T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA DENEYSEL GENTAMİSİN NEFROTOKSİSİTESİNDE OKSİDATİF STRESİN ROLÜNÜN VE OLASI OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Fadime Özge AYGÜN

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

1. TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Füsun Zeynep AKÇAM

2. TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Onur KAYA

ISPARTA

2010

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA DENEYSEL GENTAMİSİN NEFROTOKSİSİTESİNDE OKSİDATİF STRESİN ROLÜNÜN VE OLASI OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Fadime Özge AYGÜN

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

1. TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Füsun Zeynep AKÇAM

2. TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Onur KAYA

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "1778-TU-09" proje numarası ile desteklenmiştir.

ISPARTA

2010

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince ve tez çalışmalarımda büyük ilgi ve desteklerini gördüğüm, bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, değerli tez hocalarım Doç. Dr. Füsun Zeynep Akçam'a ve Yrd. Doç. Dr. Onur KAYA'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik mikrobiyoloji ihtisas eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ve eğitimimde emeği geçen Ana Bilim Dalı başkanımız sayın hocam Prof. Dr. Güler YAYLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasında katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji A.D'dan Yrd. Doç. Dr Efkan UZ'a, Biyokimya A.D'dan Doç. Dr. Recep Sütçü'ye ve projemize desteklerinden dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje yönetim birimine teşekkür ederim.

Eğitimim süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım Dr. Cemile UYAR başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma ve beni yetiştiren her konuda yanımda olduklarını hissettiren çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Fadime Özge AYGÜN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **v**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
RESİMLER DİZİNİ ..... **vi**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1. Aminoglikozidler 2
2.1.1. Yapı ve Kimyasal Özellikleri 2
2.1.2. Etki Mekanizması 2
2.1.3. Farmakokinetik-Farmakodinamik 3
2.1.4. Aminoglikozid Dozu 4
2.1.5. Antimikrobiyal Aktivite 5
2.1.6. Klinik Kullanım 6
2.1.7. Yan Etkiler 6
2.1.8. Aminoglikozidlerin Direnç Mekanizmaları 7
2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri 8
2.2.1. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları 9
2.2.2 Serbest Radikallerin Hücrelerdeki Etkileri 9
2.2.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu 9
2.2.4. Serbest Radikallerle Protein ve Nükleik Asitlerde Oluşan Değişiklikler 10
2.3. Antioksidan Sistem 10
2.3.1. Nonenzimatik Antioksidanlar 10
2.3.2. Enzimatik Antioksidanlar 11
2.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) 11
2.3.2.2. Katalaz (CAT) 11
2.3.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutatyon Redüktaz (GR) 12
2.4. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) 12
2.4.1. CAPE'nin Kimyasal Özellikleri ve Yapısı 12
2.4.2. CAPE'nin Fonksiyonel Özellikleri ve Antioksidan Etkisi 13

3. MATERYAL ve METOD 14
3.1. Materyal 14
3.1.1. Deney Hayvanları 14
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 14
3.1.3. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler 14
3.1.4. Deneyde Kullanılan Cihazlar 15
3.2. Metod 15
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması 15
3.2.2. Kan Örneklerinin Alınması 16
3.2.3. Böbreklerin Çıkarılması 16
3.2.4. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için Hazırlanması 16
3.2.5. Dokularda Biyokimyasal Analizler 17
3.2.6. Histopatolojik İnceleme 19
3.3. İstatistiksel Analiz 20
4. BULGULAR 21
4.1. Biyokimyasal Parametreler 21
4.1.1. Bun-Kreatinin Değerleri 21
4.1.2. Böbrek Dokusunda Ölçülen MDA, NO, CAT, SOD, GSH-Px Enzim Aktivite Değerleri 22
4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları 26
5. TARTIŞMA 31
6. SONUÇ 36
7. ÖZET 37
8. SUMMARY 38
9. KAYNAKLAR 39

SİMGELER ve KISALTMALAR

GM : Gentamisin

O_2^- : Süperoksit anyonu

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

OH : Hidroksil iyonu

CAPE : Kafeik asit fenetil ester

MDA : Malondialdehit

SOD : Süperoksit dismutaz

CAT : Katalaz

GSH-Px : Glutatyon peroksidaz

XO : Ksantin oksidaz

NO : Nitrik oksit

SOR : Serbest oksijen radikalleri

i.p. : İntraperitoneal

A.D. : Anlamlı değil

SF : Serum fizyolojik

RTA : Renal tubüler asidoz

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Aminoglikozidlerin dozları 5
Tablo 2. Deneyde kullanılan cihazlar 15
Tablo 3. Histolojik parametrelerin skorlaması 20
Tablo 4. Sıçanların BUN ve kreatinin değerleri 21
Tablo 5. Sıçan böbrek dokusunda ölçülen MDA ve NO seviyeleri ile enzim aktiviteleri. 22
Tablo 6. Çalışma gruplarının böbreklerinin histopatolojik değerlendirme sonuçları 26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Aminoglikozidlerin etki mekanizması 3
Şekil 2. Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in kimyasal yapısı 12
Şekil 3. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki MDA aktivitesi 23
Şekil 4. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki NO aktivitesi 23
Şekil 5. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki SOD aktivitesi 24
Şekil 6. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki CAT aktivitesi 25
Şekil 7. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki GSH-Px aktivitesi 25

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Kontrol Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları 27
Resim 2. CAPE Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları. 28
Resim 3. GM Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları 29
Resim 4. GM + CAPE Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları 30

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Aminoglikozidler, günümüzde klinik uygulamalarda sık olarak kullanılmaktadır. Böbrek fonksiyonları normal kişilerde yarılanma ömrü (t1/2) 1.5-3.5 saattir. Yaklaşık %99'u idrarla atılırken kalanı dışkı ve tükrükle elimine olur. Alınan dozun %90'ı 24 saatte idrara geçerken yeniden emilim ve sekresyon siklusu ile böbrek dokusunda eliminasyon yarı ömrü 30-700 saattir. Çoğu Gram (-) aerobik çomaklara karşı etkilidir. Aminoglikozidlerin kullanımlarındaki en önemli kısıtlayıcı özellik toksisiteleridir. Nefrotoksisite, ototoksisite, nöromuskuler blokaj başlıca yan etkileridir. Nefrotoksisite en önemli yan etkisidir.

Gentamisin (GM)'e bağlı gelişen böbrek hasarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte deneysel çalışmalar serbest oksijen radikallerinin toksisitede rol oynadığını öne sürmektedir. Aminoglikozidler, vankomisin ve sisplastin gibi çeşitli nefrotoksik ilaçlara bağlı gelişen böbrek hasar modellerinde serbest oksijen radikallerinin hücre ölümüne neden olabildiği ve nefrotoksik etki oluşumunda oksidatif stresin ön planda olduğu gösterilmiştir (4-5). Aynı zamanda yapılan çalışmalarda antioksidanların kullanımı ile nefrotoksisitenin azaldığı gösterilmiştir.

Kafeik asit fenetil ester (CAPE); arı kovanlarından elde edilen propolisin en potent komponenti olup antioksidan, antienflamatuvar, sitostatik, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve immunmodülatör özellikleri olduğu bilinen bir moleküldür (10,11). Yaklaşık olarak 10 μmol/L konsantrasyonda *in vitro* koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke ettiği bildirilmiştir (12).

Bu çalışmada, sıçanlarda oluşturulan deneysel GM nefrotoksisitesinde oksidatif stresin rolünü ortaya koymayı ve antioksidan özelliği bildirilen CAPE'nin olası etkinliğinin histopatolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler; *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi funguslardan elde edilen doğal ya da semisentetik antibiyotiklerdir. Elde ediliş ve klinik kullanıma sunuluş tarih sırasına göre; streptomisin (1944), neomisin (1949), kanamisin (1957), gentamisin (1963), tobramisin (1967), sisomisin (1970), dibekasin (1971), amikasin (1972), netilmisin (1975), izepamisin (1978), arbekasin (1990), bu grup antibiyotikleri oluşturur. Paromomisin ve spektinomisin aminoglikozid grubunda ele alınan ancak aminosiklitol antibiyotiklerdir. Aminoglikozidler daha yeni ve daha az toksik antibakteriyal ajanların rekabetine karşın bugün hala tek başına veya kombine edilerek aerop Gram-negatif basillerin etken olduğu ağır enfeksiyonlarda ve beta-laktamlarla birlikte stafilokok ve enterokok gibi Gram-pozitif bakterilerin etken olduğu önemli birçok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Paromomisin protozoon, spektinomisin gonokok, streptomisin tüberküloz tedavisinde etkili antibiyotiklerdir. Diğer birçok antibiyotikle karşılaştırıldıklarında özellikle kombine kullanımında direnç gelişimi daha nadirdir (1,2,3).

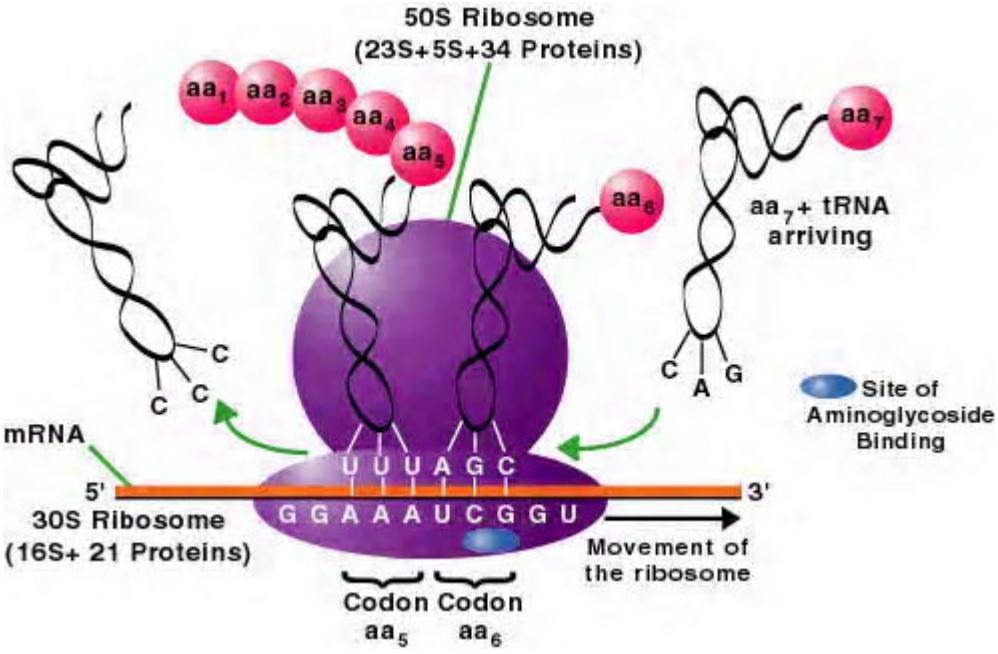
2.1.1. Yapı ve Kimyasal Özellikleri

Aminoglikozidlerin kimyasal yapıları; genellikle santral yerleşen ‘‘hekzoz’’ nükleusa yani aminosiklitol halkasına iki veya daha fazla aminoşekerin glikozid bağlarıyla bağlanmasından oluşmuştur. pH 6-8 arasında oldukça stabildirler. pH 7.4’te ise güçlü pozitif yüke sahip olurlar (katyonik özellik). Bu güçlü polariteleri nedeniyle, hücrelerdeki anyonik moleküllere bağlanırlar (lipopolisakkarit ile hücre içindeki DNA ve fosfolipitlere). Suda çok iyi erirler, organik çözücülerde erimezler. Alkali pH’de etkileri artar, asid pH’de ise azalır (4).

2.1.2. Etki Mekanizması

Aminoglikozidler duyarlı bakteri hücresine hızlı bakterisidal etkilidir. Bu etkide bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etme ve mRNA’daki genetik bilginin doğru okunuşunu azaltma, bozma fonksiyonlarının önemi büyüktür. Bu

etkileri yapabilmek için ribozomal 30S alt biriminin mRNA kodlayan bölgesine bağlanırlar, bu bölge mRNA'nın translasyonunda önemli bir kodon ve tRNA translasyonunda önemli bir antikodon bölgesidir. Bu bölge 30S alt biriminin 16S bölgesidir. Burada peptid sentezinin başlangıç basamağı engellendiği için peptid zincirinin uzaması da bozulur. Bütün bu bilgilere karşın aminoglikozidlerin bakterisidal etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılarının polar oluşu nedeniyle bakteri hücresine ancak aktif transportla girebilirler. Aminoglikozidler konsantrasyona bağlı bakterisidal etki (doz artıkça öldürme gücü artar) ve post antibiyotik etkileri (PAE) (doz artıkça PAE artar) nedeniyle günde tek doz kullanım için uygundur. Günlük doz bir seferde uygulanır. Bu durumda toksik etkilerin artmadığı saptanmıştır (5).



