

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

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

**Dr. Atila ALTUNTAŞ**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet Tuğrul SEZER**

**ISPARTA**

**2008**

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

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

**Dr. Atila ALTUNTAŞ**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet Tuğrul SEZER**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından “1457-TU-06” proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA**

**2008**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Tuğrul SEZER başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. Mehmet İŞLER, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ, Doç.Dr. Ş. Ercan TUNÇ, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Doç. Dr. M. Cem Koçkar, Doç.Dr. H. Şenol COŞKUN, Yrd. Doç. Dr. Güçhan ALANOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Yrd. Doç. Dr. Şeref YÜKSEL, Yrd. Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU, Uzm. Dr. İbrahim GÖREN'e, laboratuvar imkanlarını kullandıran Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e ve laboratuvar çalışmalarımda bana yol gösteren Doç. Dr. H. Ramazan YILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Efkan UZ'a, yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Alparslan Gökçimen ve laboratuvar çalışmamda emeği geçen başta çok değerli dostlarım Dr. Oğuzhan AKSU, Dr. Bünyamin AYDIN ve Uzm. Dr. Murat DEMİR olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, bu vesileyle çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan, hayatımın olmaz denilen yanlarımı bir su berraklığı kıvamında yaşatan ve tattıran sevgili eşim ve hayat arkadaşım Dr. Ayşegül ALTUNTAŞ'a, sıkıntılı anlarımda bana neşe kaynağı olan ve gözlerinde yaşam sevincim yatan sevgili oğlum Ahmet Burak'a en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Atila ALTUNTAŞ

## İÇİNDEKİLER

| BAŞLIK   | Sayfa No |
|--|----------|
| TEŞEKKÜR   | i        |
| İÇİNDEKİLER  | ii       |
| SİMGELER ve KISALTMALAR  | v        |
| ŞEKİLLER   | vi       |
| TABLolar   | vii      |
| RESİMLER   | viii     |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ   | 1        |
| 2. GENEL BİLGİLER  | 2        |
| 2.1. Amfoterisin B   | 2        |
| 2.1.1. Etki Mekanizması  | 2        |
| 2.1.2. Etki Spektrumu  | 3        |
| 2.1.3. Kullanım Şekli  | 3        |
| 2.1.4. Farmakokinetiği   | 4        |
| 2.1.5. Amfoterisin B Yan Etkileri ve Nefrotoksitesisi              | 5        |
| 2.1.5.1. Amfoterisin B Nefrotoksitesisi Patofizyolojisi            | 5        |
| 2.1.5.2. Amfoterisin B Nefrotoksitesisinde Histopatolojik Bulgular | 6        |
| 2.1.6. Amfoterisin B Nefrotoksitesisinin Klinik Bulguları          | 7        |
| 2.1.6.1. Azotemi   | 7        |
| 2.1.6.2. Renal Tübüler Asidoz                                      | 7        |
| 2.1.6.3. Renal Konsantrasyon Defekti ve Poliüri                    | 8        |
| 2.1.6.4. Hipokalemi  | 8        |
| 2.1.6.5. Hipomagnezemi   | 8        |
| 2.1.7. Amfotersin B Nefrotoksitesisi için Risk Faktörleri          | 9        |
| 2.1.8. Amfoterisin B Lipid Formülleri                              | 9        |
| 2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri                | 9        |
| 2.3. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları                            | 10       |
| 2.4. Serbest Radikallerin Hücrelerdeki Etkileri                    | 11       |
| 2.4.1. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu            | 11       |

