chem* 1996; 271: 22679-86.

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269(42): 26066-75.

Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; Nov 25;764(1-2):217-254.

Rutherford S, Johnson MP, Curtain RP, Griffiths LR. Chromosome 17 and the inducible nitric oxide synthase gene in human essential hypertension. *Hum Genet* 2001; 109: 408-15.

Sadovnikoff N and Gelman S. Renal protection. *Bailliere's Clinical Anaesthesiology.* 2000; 14(1): 161-171.

- Sakaguchi S, Furusawa S, Yokota K, Sasaki K, Takayanagi M, Takayanagi Y. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on lipid peroxide formation in liver caused by endotoxin challenge. *Pharmacol. Toxicol.* 2000; 86: 162-168.
- Sakuma I, Shundo H, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Nakamura T, Fujioka Y, Kitabatake A, Levi R. A chronic model of hypertension with increased sympathetic drive in the rat by inhibition of nitric oxide synthase, in *Biology of Nitric Oxide-3 Physiological and clinical aspects. Portland Pres.* 1994; 245-247.
- Saleh S, El-Demerdash E. Protective effects of L-Arginine against cisplatin-induced renal oxidative stress and toxicity: Role of nitric oxide. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2005; 97: 91-97.
- Samel S, Keese M, Lanig S, Kleczka M, Gretz N, Hafner M, Sturm J, Stefan P. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthesis influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats. *Shock.* 2003; 19(4): 378-382.
- Sanha E, Parlakpınar H, Cihan OF, Türköz, Y, Acet A. Effects of aminoguanidine against renal ischemia reperfusion injury in rats. *Cell Biochem. Func.* 2004; 22.
- Scaccini C, Chiesa G, Jiala I. A critical assessment of the effects of aminoguanidine and ascorbate on the oxidative modification of LDL: evidence for interference with some assays of lipoprotein oxidation by aminoguanidine. *J. Lipid. Res.* 1994; 3: 1085-1092.
- Schornagel JH, Mcvie JG. The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer Treat Rev.* 1983; 10: 53-57.
- Schramm L, Heidbreder E, Zimmermann J, Lopau K and Wanner C. Acute renal failure: Influence of nitric oxide on renal function. *Journal of Nephrology.* 1996; 9(3): 118- 125.
- Schrier WR, Wang W, Poole B and Mitra A. Acute renal failure: Definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of Clinical Investigation.* 2004; 114 (1): 5-14.
- Selvi M, Karataş F, Erbaş D, Coşkun Ş. Tavşanda L-NAME Uygulamasının Plazma, Kalp Dokusu NO ve MDA Seviyelerine Etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2007; 32 (4) ; 160-164.
- Sharma SP. Nitric oxide and the kidney. *Indian J. Nephrol.* 2004; 14: 77-84.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end products: a review. *Diabetol.* 2001; 44: 129-146.
- Sireli M, Bülbül A ve Güzel M. Kedilerde kronik böbrek yetmezliğinde kan nitrik oksit düzeyinin belirlenmesi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg*, 2002; 49 (2), 95-99.
- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry.* 1984; 22:1-15.