Şekil 1. Aminoglikozidlerin etki mekanizması

2.1.3. Farmakokinetik-Farmakodinamik

Oral yoldan alındıklarında emilimleri çok zayıftır. Kas-içi uygulamada emilim iyidir ve 30-90 dakikada serum tepe düzeyine ulaşırlar. Ekstraselüler alanda hızla yayılırken dokulara girişi yeterli olmamaktadır. Santral sinir sistemi, solunum yolları, prostat ve göz içinde seviyeleri istenen seviyenin altında iken idrarda, böbrek dokusunda, iç kulak endolenf ve perilenf sıvısında yoğunlaşırlar. BOS geçişleri

inflamasyon varlığında bile çok yeterli değildir. İntratekal verilince ventrikül içine ulaşamazlar. Sinovyal sıvıya, kemiğe, peritona iyi geçerken safraya geçişleri yetersizdir. Yağ dokusuna giremezler. Vücuttan metabolize olmadan idrarla atılırlar. Böbrek fonksiyonları normal kişilerde yarılanma ömrü (t1/2) 1.5-3.5 saattir. Yaklaşık %99'u idrarla atılırken kalanı dışkı ve tükrük ile elimine olur. Alınan dozun %90'ı 24 saatte idrara geçerken yeniden emilim ve sekresyon siklusu ile böbrek dokusunda eliminasyon yarı ömrü 30-700 saattir. Böbrek yetmezliği olanlarda değişik şekillerde doz ayarlama şemaları geliştirilmiş olsa da bu hastalarda aminoglikozid seviyelerini izlemek en iyi yöntemdir. Günde tek doz aminoglikozid uygulaması önemli bir adım olarak gündeme gelmiştir. Bu uygulama üç önemli temele dayanmaktadır:

1.Aminoglikozidlerin bakterisidal etkisi konsantrasyona bağlıdır. Aminoglikozidlerin tepe konsantrasyonu/minimum konsantrasyon (MİK) oranı yükseldikçe öldürme hızıda artar.

2.Aminoglikozidler Gram (-) çomaklar için önemli düzeyde post-antibiyotik etki gösterirler. MİK değeri altında bile üreme bir süre daha inhibe edilir. Bu sürenin 1-13 saat arasında değişebildiği belirlenmiştir.

3.Aminoglikozidlerle karşılaşan bakterilerin bir kısmı temas sonrası bir süre (6-16 saat) antibiyotiğin hücre içine girişini sağlayan aktif sistemlerini yavaşlatarak adaptif direnç oluştururlar. Günde tek doz uygulama bu direnç gelişimini de engeller. Bu nedenlerle günde tek doz aminoglikozid uygulaması oldukça etkin bulunmuştur. Ayrıca bu uygulamanın toksik etkileri de azaltabileceği düşünülmüştür. Uygulamada geleneksel uygulama kadar etkili, daha ekonomik ve uyumu daha kolay bulunmuştur (6,7,8,9,10).

2.1.4. Aminoglikozid Dozu

Aminoglikozidlerin klasik dozları tablo 1'de verilmiştir. Yükleme dozu renal fonksiyondan bağımsızdır ve hızla tedavi edici düzeylere ulaşmak amacıyla verilir. Tedavi başlangıcında ilk 48 saatte ve 3-4 günde bir aminoglikozidlerin etkin kan düzeyinin saptanması ve toksisitenin izlenmesi açısından yüksek ve düşük düzeyleri

ölçülmelidir. Yüksek düzeyi dozdan 30 dakika sonra, düşük düzeyleri ise ikinci dozdan önce alınan serum örneklerinde ölçülür (9).

Tedavi için önerilen önce bir yükleme dozunu takiben idameye geçilmesi ve idame tedavisi sırasında aminoglikozid seviyelerinin takip edilerek doz ayarlaması yapılmalıdır. Kısa süreli tedavide, genç, renal fonksiyonları normal hastalarda izlemin gerekliliği yoktur. Fakat diğer, özellikle riskli gruptaki hastalarda izlem önerilmektedir. Serum tepe düzeyi için, 30 dakika süren damar içi infüzyonu takiben 30. dakikada, kas içi enjeksiyon sonrası 1 saate alınmalıdır.

Aminoglikozidlerin kan seviyelerinin monitorize edilmesi pratikte çok kullanılan bir yöntem değildir. Klinik kullanımda en pratik yaklaşım serum seviyeleri ile dozun hesaplanmasıdır. Pratikte kreatinin miktarıyla verilecek doz ya da dozlar arası süre kabaca hesaplanabilir. Dozlar arası süre (Dozlar arası süre: Serum kreatinin seviyesi x 8) uzatılabilir ya da verilecek doz azaltılabilir (Verilecek doz: Normalde önerilen doz/serum kreatinin seviyesi) (1,3,9).

Tablo 1. Aminoglikozidlerin dozları

	Yükleme dozu (mg/kg)	Toplam (mg/kg)	Bölünmüş doz
Gentamisin	2	5.1	1.7x3
Tobramisin	2	5.1	1.7x3
Netilmisin	2	6	2x3
Amikasin	7.5	15	7.5x2
Streptomisin	7.5	15	7.5x2
İzepamisin	-	8-15	-

2.1.5. Antimikrobiyal Aktivite

Çoğu Gram (-) aerobik çomaklara etkilidirler. Enterobacteriaceae ailesi, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* cinsi bakteriler değişen oranlarda aminoglikozidlere duyarlıdırlar. Gram pozitiflere etkinlikleri daha kısıtlı da olsa stafilokok, streptekok, *Listeria spp*. ve enterokok enfeksiyonlarında kombinasyonlarda etkili bulunmuşlardır (1,9).

2.1.6. Klinik Kullanım

Çok farklı alanlarda kullanılmaktadırlar. Sepsis başta olmak üzere ağır enfeksiyonlarda, ampirik başlangıç tedavisinde bir beta laktam antibiyotikle kombinasyonları kullanılır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın etken olduğu ciddi enfeksiyonlarda mutlaka tedaviye eklenmeleri gerekir. İntraabdominal enfeksiyonlarda antianaerobik ajanlarla, Endokardit proflaksisi için ürogenital ve intestinal sistem girişimlerinde beta laktamlarla birlikte kombine olarak uygulanabilirler (3). Üriner sistem enfeksiyonlarında monoterapi olarak kullanılabilirler. Önceki yıllarda febril nötropenik hastanın ampirik tedavisinde kombinasyon tedavisinde bulunurlardı.

Amikasin sıklıkla diğer aminoglikozidlere dirençli bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda ve atipik mikobakteri enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (1,3).

2.1.7. Yan Etkiler

Aminoglikozidlerin güvenli kullanılabileceği aralık çok dardır ve kullanımlarındaki en önemli kısıtlayıcı özellik toksisiteleridir. En sık nefrotoksisite, ototoksisite, nöromuskuler blokaj meydana gelir. Nefrotoksisite tüm aminoglikozidlerde gelişebilen ve aminoglikozid kullanımında %5-10 oranında saptanabilen bir yan etkidir (2,9). Aminoglikozidler, tromboksan B2 ile renal vazokonstrüksiyona neden olurlar ve özellikle ilaçları absorbe edip lizozomda depolayan proksimal tubülde direkt hücresel toksisite yaparlar. Böylelikle tubüler nekroz, tubüler atrofi, intertubüler myoloid cisimler ve interstisyel nefrit gelişebilir (11,12,13,14). Serum üre, kreatinin artışı, proteinüri ve genelde non-oligürik böbrek yetmezliği gelişir. Toksik etki özellikle proksimal tubülusta izlenir ve hücre içi fosfolipaz aktivitesini engellediğinden toksisite gelişmektedir (15,16). Erken dönemde idrarda silendir yapıları görülebilir. Oligoürik dönem gelişirse geri dönüşüm olmayabilir. Daha erken evreler geri dönüşümlüdür. Nefrotoksik etki en fazla gentamisin kullanımıyla, daha sonra sırasıyla tobramisin, amikasin ve netilmisin tedavileri sonrasında ortaya çıkar. Nefrotoksik etkiyi artıran, hastaya ve tedavi şekline ait bazı özellikler vardır. Şöyle ki; aminoglikozidin serum düzeyi fazla ise, tedavi süresi 10 günü aşarsa, furosemid gibi bazı diüretiklerle birlikte

kullanılırsa, sikloserin, amfoterisin B, vankomisin, sefalotin gibi diğer nefrotoksik ilaçlarla birlikte kullanılırsa nefrotoksik etki daha fazla ortaya çıkar. Diğer yandan yaşlılarda, böbrek ve karaciğer yetmezliği olanlarda, dehidratasyon durumunda nefrotoksik etki artar. Bu nedenlerle özellikle toksisite yönünden yüksek riskli hastalarda aminoglikozid serum düzeyinin izlenmesi gerekir. Food and Drug Administration (FDA) risk kategorisinde D grubunda yer alırlar ve gebelikte kullanımları önerilmez (1,2,3,16,17).

2.1.8. Aminoglikozidlerin Direnç Mekanizmaları

1-Aminoglikozid Yapısını Değiştiren Enzimler: Aerop bakteriler arasında aminoglikozidlere karşı direnç oluşumunda en önemli mekanizma enzimatik inaktivasyondur. Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler sıklıkla plazmid veya transpozon kökenli olup çoğu transpozonlarca taşınır. Sayıları iki düzineden çok olan bu enzimler üç önemli reaksiyondan sorumludur: *N*-asetilasyon, *O*-nükleotidilasyon, *O*-fosforilasyon. Bu genel reaksiyonların her biri için çeşitli enzim grupları var olup bunlar asetil transferazlar (AAC), adenil transferazlar (ANT) ve fosfotransferazlar (APH) ‘dır. Bu enzimlerden ANT ve APH hidroksil gruplarını, AAC ise amino gruplarını etkiler. Antibiyotik moleküllerine asetil, adenil ve fosforil gruplarını etkileyerek ilacın etkinliğini yitirilmesine neden olur. Antibiyotiğin yapısının değiştirilmesi, onun hücre içine alınmasını ve protein sentezini önlemesini bozar. Enzimlere bağlı olarak gelişen direnç oranları coğrafi farklılıklar gösterir (7).

Enterokok gibi sağaltımı zor olan enfeksiyonlara sebep olan bakteriler beta-laktam ve sülfonamidlerin yanı sıra aminoglikozidlere de doğal dirençlidir. Özellikle gentamisine yüksek düzeyde dirençten modifiye bir enzim sorumludur (2,3).

2-İlacın Sitoplazmaya Geçişinin Engellenmesi: Pozitif yüklü bileşikler olan aminoglikozidler, hücre içine aktif ve oksijene bağımlı transport sistemi ile girer. Kromozomal mutasyon sonucu iç ve dış zarda meydana gelen değişikler, ilacın içeri alınmasını bozar. Bu olay tüm aminoglikozidler için söz konusudur; ancak doğada yaygın değildir. Oksijene bağımlı aktif transport sistemi anaeroplarda bulunmadığı için bu mikroorganizmalar aminoglikozidlere doğal olarak dirençlidir.

3-Ribozomal Hedef Değişiklikleri: Özellikle streptomisin direncinde önemlidir. 30S ribozomal alt birimde S12 proteinindeki mutasyon sonucu streptomisin hedefe bağlanamaz. Bu tür streptomisin direnci, enterekok izolatları arasında önemlidir. Gentamisin, tobramisin, amikasin gibi diğer aminoglikozidlere ribozomal direnç daha nadirdir (7).

2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller; yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektronun olduğu atom veya atom gruplarıdır (17,18,19). Bu eşleşmemiş elektron nedeni ile serbest radikal molekülü kararsız konumdadır ve kararlı yapı kazanabilmesi için elektronunu başka bir elektronla eşleştirmesi gerekir. Bu nedenle serbest radikalin kimyasal aktivite potansiyeli yüksektir (20,21,22,23). Bu oksidan ürünlerin arttığı durumlarda hedef moleküller olan membran yapısındaki fosfolipidler, glikolipidler, membran proteinleri ve doymamış yağ asitleri oksidatif strese maruz kalırlar (24,25,26). Sonuçta metabolik bozukluklar, hücre hasarı ve hatta ölüme yol açarlar (27).

Oksidatif stres reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidan yönde bozulması ile gerçekleşir (28). Oksidatif stres doğal bir süreç olup bu stresi kontrol altında tutan özelleşmiş mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmaların yetersizliği durumlarında oksidatif hasar oluşur (29).

Oksidatif streste etkili olan reaktif oksijen türleri olarak süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (RO_2), hidroperoksil (HRO_2^-) gibi serbest radikaller ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit (HOCl) gibi nonradikal türleri sayabiliriz. Reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit (NO_2^-) gibi serbest radikaller ve peroksinitrit ($ONOO^-$), nitröz oksit (HNO_2), alkil peroksinitrat (RONOO) gibi nonradikallerdir. Serbest oksijen radikalleri (SOR) veya reaktif nitrojen türlerinin oluşması radikal zincir reaksiyonları ile diğer ürünlerin üretimine yol açarlar. Süperoksit radikali (O_2^-), organizmada NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, siklooksijenaz gibi çeşitli oksidazlar aracılığı ile ve bazı koşullarda endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile oksijenin bir elektron redüksiyonu sonucu oluşur. Ayrıca ATP sentezi için gerekli olan normal oksidatif fosforilasyon esnasında

mitokondrial elektron transport zinciri tarafından üretilir. Normal şartlar altında O_2^- antioksidan savunma mekanizmaları tarafından hızla elimine edilir. O_2^- mitokondride manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD), sitoplazmada bakır süperoksit dismutaz (Cu-SOD) ile H_2O_2'e dönüştürülür. H_2O_2 ise mitokondride glutatyon peroksidaz (GSH-Px), lizozomda katalaz (CAT) tarafından H_20 ve O_2'e parçalanır. H_2O_2 ayrıca Fe, Cu gibi elementlerin varlığında reaktif hidroksil (OH) radikaline dönüştürülebilir (Fenton reaksiyonu) (30).