|   |    |
|---|----|
| 2.4.2. Serbest Radikallerle Protein ve Nükleik Asitlerde Oluşan Değişiklikler | 11 |
| 2.5. Antioksidan Sistem   | 12 |
| 2.5.1. Nonenzimatik Antioksidanlar  | 12 |
| 2.5.2. Enzimatik Antioksidanlar   | 13 |
| 2.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)  | 13 |
| 2.5.2.2. Katalaz (CAT)  | 13 |
| 2.5.2.3. Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Redüktaz                           | 13 |
| 2.6. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)   | 14 |
| 2.6.1. CAPE'nin Kimyasal Özellikleri ve Yapısı                                | 14 |
| 2.6.2. CAPE'nin Fonksiyonel Özellikleri ve Antioksidan Etkisi                 | 15 |
| 3. MATERYAL ve METOD  | 16 |
| 3.1. Materyal   | 16 |
| 3.1.1. Deney Hayvanları   | 16 |
| 3.2. Metod  | 16 |
| 3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması                   | 16 |
| 3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler   | 17 |
| 3.2.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar  | 18 |
| 3.2.4. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması                                      | 18 |
| 3.2.5. Böbreklerin Çıkarılması  | 18 |
| 3.2.6. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için Hazırlanması                  | 19 |
| 3.2.6.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler                               | 19 |
| 3.2.6.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması        | 19 |
| 3.2.7. Dokularda Biyokimyasal Analizler                                       | 20 |
| 3.2.8. Histopatolojik İnceleme  | 20 |
| 3.3. İstatistiksel Analiz   | 21 |
| 4. BULGULAR   | 22 |
| 4.1. Biyokimyasal Parametreler  | 22 |
| 4.1.1. Gruplarda SOD Aktivitesi   | 24 |
| 4.1.2. Gruplarda CAT Aktivitesi   | 25 |
| 4.1.3. Gruplarda Böbrek Dokusu Malondialdehit Düzeyleri                       | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1.4. Gruplarda Böbrek Dokusu Nitrik Oksit Düzeyleri | 27 |
| 4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları           | 28 |
| 5. TARTIŞMA   | 35 |
| 6. SONUÇ  | 40 |
| 7. ÖZET   | 41 |
| 8. SUMMARY  | 42 |
| 9. KAYNAKLAR  | 43 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|          |                             |
|----------|-----------------------------|
| AmfB     | Amfoterisin B               |
| $O_2^-$  | Süperoksit anyonu           |
| $H_2O_2$ | Hidrojen peroksit           |
| $OH^-$   | Hidroksil iyonu             |
| CAPE     | Kafeik asit fenetil ester   |
| MDA      | Malondialdehit              |
| SOD      | Süperoksit dismutaz         |
| CAT      | Katalaz                     |
| GSH-Px   | Glutasyon peroksidaz        |
| XO       | Ksantin oksidaz             |
| NO       | Nitrik oksit                |
| SOR      | Serbest oksijen radikalleri |
| i.p.     | İntraperitoneal             |
| A.D.     | Anlamlı değil               |
| SF       | Serum fizyolojik            |
| RTA      | Renal tübüler asidoz        |
| GFR      | Glomerüler filtrasyon hızı  |

## ŞEKİLLER

- Şekil 1:** Amfoterisin B'nin yapısal formülü
- Şekil 2:** Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in kimyasal yapısı
- Şekil 3:** Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki SOD aktivitesi
- Şekil 4:** Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki CAT aktivitesi
- Şekil 5:** Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki MDA düzeyleri
- Şekil 6:** Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki NO düzeyleri



## TABLÖLAR

- Tablo 1:** Deneyde kullanılan cihazlar
- Tablo 2:** Histolojik parametrelerin skorlaması
- Tablo 3:** Sıçanların BUN ve kreatinin değerleri
- Tablo 4:** Sıçan böbrek dokusunda ölçülen MDA ve NO seviyeleri ile enzim aktiviteleri
- Tablo 5a:** Kontrol ve CAPE gruplarının böbrek histopatolojik skorları
- Tablo 5b:** AmfB ve AmfB+CAPE gruplarının böbrek histopatolojik skorları
- Tablo 6:** Sıçan gruplarının böbrek histopatolojik değerlendirmesi