- Spallholz JE. Selenium and Glutathione Peroxidase: Essential Nutrient and Antioxidant Component of the Immun System. *Adv Exp Med Biol* 1990; 262: 145-58.
- Star RA. Intrarenal localization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1997; 24: 607-610.
- Stjernborg L, Persson L. Stabilization of S-adenosylmethionine decarboxylase by aminoguanidine. *Biochem Pharmacol*, 1993; 45:1174-6.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7773-77.
- Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuraya K, Hirakata H, Oishi R. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 451: 203-208.
- Sugiyama T, Miyamoto K, Ketagiri S. Fetal toxicity of aminoguanidine in mice and rats. *J Toxicol. Sci*, 1986; 11(3): 189-195.
- Sugiyama T, Miyamoto K, Ketagiri S. Histological studies on developing chick embryos treated with aminoguanidine sulfate. *J. Toxicol. Sci*, 1985; 10(2): 143-153.
- Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2000; 67: 591-602.
- Sultana F, Mehboobali N., et al. Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. *Biopharm. Drug Dispos*, 2001; 22: 169-178.
- Süzer Ö. Karaciğer Hastalıklarında İlaç Kullanımı ve Hepatotoksik Etkileri. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi 2002, 28: 37-42.
- Svensson F, Mett H, Persson L. CGP 48664, a potent and specific S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor: effects on regulation and stability of enzyme. *Biochem J*, 1997; 322: 297-302.
- Şendur N, Karaman G, Şavk H. Akut Metotreksat Toksikitesinin Erken Belirtisi; Deri Ülserleri. *T Klin Tıp Bilimleri*, 2002; 22: 593-596.
- Şener G, Ekşioğlu- Demiralp E, Çetiner M, ve ark. L-Carnitine Ameliorates Methotrexate-Induced Oxidative Organ Injury and Inhibits Leukocyte Death. *Cell Biology and Toxicology*, 2006; 22: 47-60.
- Şener G, Ekşioğlu-Demiralp E, Çetiner M, Ercan F, Yeğen BC. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulator effects. *Eur J Pharmacol.* 2006 Aug 7; 542(1-3):170-178.

Takeuchi H, Kosakai Y, Tsurui K, Hasegawa K, Horie T, Awazu S. Change in small intestinal brush border membranes of rats following methotrexate administration. *Pharmacol. Toxicol.* 1989; 65: 269-273.

Taminiau JAJM, Gall DG, Hamilton JR. Response of the rat small-intestine epithelium to methotrexate. *Gut.* 1980; 21: 486- 492.

Tekin NS. Metotreksat ile tedavi edilen psöriasis vulgarisli hastaların tedavi öncesi ve sonrası nitrik oksit düzeylerinin karşılaştırılması. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Ankara, 2000.

Thornalley PJ, Yurek-George A, Argirov OK. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 60: 55–65.

Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003; 419:31-40.

Tilling L, Townsend S, David J. Methotrexate and hepatic toxicity in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin Drug Invest*, 2006; 26: 55-62.

Tobias H, Auerbach R. Hepatotoxicity of long term methotrexate therapy for psoriasis. *Arch Intern Med.* 1973; 132: 391–396.

Tsurui K, Kosakai Y, Horie T, Awazu S. Vitamin A protects the small intestine from methotrexate-induced damage in rats. *J Pharmacol Exp Therap.* 1990; 253: 1278-1284.

Tuncay R, Ekşioğlu E, Gürçay E. Romatoid Artritli hastalarda ikinci basamak ilaç kullanım sürelerinin toplam hastalık sürelerine oranları ve ilaçların kesilme nedenleri. *Türk Fiz Tıp Rhab Derg*, 2006; 52: 158-62.

Turgut K, Maden M, Sen I and Çiftçi MK. Ultrasonographic evaluation of kidney damage in dog with gentamicin nephrotoxicity. *Tr. J. Vet. Anim. Sci*, 1995; 20: 367-373.

Turner CH, Owan I, Jacob DS, McClintock R and Peacock M. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone.* 1997; 21(6): 487-490.

Tümer C. Fokal serebral iskemide nitrik oksitin rolü. *Dicle tıp dergisi*. 2002; C:29 S:3

Türköz Y, ve Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center.* 1997; 4(4): 435-461.

Uraz S, Tahan V, Aygün C, et al. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1071–77.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol*, 2003; 189: 41-54.

Uz E, Öktem F, Yilmaz HR, Uzar E, Özgüner F. The activities of purine catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem*. 2005 Sep;277(1-2): 165-170.

Ünlüçerçi Y. The effect of aminoguanidine on diabetes induced inactivation of kidney Na⁺- K⁺ ATPase in rats. *Pharmacol. Res.*2001; 44(2): 95-98.

Van den Bongard HJGD, Manhot RAA, Beijnen JH et al. Successful rescue with leucovorin and thymidine in a patient with high-dose methotrexate induced acute renal failure. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001; 47: 537–540.

van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum*. 1998 Apr;27(5): 277-292.

Varma SD, Hegde KR. Lens thiol depletion by peroxynitrite. Protective effect of pyruvate. *Mol Cell Biochem*. 2007; 298: 199–204.