2.2.1. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Alkol, uyuşturucu gibi bağışıklık yapan maddeler, radyasyon, hava kirliliği, pestisitler, solventler, anestezik maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara ve antineoplastikler ekzojen radikal kaynakları olarak sayılabilir. Mitokondrial elektron transport sistemi, iskemi, travma, intoksikasyona bağlı oksidatif stres durumları, peroksizom enzimleri, tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, endoplazmik retikulum ve nukleus membranındaki elektron transport sistemleri, NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz gibi hücre içi enzimler de endojen radikal kaynaklarındandır (31).

2.2.2 Serbest Radikallerin Hücrelerdeki Etkileri

Fizyolojik şartlarda oluşan reaktif oksijen türleri; sinyal proteinleri, fagositozdaki savunma mekanizmaları, nötrofil fonksiyonları gibi olaylara müdahil olur. Aşırı oluşan oksidatif stres ise proteinler, lipidler ve DNA üzerinde zararlı etkiler yapar (30).

2.2.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

Lipidler, biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Özelikle hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri serbest oksijen ürünleri ile yüksek oranda tepkimeye girer ve peroksidasyon meydana gelir. Membran akışkanlığını sağlayan bu doymamış yağ asitlerinin hasarı sonucu akışkanlıkta azalma olur. Lipid peroksidasyonu sırasında biyolojik yapılardan

kolayca tespit edilebilen ve peroksidatif hasarın belirteci olan malondialdehit (MDA) oluşur (32).

2.2.4. Serbest Radikallerle Protein ve Nükleik Asitlerde Oluşan Değişiklikler

Protein oksidasyonu; reaktif oksijen türleri ve oksidatif stresin ikincil ara ürünlerinin proteinlerin kovalent modifikasyonuna neden olması ile oluşur. Proteinlerdeki bu değişiklikler sonrasında çeşitli hücre fonksiyonları (sinyal iletimi mekanizmaları, transport ve enzim sistemleri) etkilenir (33). Ayrıca DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar da serbest oksijen türlerinden etkilenirler (34). DNA molekülünün hasarı kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenez, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara yol açar (35).

2.3. Antioksidan Sistem

Antioksidan sistemde görev yapan moleküller; organizmada sentezlenen (endojen) veya dışarıdan alınan (ekzojen), oksidan molekülerin hücreye zarar vermesini önleyen, enzimatik veya nonenzimatik yapılardır (36).

2.3.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

Vitamin C: Nitrik oksit sentaz tetrahidrofolatı stabilize ederek nitrik oksit (NO) üretimini arttırır (15,30).

Vitamin E: Yağda çözünen bir vitamin olup lipid peroksidasyonunu önler (19,30).

β-Karoten: Serbest radikalleri temizler, peroksitleri inaktif hale getirir (37,38).

Koenzim Q10: Yağda çözünen bir antioksidan olup O_2^{-}'i temizleyerek endotelyal disfonksiyonu azaltır (20,30).

Serüloplazmin: İki değerlikli demirin üç değerlikli demire yükseltgenmesini böylece fenton reaksiyonunu inhibe eder. Serbest radikal oluşumu da inhibe edilmiş olur (39).

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak fenton reaksiyonunu önler (40).

Melatonin: Triptofandan sentezlenir, lipofiliktir, OH radikalini temizler (41).

Glutatyon (GSH): Tiyol grubu içeren bir tripeptiddir. Hücredeki önemli fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi, enzim aktivitesi regülasyonu gibi) yanı sıra antioksidan olarak da görev yapar (42). Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girip oksidatif hasara karşı koruma yapar. Karaciğer vücuttaki glutatyonun en önemli kaynağıdır (43). Oksidatif stresin ölçümünde kullanılan bir antioksidan olup, redükte glutatyon/okside glutatyon oranı oksidatif streste azalır (44).

Diğer nonenzimatik antioksidanlar α-lipoik asit, bakır, çinko, selenyum gibi elementler, folik asit, ürik asit, albumin gibi kofaktörler, B1, B2, B6, B12 gibi vitaminlerdir (30).

2.3.2. Enzimatik Antioksidanlar

2.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

O_2^- anyonunun H_2O_2'ye dismutasyonunu gerçekleştiren enzimdir (45).

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Bu tepkime oksidatif strese karşı savunmayı ilk olarak başlatır (26). Bu tepkime sonucunda oluşan ürünler ya lizozomlardaki katalaz (CAT) tarafından ya da mitokondrideki glutatyon peroksidaz tarafından H_2O'ye detoksifiye edilir (30).

2.3.2.2. Katalaz (CAT)

Glikoprotein yapıda bir hemoprotein olup, H_2O_2'nin yüksek yoğunlukta olduğu durumlarda yüksek aktivite gösterir (46). H_2O_2'yi suya dönüştürür (30).

2.3.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutatyon Redüktaz (GR)

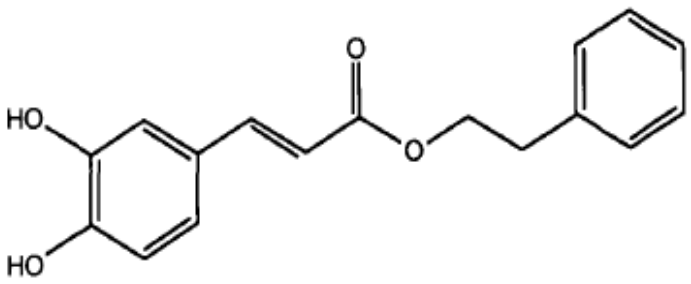
GSH-Px, yapısında selenyum metali bulunan bir metalloenzimdir. Redükte glutatyonu okside glutatyona dönüştürürken aynı zamanda H_2O_2'i de suya çevirir. Okside glutatyon ise glutatyon redüktaz (GR) enzimi aracılığı ile NADPH kullanılarak yeniden redükte glutatyona dönüştürülür (44). Ortamda H_2O_2 düşük yoğunlukta ise GSH-Px, CAT'a göre daha aktiftir (26).

2.4. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

CAPE, bal arılarının ürettiği propoliste bulunan flavonoid benzeri bir yapıya sahip, antienflamatuvar, immünomodülatör, antioksidan ve apoptozu düzenleyici özelliklere sahip olan aktif bir komponenttir (47) Propolisin yapısında 180'den fazla madde saptanmıştır (11). Bu saptanan komponentlerin içerisinde flavanoidler, kafeik asit ve esterleri en yoğun olarak bulunan ve aktif kısmı oluşturan maddelerdir (48,49,50). CAPE ayrıca kafeik asit ve fenetil alkolün asitle esterifikasyonu sonucu kimyasal olarak sentezlenebilir (51).

2.4.1. CAPE'nin Kimyasal Özellikleri ve Yapısı

CAPE iki halkasal yapıdan oluşmaktadır (Şekil 2) (52). Bu halkalardan birinde molekülün neredeyse tüm kimyasal özelliklerini taşıyan fonksiyonel 2 adet OH grubu mevcuttur ve bunlar aktif olarak elektron alıp vererek oksidasyon ve redüksiyon yaparlar. Molekül ayrıca uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon gruplarından dolayı lipofilik özellik taşır (12,48). Lipofilik özeliği nedeni ile hücre membranlarından geçişi ve ilgili vücut bölgesine taşınması oldukça kolaydır (53).



Şekil 2. Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in kimyasal yapısı (52).

2.4.2. CAPE'nin Fonksiyonel Özellikleri ve Antioksidan Etkisi

CAPE'nin 5-alfa redüktaz, proteaz, ornitin karboksilaz, Human Immunodeficiency Virus 1 integraz gibi enzimleri inhibe etme özelliği mevcuttur (12,53,54,55). Ayrıca Nükleer Faktör Kappa-B'nin (nükleer transkripsiyon faktörü) aktivasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder (56). Nükleer Faktör Kappa-B bağışıklık sistemi, inflamatuvar yolak ve apoptozda önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (57,58).

Reaktif oksijen radikalleri (peroksil, hidroksil radikal, süperoksit anyon) organizmada temel olarak araşidonik asit yolu, ksantin oksidaz sistemi ve aktive nötrofillerden üretilir. Yaklaşık olarak 10 mikromol/L'lik konsantrasyonda *in vitro* ortamda nötrofiller veya ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen radikallerini inhibe eder (47). Ksantin oksidaz (XO) pürin yıkımının son basamağını oluşturan enzim olup en önemli serbest radikal kaynaklarından biridir (59). İskemik ortamda adenozin trifosfattan hipoksantin oluşur, hipoksantin de ksantine indirgenir. Reperfüzyon olduğunda ise bu fazla üretilen ksantin, XO sayesinde ürik asite dönüştürülür. Bu esnada ise O_2^- anyonu oluşur. XO inhibitörlerinden olan CAPE ile yapılan çalışmalar bu maddenin iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidan yönünü ortaya çıkarmıştır (60,61,62).

Lipid peroksidasyonunda ilk oluşanlar hidroksiperoksitlerdir ve daha sonra aldehitlere dönüştürülürler. Araşidonik asit ise izoprostanlara dönüştürülür. Poliansatüre yağ asitlerinin denatürasyonlarının son ürünü MDA'dır (47). CAPE, linoleik asit ve araşidonik asitin 5-lipooksijenaz enzimi ile oksijenasyonunu inhibe eder (63,64). Streptozosin kullanılarak diyabet geliştirilen sıçanların karaciğer MDA düzeyinin ölçüldüğü bir çalışmada, diyabetik gruptaki sıçanlarda kontrol grubuna göre MDA düzeyinde artış olduğu, CAPE uygulanan grupta ise kontrol grubu ile benzer seviyelerde kaldığı rapor edilmiştir (47,48).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Biyokimya Anabilim Dallarının laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1778-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan onay alınarak etik kurallara uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarından temin edilen, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen toplam 40 adet dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar çalışma süresince standart ışık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) ve ısı (25 C^0)'da tutuldu. Sıçanların her bir grubu ayrı kafeslere konarak yeterli miktarda içme suyu ve standart sıçan pellet yemi verildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Biyokimyasal ölçümler için kullanılan kimyasal maddeler; Folin & Ciocalteus's Phenol Reagent (2N), kloroform, n-Butanol, etanol (Merck), glycine (amino asetic acid; glycocoll; $C_2H_5N0_2$), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form NADPH; $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$), nitroblue tetrazolium (NBT C40H30C12N10O6), Xanthine ($C_5H_4N_4O_2$), Xanthine Oxidase (Sigma), gentamisin flakon (Genta 80 mg, İbrahim Ethem Ulugay), caffeic acid phenethyl ester (Sigma)

3.1.3. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

Böbrek dokusunun homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH: 7.5, 0.2 mM Tris-HCI tamponu kullanıldı (65,66).

3.1.4. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Deneyde kullanılan cihazlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Deneyde kullanılan cihazlar

	Cihaz	Firma
1	Soğutmalı santrifüj	Eppendorf MR 5415 (Almanya)
2	Derin dondurucu	Facis (Fransa)
3	Hassas terazi	Scaltec (İsviçre)
4	Vortex (karıştırıcı)	Nüve NM 100 (Türkiye)
5	Otomatik pipetler	Gilson (Fransa) \ Eppendorf (Almanya)
6	UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
7	Homojenizatör	Ultra Turrax T25 (Almanya)
8	Abbott Aeroset cihazı	IL, (Amerika Birleşik Devletleri)

3.2. Metod

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Çalışmada sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu n=10): 12 gün boyunca günde bir kez 1 mL/kg SF intraperitoneal (i.p.) yoldan verildi.

Grup 2 (CAPE kontrol grubu n=10): 12 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi.

Grup 3 (GM grubu n=10): 2 gün boyunca günde bir kez 1 mL/kg SF i.p. yoldan verildi. 8 gün GM (Genta 80 mg, İbrahim Ethem Ulugay, İstanbul) 100 mg/kg/gün dozda i.p. , son 2 gün boyunca günde bir kez 1 mL/kg SF i.p.olarak enjekte edildi.

Grup 4 (GM + CAPE grubu n=10): ilk 2 gün, günde bir kez CAPE 10 µmol/kg/gün i.p, 8 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg/gün CAPE i.p+ GM , 100

mgr/kg/gün i.p, kalan 2 gün boyunca da günde bir kez 10 μmol/kg/gün CAPE i.p olarak toplam 12 gün süreyle enjekte edildi.