## RESİMLER

- Resim 1:** Kontrol Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları  
**Resim 2:** CAPE Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları  
**Resim 3:** AmfB Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları  
**Resim 4:** AmfB + CAPE Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Amfoterisin B (AmfB) geniş spektrumlu bir antifungal olup insanlarda enfeksiyonlardan sorumlu olan mantarların çoğunun tedavisinde etkilidir (1,2). AmfB kullanımını sınırlayan en önemli yan etki nefrotoksisitedir (1,3,4,5). Bu nefrotoksisitenin, AmfB'nin yüksek dozları, diüretik kullanımı, artmış serum kreatinin değerleri ve beraber kullanılan diğer nefrotoksik ilaçlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (1,6). AmfB nefrotoksisitesinin klinik belirtileri böbrek yetmezliği, üriner potasyum kaybı ve hipokalemi, üriner magnezyum kaybı ve hipomagnezemi, tip 1 renal tübüler asidoza bağlı metabolik asidoz ve nefrojenik diabetes insipitusa bağlı poliüridir (5).

Böbreklerin AmfB'den etkilenmesinin mekanizması kesin olarak açıklanamamıştır (6). Bununla birlikte hem tübüler hasar hem de renal vazokonstriksiyonun nefrotoksisitede önemli rolü olduğu öne sürülmüştür (5,7,8). AmfB nefrotoksisitesinde oksidatif hasarın rolü bilinmemektedir, bir *in vivo* çalışmada kullanılan AmfB'nin akciğer dokusu ve plazmada oksidatif stres belirteci olan oksitlenmiş glutasyon disülfid seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (9).

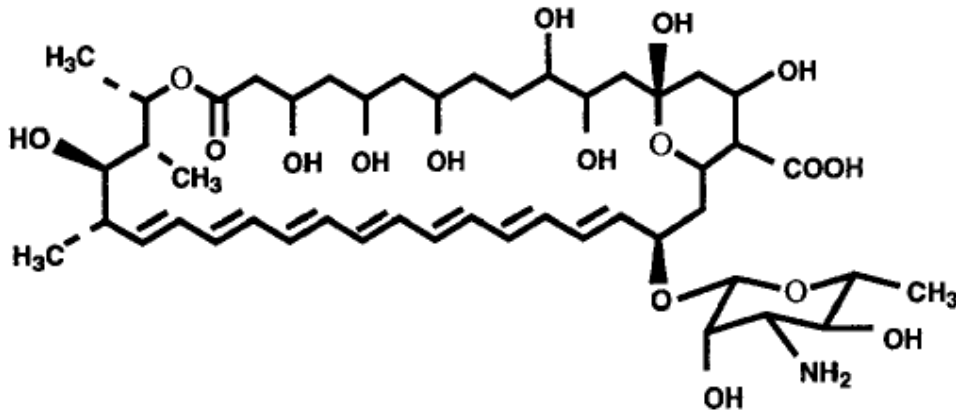
Kafeik asit fenetil ester (CAPE); arı kovanlarından elde edilen propolisin en potent komponenti olup antioksidan, antiinflamatuvar, sitostatik, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve immunmodülatör özellikleri olduğu bilinen bir moleküldür (10,11). Yaklaşık olarak 10 µmol/L konsantrasyonda *in vitro* koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke ettiği bildirilmiştir (12). CAPE'nin bildirilen antioksidan aktivitesine rağmen AmfB nefrotoksisitesi üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Daha önce deneysel modellerde AmfB'nin oksidatif stres belirteçleri ile ilişkisi gösterilmiştir (9,13) fakat AmfB nefrotoksisitesinde oksidatif hasarın rolü bilinmemektedir. Bu çalışmada, sıçanlarda oluşturulan deneysel AmfB 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. AMFOTERİSİN B

Amfoterisin B (AmfB) nötral pH'da su içinde çözünmeyen bir makrosiklik polyendir (1). İlk olarak 1955 yılında *Streptomyces Nodosus*'tan izole edilmiş olan bir antifungal ajandır. AmfB hidrofilik polihidroksil ve hidrofobik polyen gruplarından oluşan siklik bir moleküldür (2). İntravenöz uygulama için AmfB'nin sodyum deoksikolat ile oluşturulmuş koloidal solüsyonu kullanılmaktadır. AmfB ayrıca intravenöz olarak %5'lik glukoz solüsyonu ile de verilebilmektedir (1).