Vonen B, Morland J. Isolated rat hepatocytes in suspension: potential hepatotoxic effects of six different drugs. *Arch Toxicol*. 1984; 56: 33–37.

Wang GY, Ji B, Wang X, Gu JH. Anti cancer effect of iNOS inhibitor and its correlation with angiogenesis in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*2005; 11(5): 3830-3833. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 241-51.

Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, Silverman EK, Yandava CN, Israel E, Wand M, Drazen JM. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2043-47.

Wei CL, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Chronic administration of aminoguanidine reduced vascular nitric oxide production and attenuates liver damage in bile duct ligated rats. *Liver Int.*2005; 25: 647-656.

Weight SC and Nicholson ML. Nitric oxide and renal reperfusion injury: A review. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg*, 1998; 16: 98-103.

Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, et al. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer*. 2004; 100: 2222-32.

Wink Da, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-56.

Wolffenbuttel BHR, Huijberts MSP. Aminoguanidine, a potential drug for the treatment of diabetic complications. *Neth. J. Med.*1993; 42: 205-208.

Xiao-Ling C, Shan-Sheng H, Wen-Bin L, Dian-Hua W, Xin-Liang W. Inhibitory effect of aminoguanidine on bleomycine-induced pulmonary toxicity in rat. *Acta Pharmacol. Sin.* 2001; 22(8): 711-715.

Xu DL, Martin PY, St. John J, Tsai P, Summer SN, Ohara M, Kim JK, Schrier RW. Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats. *Am J Physiol* 1996; 271: 1739-45.

Yagi K. Assay for blood plasma or serum, In: Colowick Sp, Kaplan No (Eds). *Methods Enzymol* 1984; 105: 328-31.

Yamauchi A, Takei I, Makita Z, Nakamoto S, Ohashi N, Kiguchi H, Ishii T, Koike T, Saruta T. Effects of aminoguanidine on serum advanced glycation endproducts, urinary albumin excretion, mesangial expansion, and glomerular basement membrane thickening in otsuka longevans tokushima fatty rats. *Diabet. Res. Clin. Prac.* 1997; 34: 127-133.

Yang CW, Yu CC, Ko YC and Huang CC. Aminoguanidine reduces glomerular inducible nitric oxide synthase (iNOS) and transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) mRNA expression and diminishes glomerulosclerosis in NZB/W F1 mice. *Clin. Exp. Immunol.* 1998; 113: 258-264.

Yeğen BC, Jahovic N, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Sener G, "Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats" *Cell Biochem and Funct.* 2004; 22: 169-178.

Yılmaz M, Ara C, Işık B, Yılmaz S, Coban S, Karadağ N, Polat A, Duzova H. The effect of aminoguanidine against cholestatic liver injury in rats. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25: 625-632.

Yılmaz O. Probiyotiklerin ratlarda metotreksat toksisitesi üzerine olan etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Isparta, 2008.

Yu PH, Zuo DM. Aminoguanidine inhibits semicarbazide sensitive amine oxidase activity: implication for advanced glycation and diabetic complications. *Diabetologia*, 1997; 40: 1243-1250.

Yüncü M, Kanter M; Farelerde metotreksatın ince bağırsak mukozasında yaptığı hasara karşı E vitamininin koruyucu etkisi: Elektron mikroskopik çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 2006; 4(2): 1-6.

Zhang L, Looney CG, Qi W-N et al. Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Appl Physiol.* 2003; 94: 1473-1478.

Zhou FQ. Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions. *Acta Pharmacol Sin.* 2001; 5: 385-392.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Belkıs BİRDEN

Doğum yeri ve Yılı: Kırıkkale, 1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise: Alparslan Süper Lisesi, 1998-2002

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2003-2007.

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 2007-...

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem II Bilimsel Hazırlık Sınıfı (Eylül 2007-Temmuz 2008).

Kongre-Sempozyum, Kurs Katılımı:

II. Uluslararası Karaciğer Sempozyumu (SDÜ Isparta 2009).

Araştırma Planlama ve Tıbbi İstatistik Kursu (SDÜ Isparta 2009).

Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu VII (Gazi Üniversitesi 2009).

X. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Çeşme 2010).