Deneye başlamadan ve sakrifikasyon işleminden hemen önce tüm sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Bütün grupların enjeksiyonu i.p. yoldan aynı gün başlandı ve 12 gün boyunca yapılarak aynı gün sonlandırıldı. Kontrol grubuna 1 ml/kg SF i.p. verildi. CAPE ve GN + CAPE grublarına 10 μmol/kg dozunda, GN 100 mg/kg dozda i.p. enjeksiyon uygulandı.

3.2.2. Kan Örneklerinin Alınması

Sıçanlara, son enjeksiyondan 1 saat sonra (deneyin 12. günü) i.p. ketamin 80 mg/kg + ksilazin 10 mg/kg ile anestezi yapılarak, orta hat insizyonuyla batınları açıldı. Vena portadan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün 1000x*g*'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum üre ve kreatinin ölçümleri Abbott Aeroset cihazında uygun ticari kitleri ile çalışıldı.

3.2.3. Böbreklerin Çıkarılması

Sıçanların böbrekleri deneyin başlangıcından oniki gün sonra steril şartlarda çıkarıldı. Çıkarılan böbreklerin üzerindeki bulaşmış kanları uzaklaştırmak için serum fizyolojik ile yıkanıp kurulandı. Daha sonra böbrekler otolizden korunmak için vertikal olarak ikiye ayrıldı. Sol böbrek histopatolojik incelemeler, sağ böbrek biyokimyasal analizler için kullanıldı. Sol böbrek yeteri kadar % 10'luk nötral formol eklenmiş ependorf tüplerine konarak histopatolojik değerlendirme yapılıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi. Sağ böbrek analizin yapıldığı tarihe kadar –80 C^{0}'de muhafaza edildi.

3.2.4. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için Hazırlanması

Böbrek dokusunun ağırlıkları yaş olarak tartıldı ve dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe kondu. Dokuların üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Cam tüpteki dokular buz doldurulmuş plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızda 2 dakika homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 2,5 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi.

Dokular tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenat yedeklenerek ependorf tüplerine kondu. Tüpler etiketlendi. Elde edilen homojenatlardan MDA ve NO seviyesi ve homojenatta protein tayini yapıldı.

Homojenatlar, 5000 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle +4 ˚C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatan sağlandı. Ayrılan süpernatanlardan CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri ve protein tayini yapıldı. Süpernatan (1/1, v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle +4 ˚C'de santrifüj edilerek ekstrakt hazırlandı. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzimi aktivite tayini yapıldı.

3.2.5. Dokularda Biyokimyasal Analizler

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle MDA, NO ve GSH-Px, CAT ve SOD enzim aktiviteleri ölçüldü.

MDA. Düzeyinin tayini için Draper ve Hadley çift ısıtma yöntemi kullanıldı (67). Bu amaçla her 0.5 ml. homojenat içine 2.5 ml. 100 gL^{-1} trikloroasetik asit solusyonu eklenerek 15 dakika sıcak su banyosunda bekletildikten sonra soğutulup 1000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın 2 ml'si içine 6.7 gL^{-1} TBA solusyonundan 1 ml eklenerek 15 dakika su banyosunda bekletildi. Soğutulmasının ardından spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV-1601, Japan) 532 nm. dalga boyunda ölçüm yapıldı. MDA konsantrasyonu MDA-TBA kompleksinin absorbans etkisi (absorbans etki = $1.56x10^5$ $cm^{-1}M^{-1}$) kulanılarak hesaplandı ve böbrek dokusunun her gram proteini için nanomol olarak ifade edildi (nmol/g^{-1} protein).

NO. Aktivitesinin ölçümü:50 µl homojenattan alınarak, Nitrat standart ve assay buffer ile 200 µl'ye tamamlanıp miliporlara konuldu ve 3 saat inkübasyon sonrası değerler ultra mikroplate reader cihazında okutuldu.

SOD. Enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (68). Bu metod ksantin/ksantin oksidaz enzim sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri

NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim ve miktar aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

Enzimin % inhibisyonu = (Abskör- Absnum) / x 100

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

CAT. Enzim aktivitesi Aebi metoduna göre çalışıldı (69). H_2O_2 240 nm'de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 CAT tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Fosfat tamponu (pH 7.50 mM), absorbansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H_2O_2 fosfat tamponu (H_2O_2 çözeltisi) kullanılır. Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda sıfırlanan köre karşı H_2O_2 çözeltisinin absorbansı 0.500'e ayarlanır. Numune ilavesi ile absorbans azalması her 15 saniyede bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilerek, 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alınarak hesaplama yapıldı. Aktivite düzeyleri k/g protein olarak ifade edildi.

GSH-Px. Enzim aktivitesi Paglia ve Valentine'nin metoduna göre çalışıldı (70). Bir deney tüpünde 1 ml, glutatyon (4 mM), glutatyon redüktaz (≥ 0.5 U/L) ve ß-NADPH (0.34 mM) çözeltilerini içeren reaktif ile 20 µI numune karıştırılıp, ölçümden hemen önce 40 µI kümen hidroperoksit (0.18 mM) ilave edildi. Enzim aktivitesini ölçmek için 340 nm'deki absorbans değişimi hesaplandı. U/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi, homojenizasyon esnasındaki dilüsyon katsayısı ile çarpıldıktan sonra doku protein değerine bölünerek sonuçlar U/gr protein birimi olarak ifade edildi. Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı. (71).

3.2.6. Histopatolojik İnceleme

Deneyin bitiminde sıçanlar ketamin anestezisi altında her iki böbrek çıkarıldıktan sonra histopatolojik inceleme için sol böbrekleri alınarak % 10'luk nötral formalinde uygun şekilde tespit edildi. Rutin takip yöntemlerinden sonra parafinde bloklanarak sistematik rastgele yöntemle 5 μm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen-eozin ile boyanarak Olympus BX50 araştırma mikroskobunda değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

Histopatolojik değerlendirmede kullanılan parametreler şunlardır:

- Hiperkromatik hücre çekirdekleri
- Medullada hemorajik alanlar
- Kortekste nekrotik alanlar
- Medullada mononükleer hücre infiltrasyonu
- Kortekste mononükleer hücre infiltrasyonu
- Proksimal ve distal tubüllerde genişleme / dejenerasyon
- Tubüler nekroz
- Tubüler epitel desquamasyon
- Tubüler vokalizasyon
- Tubüler atrofi
- Tubüler silendir
- İnterstisyel inflamasyon
- İnterstisyel ödem

Tablo 3. Histolojik parametrelerin skorlaması

(-) (negatif skor)	Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması
(+) (1 pozitif skor)	Hafif derecede yapısal değişik
(++) (2 pozitif skor)	Orta derecede yapısal değişik
(+++) (3 pozitif skor)	Ciddi derecede yapısal değişiklik

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistikler bilgisayar ortamında SPSS 9.0 programı kullanılarak yapıldı**.** Elde edilen değerlerin normal dağılıma sahip olup olmadıklarını belirlemek için non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Gruplar normal dağılım gösterdiği için grupların karşılaştırılmasında one-way ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arası anlamlılık Post Hoc testlerden LSD (Least Significant Difference) ile yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi ve $p<0.05$ olan değerler istatiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametreler

4.1.1. Bun-Kreatinin Değerleri

Biyokimyasal parametrelerden Bun-Kreatinin sonuçları **Tablo 4**'de verilmiştir.

Tablo 4. Sıçanların BUN ve kreatinin değerleri.

GRUPLAR	n	**BUN** (mg/dL)	**Kreatinin** (mg/dL)
1-Kontrol grubu	10	15.27 ± 1.27	0.58 ± 0.10
2-CAPE grubu	10	16.7 ± 1.6	0.51 ± 0.03
3-GM grubu	10	28 ± 2.86	1.61 ± 1.13
4-GM+CAPE grubu	10	17.8 ± 1.19	1.04 ± 0.74
P-değerleri			
1-2		AD	AD
1-3		<0.0001	<0.0001
1-4		AD	AD
2-3		<0.0001	<0.0001
2-4		AD	AD
3-4		<0.0001	<0.0001

AD, anlamlı değil. *n* = sıçan sayısı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.2. Böbrek Dokusunda Ölçülen MDA, NO, CAT, SOD, GSH-Px Enzim Aktivite Değerleri

Tablo 5'de sonuçlar toplu olarak verilmiştir.

Tablo 5. Sıçan böbrek dokusunda ölçülen MDA ve NO seviyeleri ile enzim aktiviteleri.

GRUPLAR	n	MDA (nmol/g protein)	NO (µmol/g protein)	CAT (k/g protein)	SOD (U/g protein)	GSH-Px (U/g protein)
1-Kontrol	10	78.5±4.1	102.8±7.2	242.9±19.1	70.1±3.6	5.96±1.29
2-CAPE	10	80.1±5.2	90.2±4.2	254.1±8.4	78.4±5.5	4.89±0.69
3-GM	10	128.5±5.1	162.1±9.3	86.2±7.1	52.7±3.9	2.71±1.22
4-GM+CAPE	10	82.5±3.9	80.7±6.4	236.7±12.1	67.3±4.3	4.71±1.72

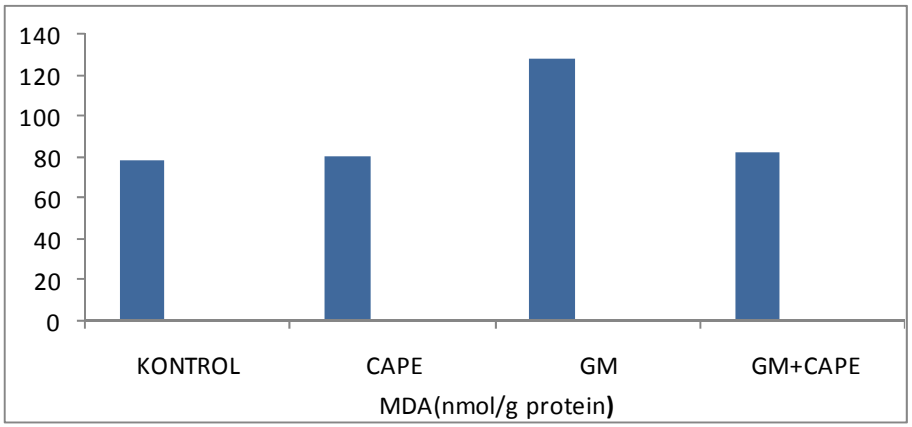
P-değerleri

1-2	AD	AD	AD	AD	AD
1-3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
1-4	AD	AD	AD	AD	AD
2-3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
2-4	AD	AD	AD	AD	AD
3-4	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

AD, anlamlı değil. *n* = sıçan sayısı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Gruplarda Böbrek Dokusu MDA Aktivitesi

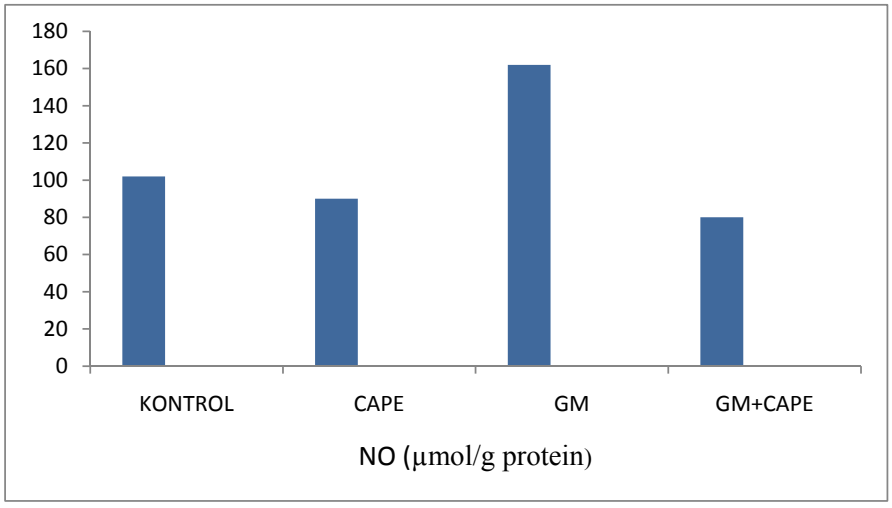
Şekil 3'de görüldüğü gibi kontrol ve CAPE gruplarının MDA düzeyleri benzerdi. GM grubu MDA düzeyi, kontrol grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p<0.0001$). GM+CAPE grubunda ise MDA düzeyi GM grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.0001$). GM+CAPE ve kontrol grupları MDA düzeyleri açısından benzerdi.