Şekil 1: Amfoterisin B'nin yapısal formülü (14).

#### 2.1.1.Etki Mekanizması

AmfB'nin fungal membranın ana sterolu olan ergosterole karşı güçlü bir afinitesi mevcuttur. (1,15) AmfB molekülünün hidrofobik polyen bölgesi fungal membranların lipid kısmına bağlanır, hidrofilik polihidroksil zincirleri ise membranda por oluşturur. Bu porlarla fungal membranın permeabilitesi dramatik olarak artar, intraselüler potasyumun hızlı bir şekilde azalması sonucu fungal hücre

ölür (2). Ayrıca AmfB, makrofajları uyarıp bazı oksidatif metabolitlerin ve serbest radikallerin salınımına neden olarak membran permeabilitesini bozar (15). Diğer bir etki mekanizması *Candida albicans*ta proton pompa inhibisyonu ve membran lipid peroksidasyonuna yol açmasıdır (1). AmfB'nin *Candida albicans* hücreleri ve protoplastların üzerindeki letal ve litik etkilerini oksidatif hasar aracılığı ile yaptığı gösterilmiştir (13). *In vivo* verilen AmfB'nin akciğer dokusu ve plazmada oksidatif stres belirteci olan oksitlenmiş glutatyon disülfid seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (9). Bakteri hücre membranlarında AmfB'nin bağlanacağı steroller olmadığı için ilacın antibakteriyel etkinliği bulunmamaktadır (16).

### 2.1.2. Etki Spektrumu

AmfB geniş spektrumlu bir antifungal olup insanlarda enfeksiyonlardan sorumlu olan fungusların çoğunda etkilidir (1,2,17). Kandidiazis, kriptokokoz, aspergilloz, histoplazmoz, blastomikoz, koksidiomikoz, zigomikoz, sporotrikoz, fusarioz, faeohipomikozda etkinliği mevcuttur (2). *Trichosporon spp*, *Aspergillus terreus*, *Scedosporium spp*, *Malassezia furfur*, *Candida lusitanae*, *Geotrichum spp* ve dermatomikoz etkenleri gibi bazı mantar türleri ise AmfB'ye dirençli ya da çok az duyarlıdırlar (1,2). AmfB ayrıca *Leishmania* gibi protozoalarda da etkindir (1). AmfB'ye karşı direnç gelişimi nadirdir. Mantar hücre çeperinde ergosterol miktarının azalması sonucu oluşur. Bu durum bazen devam etmekte olan tedavi esnasında, bazen de vejetasyon oluşumu gibi mantarın immün hücrelerden korunabildiği durumlarda meydana gelebilir (17). Etkisi geniş spektrumlu olmasından dolayı klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır.

### 2.1.3. Kullanım Şekli

Sistemik mantar enfeksiyonlarında kullanılan AmfB dozu genellikle 0.5-1.0 mg/kg/gün'dür (17). Kandida özofajitinde 0.15-0.2 mg/kg/gün, mukormikoz ve invazif aspergillozda 1.0-1.2 mg/kg/gün kullanılır (18). Tedavi süreleri aspergilloz ve

kriptokokozda 6-10 hafta, kandida özofajitinde 2-3 haftadır (19). İnvazif kandidozda tedavi süresi ve dozu artabilir. Erişkindeki granülositopenik fungemide tedavi süresi 2-4 hafta, toplam doz 15 mg/kg; granülositopenik olmayan fungemide ise ortalama tedavi süresi 2 hafta, toplam doz ise 7 mg/kg'dır. Hepatosplenik kandidiaziste birkaç aylık tedavi gerekebilir (20).