Şekil 3. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki MDA aktivitesi

Gruplarda Böbrek Dokusu NO Aktivitesi

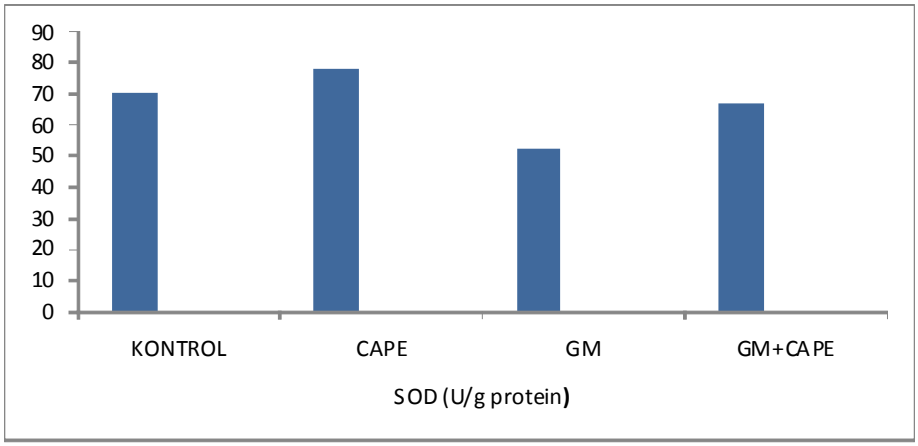
Şekil 4'de görüldüğü gibi kontrol ve CAPE gruplarının NO düzeyleri benzerdi. GM grubu NO düzeyi, kontrol grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.0001$). GM+CAPE grubunda ise NO düzeyi GM grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p<0.0001$). GM+CAPE ve kontrol gruplarının NO düzeyleri benzer olarak saptandı.



Şekil 4. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki NO aktivitesi

Gruplarda SOD Aktivitesi:

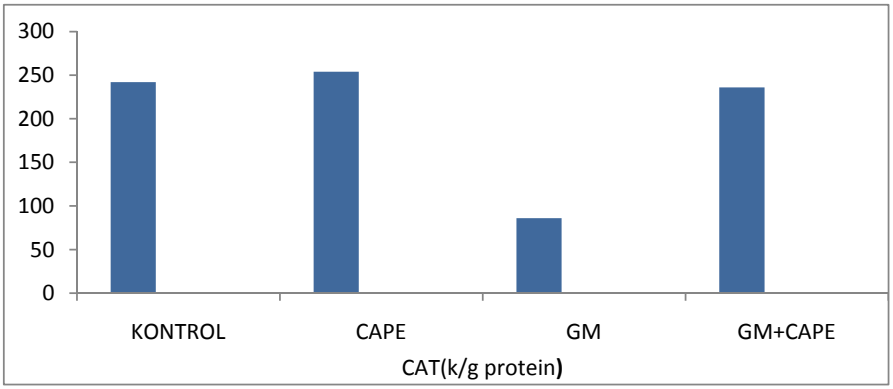
Şekil 5'de ifade edilmiştir. Sonuçlara göre kontrol ve CAPE grupları arasında böbrek dokusu SOD aktivitesinde istatiksel olarak fark saptanmadı. GM grubu böbrek dokusunda SOD aktivitesi kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.0001$). GM+CAPE grubunda ise SOD aktivitesi GM grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.0001$). GM+CAPE grubu ile kontrol grubu SOD aktivitesi karşılaştırılığında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 5. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki SOD aktivitesi

Gruplarda CAT Aktivitesi:

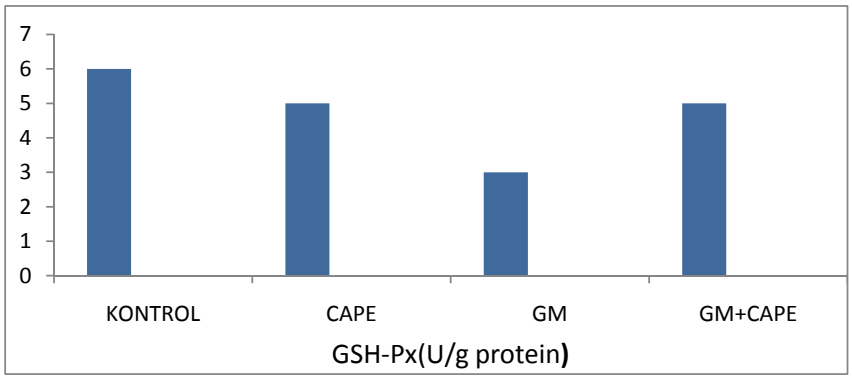
Şekil 6'de görüldüğü üzere kontrol ve CAPE grupları arasında böbrek dokusu CAT aktivitesinde istatiksel olarak fark gözlenmemektedir. GM grubu böbrek dokusunda CAT aktivitesi kontrol grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p<0.0001$). GM+CAPE grubunda ise CAT aktivitesi GM grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.0001$). GM+CAPE grubu ile kontrol grubu CAT aktivitesi karşılaştırılığında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 6. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki CAT aktivitesi

Gruplarda Böbrek Dokusu GSH-Px Aktivitesi:

Şekil 7'de ifade edilmiştir. Sonuçlara göre kontrol ve CAPE grupları arasında böbrek dokusu GSH-Px aktivitesinde istatiksel olarak fark saptanmadı. GM grubu böbrek dokusunda GSH-Px aktivitesi kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.0001$). GM+CAPE grubunda ise GSH-Px aktivitesi GM grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.0001$). GM+CAPE grubu ile kontrol grubu GSH-Px aktivitesi karşılaştırılığında anlamlı fark bulunmadı.



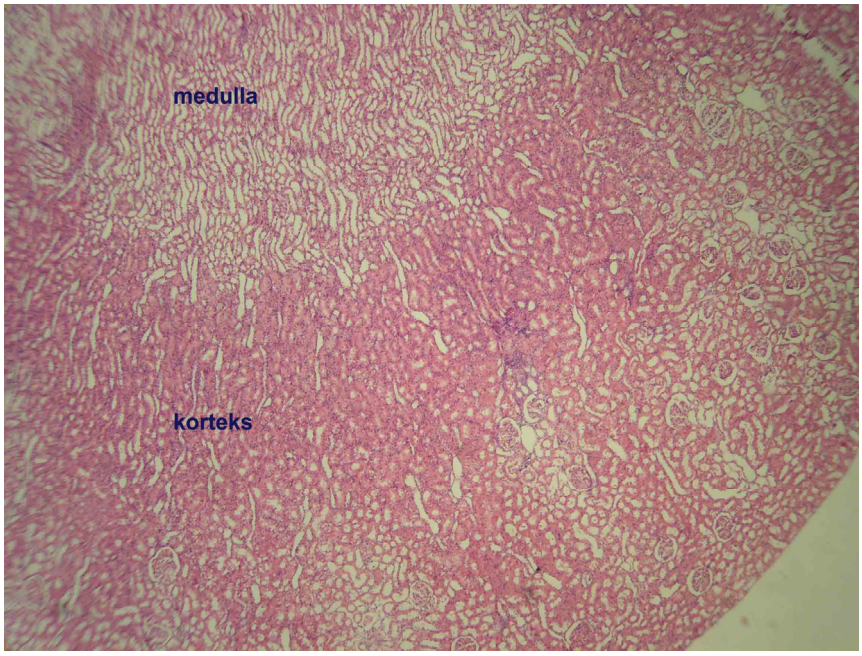
Şekil 7. Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki GSH-Px aktivitesi

4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

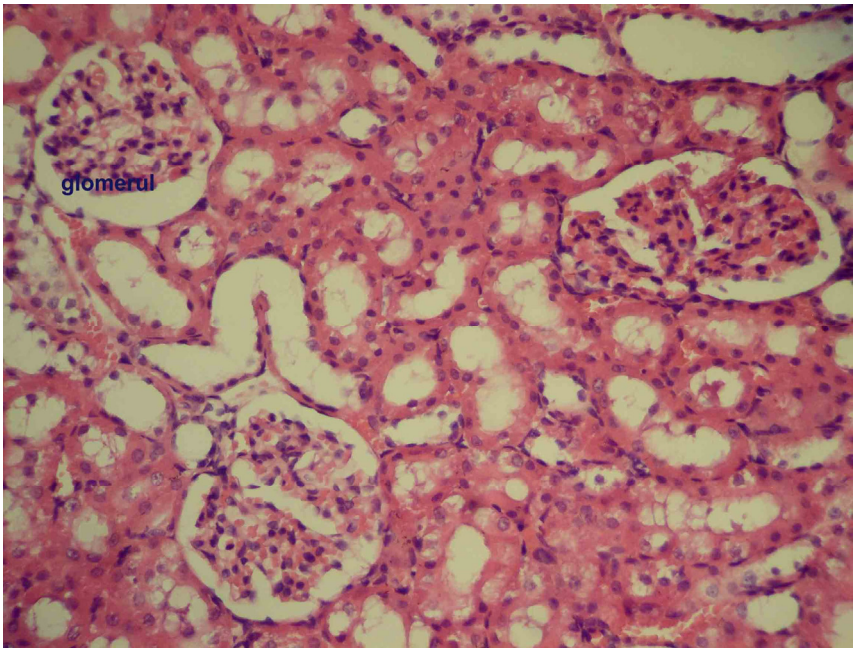
Kontrol ve CAPE gruplarının sol böbreklerinin histolojik değerlendirilmesinde aldıkları skorlar Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışma gruplarının böbreklerinin histopatolojik değerlendirme sonuçları

Histopatolojik parametreler	Kontrol	CAPE	GM	CAPE+GM
Tubüler nekroz	-	-	+	-
Tubüler dilatasyon	-	-	+++	+
Tubüler epitelyal desquamasyon	-	-	+	-
Tubüler vakuolizasyon	-	-	+++	+
Tubuler silendir	-	-	+	-
İnterstisyel inflamasyon	-	-	-	-
İnterstisyel ödem	-	-	+++	+
Tubüler atrofi	-	-	-	-
Kortekste nekrotik alanlar	-	-	++	+
Kortekste mononükleer hücre	-	-	+++	+
Medullada hemorajik alanlar	-	_	++	+
Medullada mononükleer hücre	-	-	++	+
Hiperkromatik hücre çekirdekleri	-		+++	+



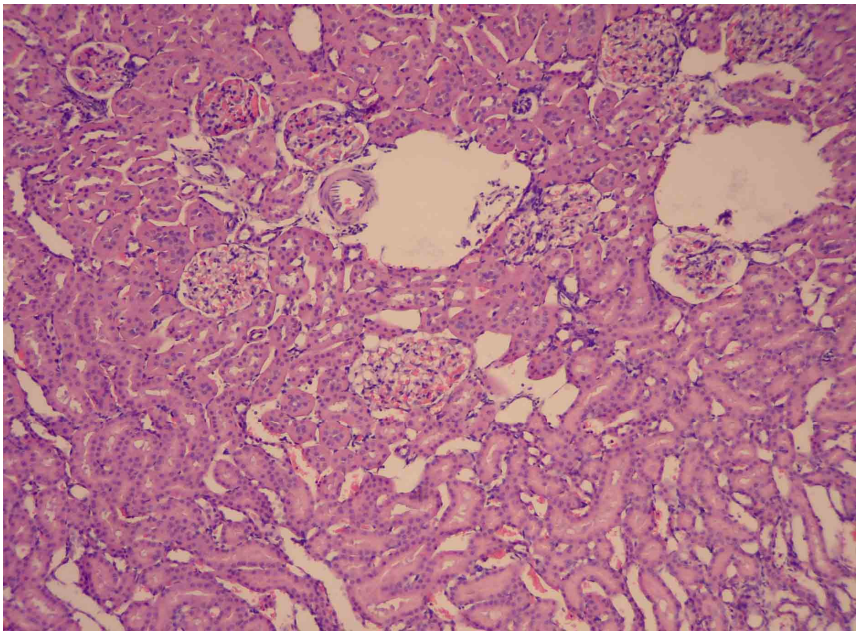
1-A



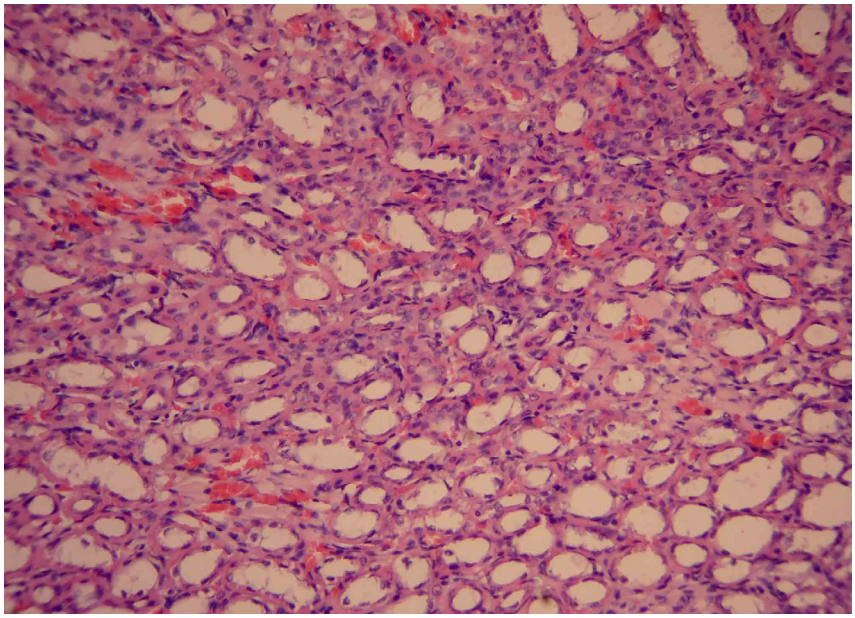
1-B

Resim 1. Kontrol Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları: Böbreğin korteks ve medulla bölgesi **(resim 1-A)**, proksimal ve distal tubül yapıları **(resim 1-B)** normal histolojik görünümde izlendi (A: x40, B:x200) (H-E).

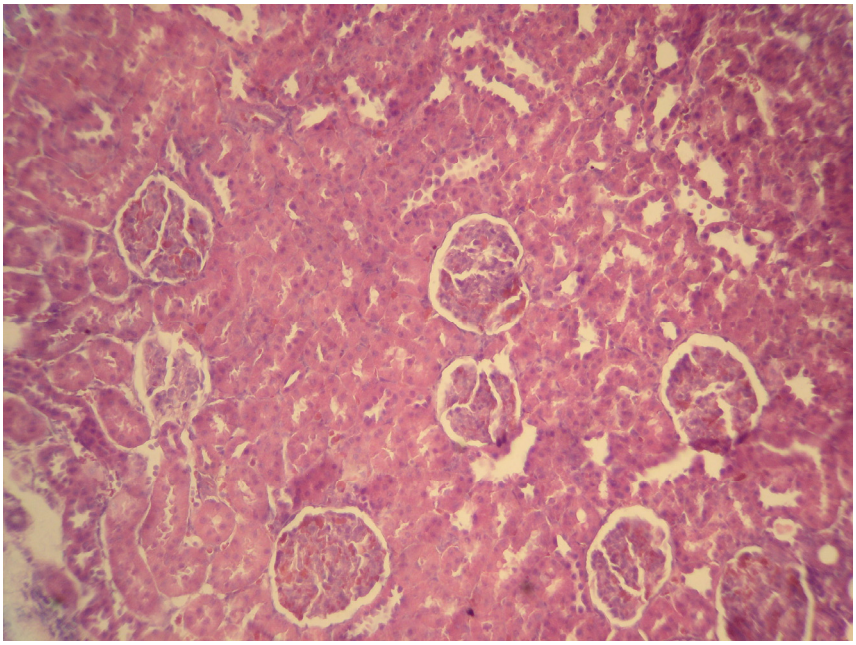
2-A



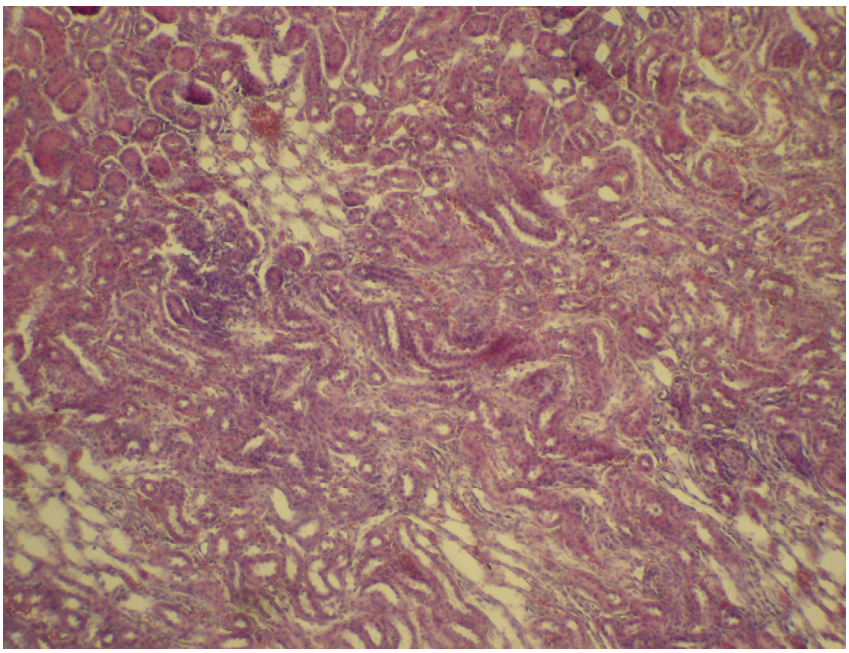
2-B



Resim 2. CAPE Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları: Korteks bölgesinde tübüller arasında nadir mononükleer hücre infiltrasyonları, proksimal ve distal tubüllerde hafif derecede genişleme **(resim 2-A)**, medulla bölgesinde, toplayıcı tubüllerde düşük düzeyde genişleme **(resim 2-B)** gözlenmektedir. (A:x100, B:x100) (H-E).



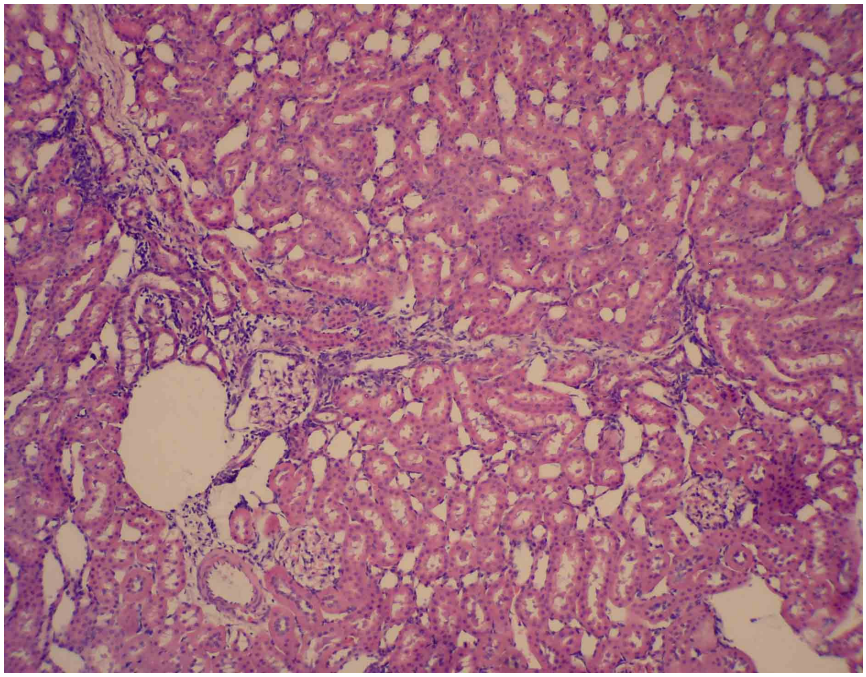
3-A



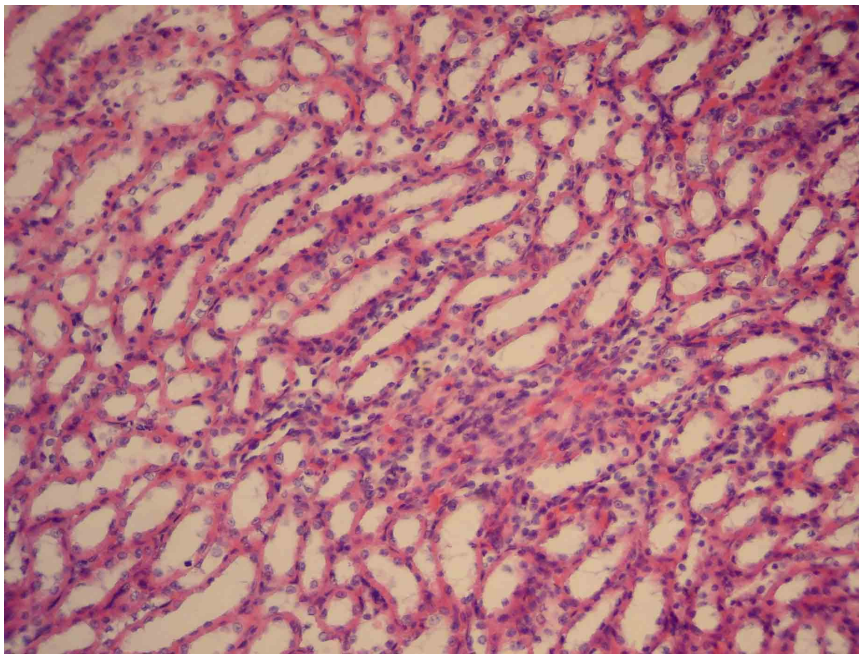
3-B

Resim 3. GM Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları: Korteks bölgesinde yer yer nekrotik alanlar, proksimal ve distal tubüllerde dejenerasyon/dilatasyon, bol miktarda hiperkromatik çekirdekli proksimal ve distal epitel hücreleri **(resim 3-A)** görüldü. Medulla bölgesinde toplayıcı tubüllerde dejenerasyon ve hemoraji, orta derecede mononükleer hücre infiltrasyonu **(resim 3-B)** izlenmektedir. (A:x100, B:x100) (H-E).

4-A



4-B



Resim 4. GM + CAPE Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları: Proksimal ve distal tübüllerde genişleme **(resim 4-A)** ve medullada hemorajik alanlar, mononükleer hücre infiltrasyonları, toplayıcı tubüllerde dejenerasyon ve dilatasyon, hiperkromatik çekirdekli proksimal ve distal epitel hücreleri ve nekrotik alanlar **(resim 4-B)** görülmektedir. (A:x100, B:x100) (H-E).

5. TARTIŞMA

Aminoglikozidler, Gram (-) enfeksiyonların önlenmesinde etkili olan antibiyotikler olarak uzun zamandır bilinmektedir. Hızlı ve yüksek antibakteriyel etkinlik, düşük direnç gelişme potansiyeli, beta laktam antibiyotiklerle sinerjistik etki ve düşük maliyet gibi avantajlarına rağmen yan etkileri ve özellikle yüksek nefrotoksisite insidansı nedeniyle klinik kullanımları sınırlanmaktadır. Aminoglikozid antibiyotiklerin nefrotoksik yan etkileri bir çok deneysel hayvan çalışmasında dökümante edilmiştir. Biz bu deneysel çalışmada gentamisine bağlı gelişen nefrotoksisitede tubüler hasar gelişiminde oksidatif hasarın rolünü ve CAPE kullanımının histolojik ve biyokimyasal düzeylerdeki iyileştirici etkilerini saptamayı planladık. Bu amaçla oksidatif hasardaki biyokimyasal belirteçlerden (MDA ve NO) ile antioksidan enzimlerden (SOD, GSH-Px, CAT) düzeylerini çalıştık. Histopatolojik değişiklikleri göstermek için ışık mikroskobunda böbrek morfolojisini değerlendirmeyi amaçladık.

Aminoglikozidlerde nefrotoksisiteyi etkileyen faktörler arasında ilacın dozu, tedavi süresi, genetik yatkınlık, yaş, daha önce aminoglikozid kullanım öyküsü, molekülün şekli yer almaktadır. Literatürde aminoglikozidlerin nefrotoksisitelerine ait bir çok çalışma mevcuttur (72). El Mouedden ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dişi Wistar cinsi ratlara 40 mg/kg amikasin 10 gün uygulaması sonrası tubüler apoptozis ve kortikal proliferatif yanıt gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada gentamisin 10 mg/kg dozu ile karşılaştırıldığında amikasinin daha güvenli olduğu ve gentamisinde nekroz gözlenirken amikasinde nekroz izlenmediği bildirilmiştir (73). Provoost ve arkadaşları da yaptığı çalışmada amikasin ve gentamisini genç ve erişkin ratlara uygulamışlar, bu çalışmada da genç ratların proksimal tubüllerinde erişkin ratlar göre daha az hasar ve histopatolojik değişiklik saptanmıştır. Her iki grupta da aminoglikozidin renal geri alımı benzer bulunmuş, ancak genç ratlarda böbrekteki aminoglikozid konsantrasyonu erişkin ratlardan anlamlı olarak az bulunmuştur. Bu farkın genç ratlarda vücut ağırlığına oranla yaş böbrek ağırlığının relatif olarak fazla olmasına bağlandığı bildirilmiştir (74). Çalışmaların bazılarında tek doz uygulama, bazılarında ise uzun süreli tedavi (14 gün-28 gün) ile nefrotoksisite araştırılmıştır. Farklı doz uygulamalarıyla histopatolojik olarak nefrotoksisite geliştiğini bildiren çalışmalar vardır (75,76). Tubüler nefrotoksik olan aminoglikozidlerin glomerüler

endotelyum hasarını, endotelyal fenestrelerin çapını ve yoğunluğunu azaltarak yaptıkları bilinmektedir.