#### **2.1.4. Farmakokinetiği**

AmfB'nin gastrointestinal kanaldan veya intramusküler enjeksiyon bölgesinden emilimi çok sınırlıdır (1,16,20). Suda çözünmediğinden enjeksiyon için hazırlanmış preparatları sodyum deoksikolat ile kompleks halindedir, bu nedenle su ile karıştırıldığı zaman su içinde homojen dağılıbilir. Bu solüsyon da %5'lik glukoz solüsyonu içinde 0.1mg/ml konsantrasyonunda hazırlanır. İntravenöz olarak yavaş infüzyon yapılır (16).

İntravenöz enjeksiyon sonrası AmfB plazma proteinlerine güçlü bir şekilde bağlanır (%91-%95 oranında) (1). Eritrositlere ve plazma kolesterolüne de bağlanabilen AmfB dokulara da geniş bir şekilde geçer ve dokulardan kana dağılır (21). Dağılımı 3 fazlı bir modele uymaktadır. Plazma yarı ömrü 24-48 saattir, fakat eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 15 gündür. En çok karaciğerde olmak üzere (uygulanan dozun %14-41'i) böbrekler ve akciğerlerde de yüksek konsantrasyonlarda bulunur (1). Esas olarak karaciğerde metabolize olup, %5-10'u idrar ve safra ile atılır (16). AmfB'nin kompleks farmakokinetiğinden dolayı kandaki konsantrasyonları doku konsantrasyonlarını yansıtmamaktadır (1). AmfB tedavisinden sonra 1 yılı aşkın bir sürede karaciğer ve böbrek dokularında ilaç saptanabilmektedir (20). AmfB diyaliz ile de temizlenememektedir (1).

### **2.1.5. AmfB Yan Etkileri ve Nefrotoksisitesi**

Hastaların %70-90'ında bulantı, kusma, ateş, titreme, enjeksiyon bölgesinde ağrı, gastrointestinal şikayetler, tromboflebit, bronkospazm, hipotansiyon ve aritmi gibi infüzyonla ilişkili yan etkiler oluşmaktadır. Bu infüzyonla ilişkili reaksiyonlara karşı tolerans genellikle tedavi esnasında gelişir (1).

AmfB kullanımını sınırlayan en önemli yan etki nefrotoksisitedir (1,3,4,5). Bu nefrotoksisitenin AmB'nin yüksek dozları, diüretik kullanımı, anormal serum kreatinin değerleri ve beraber kullanılan nefrotoksik ilaçlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (1,6).

#### **2.1.5.1 AmfB Nefrotoksisitesinin Patofizyolojisi**

Böbreklerin AmfB'den etkilenmesinin mekanizması kesin olarak açıklanamamıştır (6). Bununla birlikte hem tübüler hasar hem de renal vazokonstriksiyonun nefrotoksisitede önemli rolü olduğu öne sürülmüştür (5,7,8). Polyen antibiyotikler antifungal etkilerini fungal hücrenin membran permeabilitesini değiştirerek ve intraselüler elementlerin kaybına yol açarak gösterirler. Ancak AmfB memeli hücre membranındaki kolesterol moleküllerine de bağlanır; renal vasküler hücreler ve renal epitelyal hücrelerde porlar oluşturarak membran permeabilitesini arttırır. Vasküler ve tübüler etkilerinin hücre membranında oluşturduğu bu değişikliklere sekonder olduğu düşünülmektedir (4-6).

İnsan ve hayvanlarda AmfB'nin akut renal vazokonstriktif etkisi iyi gözlemlenmiştir. AmfB'nin intravenöz veya renal arter içine infüzyonu renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızı (GFR)'nda kısa dönemde bir azalmaya ve glomerüler afferent arteriolar ve renal vasküler dirençte artışa neden olur. AmfB'ye karşı kontraktıl yanıtın mekanizmaları birçok araştırmanın odağı olmuştur. İlaç etkisini ya vasküler düz kaslar üzerinde direk bir etki ile ya da sekonder mediyatörlerin salınımına yol açarak bu vazokonstriksiyonu gerçekleştiriyor olabilir (5). Akut AmfB nefrotoksisitesinde tubuloglomerüler *feedback* mekanizmasının

rolünden de bahsedilmektedir (5,7). Ancak son çalışmalar AmfB'nin neden olduğu GFR azalmasında tubuloglomerüler *feedback* mekanizmasının rolü olduğunu desteklememiştir (5,22). Çalışmalarda AmfB'nin araşidonik asit metabolitlerinin sentezini aktive ettiğine dair kanıtlar mevcuttur (5). Son yapılan bir *in vitro* çalışmada AmfB varlığında tromboksan B<sub>2</sub> seviyelerinde belirgin bir artış ve AmfB'nin neden olduğu vazokonstriksiyonu geriye döndürmek için spesifik bir tromboksan A<sub>2</sub> reseptör antagonisti tespit edilmiştir (23). AmfB'nin neden olduğu nefrotoksisitede direk vazokonstriksiyon da muhtemel bir neden olabilir. AmfB bir kalsiyum iyonoforu olarak davranabilir ve/veya membran potansiyelini değiştirerek kalsiyum dengesini bozabilir (5).

Temel olarak distal tübülde ve ayrıca proksimal tübülde de olan artmış tübüler permeabilite; antibiyotiğin membrana bağlı sterollerle etkileşimi sonucu meydana gelen plazma membranlarının solüt geçirgenliklerindeki artış ile ilişkilendirilmiştir. AmfB fungal hücre duvarındaki ergosterole ve daha az afinite ile de memeli plazma membranlarındaki kolesterole bağlanmaktadır (5). AmfB hücre zarı yapısını değiştirerek membran geçirgenliğinde artışa neden olur, hücre içerikleri ve iyon kaybına bağlı olarak sonuçta hücre ölümü gerçekleşir (7,22). AmfB membran sterollerine en fazla böbrek hücrelerinde bağlanır (7).

#### **2.1.5.2. AmfB Nefrotoksisitesinde Histopatolojik Bulgular**

Renal histopatolojik değişiklikler çeşitlidir ve muhtemelen doza bağlıdır. Glomerüler lezyonlar; kalınlaşmış veya fragmente bazal membranları, hiperselüleriteyi, fibrozis ve hiyalinizasyonu içermektedir (5,7). Tübüler lezyonlar ise primer olarak henle kulpunun çıkan kolunu ve geri emilmemiş solüt ve idrar asiditesinin en yüksek konsantrasyonda olduğu distal kıvrımlı tübüleri tutan fokal ve yaygın dejenerasyon ve atrofiden oluşmaktadır. Proksimal ve distal kıvrımlı tübüllerde nefrokalsinozis meydana gelir. Bu değişiklikler hem hipoksiye en hassas bölgelerde (medulla), hem de oksijen yönünden zengin bölgelerde (glomerül) yer almaktadır (5).



### **2.1.6. AmfB Nefrotoksisitesinin Klinik Bulguları**

AmfB nefrotoksisitesinin klinik belirtileri böbrek yetmezliği, üriner potasyum kaybı ve hipokalemi, üriner magnezyum kaybı ve hipomagnezemi, tip 1 renal tübüler asidoz (RTA)'a bağlı metabolik asidoz ve nefrojenik diyabetes insipitusa bağlı poliüridir (5).

#### **2.1.6.1. Azotemi**

AmfB verilen hastaların % 80'den fazlasında BUN ve serum kreatinin seviyelerinde artış olduğu rapor edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda hastaların % 40-60'ında serum kreatininin en azından iki katına çıktığı gösterilmiştir. AmfB'ye sekonder azoteminin genellikle geri dönüşümlü olduğu düşünülür. Ancak persistan hasar insidansının doz bağımlı olduğu gösterilmiştir. Total olarak 4 gramdan fazla AmfB alan hastalarda kronik böbrek yetmezliği % 44 oranında gözlenmiş; total olarak 4 gramdan daha az ilaç alan hastaların ise % 17'sinde persistan azotemi tespit edilmiştir (5) AmfB ile tedavi olan hastalarda tedavinin ilk 2-3 haftasında GFR'nin % 40 (% 20-60) oranında azaldığı ve daha sonra da bu şekilde kaldığı gösterilmiştir. Tedavi tamamlandıktan 1-2 ay sonra GFR normale döner fakat renal kan akımı daha uzun sürede normalleşir. Yaş ve hastanın hidrasyon durumu azotemi gelişimindeki önemli risk faktörlerindedir (7).