Hücredeki mitokondri, ksantin-ksantin oksidaz, NADPH oksidaz sistemi aracılığıyla serbest oksijen radikalleri üretilmektedir. Serbest radikaller aracılığıyla, dokular, membranlar ve biyomoleküllerde oluşan oksidasyonun bir çok patolojik olayda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Aşırı miktarda üretilen SOR'nin lipidler, nükleik asitler, çeşitli proteinler ve polisakkaritler gibi biyomoleküllerle etkileşmesi, hücre ve doku hasarlarına yol açmaktadır (77,78,79). Serbest oksijen radikalleri ortamda oluştuğu zaman lipit peroksidasyonuna neden olarak hücre zarının akışkanlığında ve geçirgenliğinde değişikliklere neden olmaktadır (80). Lipid peroksidasyonu sırasında biyolojik yapılardan kolayca tespit edilebilen ve peroksidatif hasarın belirteci olan MDA, lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (32,80). Bizim çalışmamızda da gentamisin (GM) verilmesiyle doku düzeyindeki MDA miktarının anlamlı şekilde arttığını gösterdik. Bu bulgu GM nefrotoksisitesinin oluşmasında oksidatif hasarın önemli bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir. Parlakpınar ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmada amikasin ile indüklenen böbrek hasarına karşı melatoninin ve CAPE'nin antioksidan düzeylerini arttırdığını ve lipit peroksidasyonunu azalttığını MDA değerleriyle göstermişlerdir (81). Çetin ve arkadaşlarının çalışmasında da vankomisine bağlı oluşan nefrotoksisite MDA artışı ile gösterilmiştir (82). Karahan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gentamisinle oluşturulan nefrotoksisitede lycopenin koruyucu etkisi araştırılmış, gentamisin grubunda MDA'da belirgin artış gözlenmiştir (83). Çelik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada vankomisin ile oluşturulan nefrotoksisitede amrinonun koruyucu etkisi değerlendirilmiş, vankomisin ile MDA değerlerinin arttığı gözlenmiştir (84). Yağmurca ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada da CAPE'nin doksorubisin ile oluşturulan nefrotoksisitede lipit peroksidasyonunu değerlendirmişler ve doksorubisin uygulanan grupta renal dokuda NO ve MDA düzeyleri yüksek bulunmuştur (85). Shimede ve arkadaşlarının çalışmasında ratlarda sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede capsaisinin nefrotoksisiteyi ve lipit peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (86). Abdel-Naim ve arkadaşlarının

çalışmasında ratlarda gentamisinle indüklenen nefrotoksisitede gentamisinin MDA'yı belirgin artırdığı saptanmıştır (87).

NO biyolojik sistemlerde L-arjininin guanidin grubundan nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla enzimatik olarak üretilen bir serbest radikaldir. NO'nun biyolojik etkilerinin spektrumu oksijen, superoksit ve diğer serbest oksijen radikalleri ile ağır metaller ve türleri gibi hedef maddelerle kimyasal olarak etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Aminoasitlerin ve proteinlerin tiyol (-SH) grupları ile tepkimeye girebilir ve relatif olarak daha stabil olan nitrozo-tiol (-S-NO)'leri oluşturur (85). $O2^{-}$'nin, peroksinitrit anyonlarını ($ONOO^{-}$) oluşturmak için NO ile reaksiyona girdiği rapor edilmiştir. Peroksinitrit anyonları ise nitrojen dioksit (NO2) ve OH^{-}'yı oluşturmak için parçalanır (88). Peroksinitrit hücresel yapıları oksitler ve lipid peroksidasyonuna neden olur (89). Parlakpınar ve arkadaşlarının yaptığı gentamisinin neden olduğu akut böbrek yetmezliği modelinde ve Özen ve arkadaşlarının yaptığı sisplatinin neden olduğu akut böbrek yetmezliği modelinde NO seviyelerinin arttığı ve CAPE verilmesi ile NO seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (90,58).

Yaptığımız bu çalışmada da lipit peroksidasyonu, hücre membran kompenentlerinin serbest radikal hasarı sonucu ortaya çıkan MDA ve NO'in ölçümü ile moniterize edildi. Gentamisin uygulanan ratların böbrek dokularında MDA konsantasyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükseldiği saptandı. Yine gentamisin uygulanan grupta kontrol grubuna göre böbrek NO değerlerinde artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p< 0.0001$). CAPE uygulamasıyla böbrek dokusunda MDA ve NO düzeylerindeki artışın gentamisin grubuna göre anlamlı derecede ($p< 0.0001$) azaldığı gösterildi. CAPE'nin bu olumlu etkisi GM ile ortamda oluşan serbest oksijen radikallerinin üretimini azaltması ve/veya oluşan serbest radikalleri direkt olarak temizlemesine bağlandı.

Çalışmamızda gösterildiği üzere, gentamisin alımı ile böbrek MDA ve NO düzeyinin artması ve CAPE gibi antioksidan madde alımı ile böbrek MDA'sında ve NO'de azalma olması, gentamisin nefrotoksisitesinden sorumlu mekanizmalardan birinin oksidatif strese bağlı doku hasarı olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir. Literatür eşliğinde ele alındığında MDA ve NO düzeylerindeki bu

değişiklikler gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisite patogenezinde serbest radikal hasarının önemli bir mekanizma olarak rol oynadığını vurgulamaktadır.

Yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar olmakla birlikte genelde oksidatif hasarda antioksidan enzim (GSH-Px, CAT, SOD) düzeylerinin azalma gösterdiği gözlenmiştir. Vardi ve arkadaşları ve Parlakpınar ve arkadaşları gentamisin ile oluşan nefrotoksisitede CAPE uygulaması ile renal hasarın azaldığını göstermişlerdir (91). Karahan ve arkadaşları çalışmalarında gentamisinle oluşturulan nefrotoksisitede gentamisin grubunda GSH-Px ve CAT aktivitesinde azalma göstermişlerdir (83). Ali ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise circuminin gentamisinin oluşturduğu nefrotoksisiteyi azalttığı bildirilmiş, gentamisin uygulaması ile SOD konsantrasyonu azalmıştır (92). Çelik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada vankomisin ile oluşturulan nefrotoksisitede amrinonun korucuyu etkisi değerlendirilmiştir. Vankomisin grubunda SOD ve GSH-Px aktivitesi düşük bulunmuştur (84). Öktem ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada CAPE'nin lityum ile oluşturulan nefrotoksisitede lipit peroksidasyonunu değerlendirmişler ve vankomisin uygulanan grupta renal dokuda MDA yüksek; SOD, CAT ve GSH-Px düzeyleri düşük bulunmuştur (93).

Yapılan çalışmalarda böbrek dokusu veya idrarda artmış oksidan hasar ürünlerinin saptanması ve/veya serbest oksijen radikalleri inhibitörleri verilmesi ile koruculuğun deneysel olarak gösterilmesi ile serbest oksijen radikallerinin nefropatogenezde rolü olduğunu gösterilmiştir (94). Bu nedenle değişik araştırmacılar farklı antioksidanlar uygulayarak bu hasarlanmayı azaltmayı ya da önlemeyi hedefleyen çalışmalar planlamışlardır. Vardı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, gentamisin ile geliştirilen nefrotoksisitede CAPE'nin tubüler nekrozu önlediği gösterilmiştir (91). Parlakpınar ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmalarda amikasin ile indüklenen böbrek hasarına karşı melatoninin ve CAPE'nin koruyucu etkilerini değerlendirmişler, melatonin ve CAPE'nin antioksidan enzim düzeylerini artırıp, lipit peroksidasyonunu azaltarak nefrotoksisite gelişimini engellediğini göstermişlerdir (81).

Çalışmamızda i.p. olarak 100 mg/kg dozunda uygulanan GM'nin sıçanlarda serum BUN ve kreatinin düzeylerini yükselttiğini tespit ettik. Antioksidan

enzimlerden SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin, kontrol ve CAPE grupları arasında istatiksel olarak fark gözlenmedi. GM grubu böbrek dokusunda SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesi kontrol grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p< 0.0001$). GM+CAPE grubunda ise her üç enzimin aktivitesi GM grubundakine göre istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p< 0.0001$). GM+CAPE grubu ile kontrol grubu SOD, CAT, GSH-Px aktivitesi karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı.

MDA ve NO düzeyleri, GM grubunda, hem kontrol hem de GM+CAPE grubundakilere göre anlamlı derecede yüksek saptandı. GM+CAPE grubu ile kontrol grubunun MDA ve NO düzeyleri ise benzerdi. GM'nin ayrıca böbrekte proksimal ve distal tubüler dilatasyon, tubüler epitelde hiperkromatik hücre çekirdekleri, medullada hemorajik-kortekste nekrotik alanlar, korteks-medullada mononükleer hücre infiltrasyonu ve toplayıcı tübüllerde dilatasyon/dejenerasyon gibi histopatolojik değişikliklere neden olduğunu tespit ettik. Bununla birlikte antioksidan özelliği bilinen CAPE'nin eklenmesi ile böbrekte histopatolojik parametrelerden proksimal ve distal tubüler dilatasyonda, medullada hemorajik alanlarda, kortekste nekrotik alanlarda, kortekste mononükleer hücre infiltrasyonu ve toplayıcı tubüllerde dilatasyon/dejenerasyonda düzelme olduğunu tespit ettik. Sonuç olarak CAPE uygulamasının deneysel GM toksisitesinde böbrekteki histopatolojik değişikliklerde kısmen düzelmeye neden olduğu ve antioksidan özelliğe sahip olduğu görüldü.

Enfeksiyon hastalıklarında kullanılan antibiyotik, antiviral ve antifungal ajanlar sıklıkla sorumlu olsalar da potansiyel olarak bütün ilaçların nefrotoksik oldukları kabul edilebilir. Nefrotoksisiteyi önlemek amacıyla alınabilecek bir dizi önlemin başında, toksik olan ilacın kullanımından kaçınmak gelmektedir. İlaç kullanma zorunluluğu olan hastalarda ilacın toksik etkilerini azaltmaya ya da böbreği bu etkilerden korumaya yönelik uygulamalar önem kazanmaktadır. Çeşitli antioksidan ajanların nefrotoksisitede koruyucu etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalar günümüzde yaygın olarak yapılmaktadır. Bu çalışmada 10 μmol/kg dozunda uygulanan CAPE'nin deneysel GM nefrotoksisitesinde koruyucu etkinliği gösterilmiştir. CAPE'nin çeşitli titrasyonlarında değerlendirilip deneysel ve yapılması gereken klinik çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Bu çalışmamızda deneysel GM nefrotoksisitesinde oksidatif hasarın önemli bir mekanizma olduğunu gösterdik. Bu bulgu antioksidan ajanların GM nefrotoksitesinde koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada antioksidan etkinliği bilinen CAPE'nin uygulanmasıyla, GM'sinin neden olduğu oksidatif hasar sonucunda oluşan nefrotoksisitenin değerlendirilmesindeki biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerde düzelme sağladığını tespit ettik. Bununla birlikte gözlenen bu olumlu etkinin klinik ve geniş katılımlı çalışmalarda değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

7. ÖZET

SIÇANLARDA DENEYSEL GENTAMİSİN NEFROTOKSİSİTESİNDE OKSİDATİF STRESİN ROLÜNÜN VE OLASI OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada sıçanlarda deneysel gentamisin (GM) nefrotoksisitesinde oksidatif stresin rolü ve olası oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) etkisi araştırıldı.

Çalışmamıza 40 dişi Wistar-albino sıçan alınarak, her grupta 10 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 1 ml/kg/gün serum fizyolojik (SF), CAPE ve GM+CAPE gruplarına 10 μmol/kg/gün intraperitoneal (i.p.) CAPE 12 gün boyunca verildi. GM grubuna 2 gün boyunca günde bir kez 1 mL/kg SF i.p. yoldan verildi, 8 gün GM 100 mg/kg/gün dozda i.p. , son 2 gün boyunca günde bir kez 1 mL/kg SF i.p.olarak enjekte edildi. GM+CAPE grubuna ilk 2 gün, günde bir kez CAPE 10 μmol/kg/gün i.p, 8 gün boyunca günde bir kez 10 μmol/kg/gün CAPE i.p+ GM 100 mgr/kgr/gün i.p, kalan 2 gün boyunca da günde bir kez 10 μmol/kg/gün CAPE i.p olarak toplam 12 gün süreyle enjekte edildi. On ikinci gün tüm sıçanların yaşamına son verilerek kan örnekleri ve böbrekleri alındı. Sol böbrek dokusunda histopatolojik değerlendirme yapıldı. Sağ böbrekte ise malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) , süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ölçüldü. Serumda BUN ve kreatinin değerleri ölçüldü.

GM ve GM+CAPE gruplarında histopatolojik değerlendirmede nefrotoksisiteye ait bulgular gözlendi. GM grubunda kontrol grubuna göre serum BUN ve kreatinin değerlerinde anlamlı artış saptandı ($p<0.0001$). GM grubunda, kontrol grubuna göre böbrek dokusunda antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px, CAT'ın aktivitesinin düşük ($p<0.0001$) olduğu tespit edildi. NO ve MDA seviyeleri ise yüksek olarak saptandı (sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.0001$). GM'ne CAPE'nin eklendiği grupta ise GM'nin renal dokuda oluşturduğu oksidatif stresin azaldığı tespit edildi.

Bu bulgular GM nefrotoksisitesinde oksidatif stresin önemli bir mekanizma olabileceğini ve CAPE kullanımının, GM nefrotoksisitesi sonucunda oluşan oksidatif stresin önlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Gentamisin (GM) nefrotoksisitesi, kafeik asit fenetil ester (CAPE), oksidatif stres.

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN EXPERIMENTAL GENTAMİCİN B INDUCED NEPHROTOXIXITY AND EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON POSSIBLE OXIDATIVE STRESS IN RATS

In this study, the role of oxidative stres in experimental Gentamicin (GM) induced nephrotoxicity and the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on possible oxidative stres in rats were investigated.

Forty famele Wistar rats were randomly divided into four groups. Each group consisted of 10 rats. Control group received 1 ml/kg serum physiologic (SF) intraperitoneally (i.p.) once a day, CAPE and GM+CAPE groups received 10 μmol/kg/day CAPE i.p. for 12 days. GM group; injected i.p wiht 1 ml/kg SF for 2 days before GM treatment and after the GM and afterwards i.p wiht 100 mg/kg GM for 8 days, continued only injected i.p wiht 1 ml/kg SF for 2 days. GM+ CAPE treated group; injected i.p with 10 μmol/kg CAPE for 2 days before GM treatment and daily during GM treatmend and after the GM treatment for 2 days. On the twelveth day of the study all rats were sacrificed and then blood samples and kidneys were taken. Left kidneys were used for histopathological evaluation. Malonyldialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels, glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities were determinated in right kidneys of rats. Levels of BUN and creatinin were studied in serum.

Hystopathologic evaluation showed nephrotoxicity findings in GM and GM+CAPE groups. Serum BUN and creatinin leves of GM group was significantly higher than control group ($p<0.0001$). In group, SOD, GSH-Px, CAT enzyme activities were lower ($p<0.0001$) than the control group. NO and MDA levels were higher (respectively $p<0.0001$, $p<0.0001$) than the control group. Where as in GM plus CAPE given group, it has been observed that the oxidative stress amount was decreased in renal tissue.

According to these findings, it could be concluded that oxidative stress may be a critical mechanism in GM nephrotoxicity and using of CAPE may be an effective treatment option in prevention of oxidative stress due to GM nephrotoxicity.

Key words: Gentamicin (GM) nephrotoxicity, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), oxidative stress.

9. KAYNAKLAR

1. Leblebicioğlu H. Aminoglikozidlerin Klinik Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Der*. 2004; 4;9-14.

2. Wilke A, Leblebicioğu H, Usluer G, Ulusoy S. Aminoglikozidler. Güncel Bilgiler Eşliğinde Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi,2003;46;313-324.

3. Aygün G. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi İÜ. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*. 2002;31:39-54.

4. Rybak MJ, Frankowski JJ, Edwards DJ, Albrecht LM. Ultrafiltration coefficient of isolated glomeruli of rats aged 4 days to maturation. *Kidney ınt*. 1985;28:926-928.

5. Yanagida C, İto K, Komiya I, Horie T. Protective effect of fosfomycin on gentamicin-induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chemico-Biological Interactions*. 2004;148(3):139-147.

6. Blaser J, Konig C. Once-daily dosing of aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14(12)1029-1038 .

7. Gür D. Aminoglikozid antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve Türkiye'deki durum. *Mikrobiyol Bül* 1996;30:197-205.

8. Mıstık R. Aminoglikozid antibiyotikler ve günde tek doz kullanımları. *Klimik derg* 2000; 13:43-5.

9. Özbakkaloğlu B. Aminoglikozidler. *Antibiyot Ted Bül* 1999; 7:142-6.

10. Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994; 41(1-2):9-13.

11. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvı SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35(1):77-82.).

12. Sudina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993; 329(1-2):21-24.

13. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R et al. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stres and renal damage. *Free Radical Biology Medicine.*35(3):317-324, 2003.

14. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D et al. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur. J, Pharmacol*. 450(1):67-76, 2002.

15. Sehirli AO, Sener G, Satıroğlu H, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Nephrol*. 16(1):75-80, 2003.

16. Kayaalp O, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 25. Yıl onuncu baskı, Ankara, Feryal Matbaacılık, 2002;282-283.

17. Sheppard D, Lampırıs HW. Antifungal agents. Katzung BG(eds). Lange Basic & Clinica Pharmacology (8 th). Mc Graw –Hill New York 2001; 814-822.

18. Bennet JE. Antimicrobial agents. Molinioff PB, Ruddon RW. (eds). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basic of therapeutics (9th). Mc Graw –Hill New York 1996; 1175-1190.

19. Coşkun O, Armutçu F, Kanter M, Kuzey GM. Protection of endotoxin-induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or/and EGb 761 treatment. *J Appl Toxicol*.25(1):8-12,2005.

20. Suru SM. Onion and garlic extracts lessen cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *Biometals* 2008; 3.

21. Hascelik G. İnfeksiyon etkenlerinin temel özellikleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Nobel Tıp Kitabevleri, Nobel Matbaacılık İstanbul 2008; 294-303.

22. Serarslan G, Altug E, Kontaş T, Atik E, Avcı G. Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32(6):709-15.

23. Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu SF, Wang QS, Zhang LP et al. Effects of Acrylamide on the Nervous Tissue Antioxidant System and Sciatic Nerve Electrophysiology in the Rat. *Neurochem Res* 2008;8;10-14.

24. Maher P, Schubert D. Signaling by reactive oxigen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:1287-1305.

25. Gutteridge JMC, Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Ed, Oxford: Clarendon Press 1991; 1-276.

26. Gılbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Inter disciplinary Approach. Mc Graw –Hill New York 2002; 856-867.

27. Boyunaga H, Çelik C. Serbest radikaller ve hücresel denge. *Bilim Teknik Derg.* 1996; 347:98-100.

28. Sıes H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91:31-38.

29. Floyd RA. DNA damage and repair in *Oxidative Damage and Repair*. Davies KJA. Ed. Pergamon Press 1992; 32;175-180.

30. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 29;4(1):5.

31. Çam H. Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterin etkinliğinin araştırılması. Doktora tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi 2007.

32. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage aplications in experimental animals and inhumans. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:202-226.

33. Reznıck A.Z, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-363.

34. Wıseman H, Hallıwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.

35. Cooke MS, Olınskı R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006;365: 30-49.

36. Jerry P, Lıu L, Zeng M, Stamler J.S. An apoptotic model for nitrosative stres. *Biochemistry* 2000; 39:1040-1047.

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

38. Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 2005; 26: 459-516.

39. Crichton R. Inorganic biochemistry of iron metabolism. From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences 2 nd Ed. John Wiley & Sons Ltd 2001.

40. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989; 82: 747-752.

41. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer RF, Lımson J, Weintraub ST et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin transformation. *Free Rad Biol Med* 2000; 29: 1177–85.

42. Meister A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res Suppl* 1994; 954:1969-1975.

43. Cochrane C.G. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 56;23-30.

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

45. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56.

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

47. Yılmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I And Ozcelik N. Protective effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18:234-38.

48. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: Rol of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73:21-29.

49. Castalo S, Caposso F**.** Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002; 73:1-6.

50. Havateen BH. The biochemistry and medical significance of the flovonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96:66-207.

51. Son S, Lobkowsky EB, Lewis BA. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): Synthesis and X-Ray crystallographic analysis. *Chem Pharm Bull* 2001; 49: 236-38.

52. Wang X, Bowman PD, Kerwın SM, Stavchansky S. Stability of caffeic acid phenethyl ester and its fluorinated derivative in rat plasma. *Biomed Chromatogr* 2007; 21: 343-350.

53. Da Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzı FC, Nıero R, Campos MM et al. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic Res* 2004; 38: 1241-1253.

54. Fesen MR, Pommıer Y, Leteurtre E, Hırogughı S, Yung J, Kohn KW. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) related compounds. *Biochem Pharmacol* 1994; 48:595-608.

55. Lın MW, Yang SR, Huang MH, Wu SN. Stimulatory actions of caffeic acid phenethyl ester, a known inhibitor of NF-kappaB activation, on Ca2+-activated K+ current in pituitary GH3 cells. *J Biol Chem* 2004; 279:26885-26892.

56. Natarajan K, Sıngh S, Burke TR JR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 9090-9095.

57. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N And Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptozis by inhibition of NfkappaB and activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Biol Chem* 2004; 279:6017-26.

58. Ozen S, Akyol Ö, Iraz M, Söğüt S, Özuğurlu F, Özyurt H ve ark. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, againist Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *J Appl Toxicol* 2004; 24:27-35.

59. Parks Da, Granger DN. Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1986; 548:87-99.

60. Ozer MK, Parlakpınar H, Vardi N, Ciğremis Y, Uçar M, Acet A. Myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative renal damage in rats: Protection by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Shock* 2005; 24:97-100.

61. Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Uz E, İlhan A, Akyol O. Tissue xanthine oxidase activity and nitric oxide levels after spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: comparision of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and methylprednisolone. *Neurosci Res Commun* 2002; 31:111-21.

62. Gurel A, Armutcu F, Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Gulec M ve ark. Protective role of α-tocophereol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clinica Chemica Acta* 2004; 339:33-41.

63. Borellı F, Maffia P, Pınto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002;73: 53-63.

64. Yılmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, Işık B ve ark. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health* 2005; 21(3-4):67-73.

65. Feldman L, Efratı S, Dıshy V, Katchko L, Berman S, Averbukh M et al. N-acetylcysteine ameliorates amphotericin-induced nephropathy in rats. *Nephron Physiol* 2005; 99(1):23-27.

66. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.1995

67. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-431.

68. Sun Y, Oberley LW, Yıng L. A simple method for clinical assay superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34:497-500.

69. Aebı H. Catalase in Medhods of Enzimatic Analysis, Bergmeyer U, Ed. New York and London: *Academic Press* 1974; 673-677.

70. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(9):158-169.

71. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.

72. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbıd MS. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. *J Appl Toxicol*. 1999; 19(1):7-12.

73. El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper HS, Cumps J, Tulkens PM. Apopitosis in renal proximal tubes of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):665-75

74. Provoost AP, Adejuyigbe O, Wolff ED. Nephrotoxicity of aminoglycosides in young and adult rats. *Pediatr Res*. 1985;19(11):1191-1196

75. Houghton DC, Plamp CE, Gilbert DN, Kohlhepp SJ, Bennet WM, Porter GA, Defehr J, Webb M. Amikasin nephrotoxicity in the rat. *J Environ Pathol Toxicol*.1980;4(5-6):227-291.

76. Laura I, Rankin, Friedrich C, Luft, Moo N, Yum, Linda L Isaacs. Comparative Nephrotoxicites of Dibekacin, Amikacin and Gentamicin in a rat model. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980;19(6)983-985.

77. Hallıwell B. Reactive oxygen species in living system: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 30;91(3C):14-22.

78. Kawaı Y, Nakao T, Kunımura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci* 2006;100:65-72.

79. Dargel R. Lipid peroxidation a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxic Pathol* 1992; 44(4):169-81.

80. Schmıdley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21:1086-90.

81. Parlakpınar H, Özer MK, Sahna E, Vardı N, Cigremiş Y, Acet A. Amikacin-induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. *J Pineal Res*.2003;35(2):85-90.

82. Çetin H, Olgar Ş, Öktem F, Çiriş M, Uz E, Aslan Ç ve ark. Novel evidencesuggesting an antı-oxidant property for erythropoıetın on vancomycin-induced nephrotoxicity in a rat model. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 2007;10:1440-1681.

83. Karahan I, Ateşşahin A, Yılmaz S, Çeribaşı A.O, Sakin F. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stres and nephrotoxicity in rats. *Toxicology.* 2005;215:198-204.

84. Çelik I, Cihangiroğlu M, Ilhan N, Akpolat N, Akbulut HH. Protective effects of different antioxidants and amrinone on vancomycin-induced nephrotoxicity. *Basic Clinical Pharmocolojy Toxicology*.2005;97(5):325-332.

85. Yağmurca M, Erdoğan H, Iraz M, Songur A, Uçar M, Fadıllıoğlu E.Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent againts doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta*. 2004;348(1-2):27-34.

86. Shimes Y, Hirotani Y, Akimato Y, Shindou K, Ijiri Y, Nishihori T et al. Protective effects of capsaicin againist cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(9):1635-1638.

87. Abdel-Naim A.B, Abdel-Wahab M.H, Attia F.F. Protective effects of vitamin e and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 1999;40(2):183-187.

88. Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43(3):275-88.

89. Soğut S, Zoroğlu SS, Ozyurt H, Yılmaz HR, Ozugurlu F, Sıvaslı E ve ark. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta* 2003; 331(1-2):111-7.

90. Parlakpınar H, Tasdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardı N, Ucar M ve ark. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (cape) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology* 2005; 14;207(2):169-77.

91. Vardı N, Parlakpınar H, Öztürk F, Acet A. Gentamisin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acıd phenetyl ester in rats. *Fundamental Clinical Pharmacolojy*. 2005;19(2):173-177.

92. Ali B.H, Al-Wabel N, Mahmoud O, Mousa H.M, Hashad M. Curcumin has a palliative action on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundamental Clinical Pharmacolojy*. 2005;19(4):473-477.

93. Oktem F, Ozguner F, Sulak O, Olgar S, Akturk O, Yılmaz HR ve ark. Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2005; 277(1-2):109-15.

94. Ichikiawa I, Kiyama S. Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney Int*. 1994;45(1):1-9.