#### **2.1.6.2. Renal Tübüler Asidoz**

AmfB tedavisi sırasındaki RTA gelişimi ilk olarak Sanford ve arkadaşları tarafından AmfB ile tedavi edilen 6 hastalarının 4'ünde gelişen kompanse metabolik asidoz şeklinde rapor edilmiştir (5,23). Daha sonraları birçok rapor hastalarda AmfB'nin neden olduğu idrar asidifikasyon defektini göstermiştir (23). Asidifikasyon defektinin doz-bağımlı olduğu düşünülmektedir. Asidifikasyon defekti genellikle GFR'de belirgin bir düşüşten önce gelmektedir ve genellikle tedavinin bitiminden birkaç ay sonra geriye dönmektedir. Düşük AmfB dozlarında (<1g) klinik

olarak gözlenebilen asidoz insidansı oldukça düşüktür (<2%). Bir g'dan yüksek AmfB dozlarında ise asit yüklenmesine anormal yanıt alınmıştır (5,23). AmfB tübüllerden hidrojen iyonu atılımını azaltarak distal RTA oluşturur (7).

### **2.1.6.3. Renal Konsantrasyon Defekti ve Poliüri**

Bu durum tedavi esnasında 1-2 haftada oluşur ve tüm hastalarda değişmez bir klinik belirtidir (5). Azotemisi olmayan hastalarda meydana gelebilir, vazopressine karşı bir yanıt değildir ve genellikle reversibldir (23). Konsantrasyon kabiliyetindeki anormallik sıklıkla GFR'deki düşüşle birliktelik gösterir (7). Ayrıca hipokalemi de AmfB tedavisinin yaygın bir komplikasyonu olup konsantrasyon defektinin de iyi tanımlanmış bir nedenidir ancak patogeneizde başka nedenlerin olduğu da düşünülmektedir (23).

### **2.1.6.4. Hipokalemi**

AmfB tedavisi alanların ¾'ünde hipokalemi görülür. Sıklıkla replasman gerektirir. Nedeni tam olarak açık olmamakla birlikte AmfB'nin distal tübüllerdeki direkt toksik etkisine bağlı olarak distal tübüllerin potasyuma geçirgenliğinin artması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca distal tübüllerde Na-K değişim pompası üzerindeki etki de neden olabilir (7).

### **2.1.6.5. Hipomagnezemi**

AmfB tedavisinin yaygın bir özelliğidir. Genellikle ılımlı hipomagnezemi olsa da bazı hastalarda magnezyum replasmanı gerektirecek düzeyde ciddi düşüşler olabilir. Hipokalemi tedavisinde öncelikle hipomagnezeminin düzeltilmesi önemlidir (5).

### **2.1.7. AmfB Nefrotoksitesi için Risk Faktörleri**

AmfB'nin kümülatif dozları, tedavi süresi, AmfB ile kombine edilen diğer nefrotoksik ilaçlar (diüretikler, siklosporin gibi), hastada varolan kronik hastalıklar, ileri yaş, yüksek kreatinin seviyelerinin AmfB'nin neden olduğu nefrotoksistide yüksek risk oluşturduğu düşünülmektedir. İnfüzyon hızı ve AmfB konsantrasyonlarının risk oluşturmadığı öne sürülmektedir (22).

### **2.1.8. AmfB Lipid Formülleri**

Geniş spektrumlu antifungal aktivitesine rağmen AmfB'nin klinik kullanımı nefrotoksite nedeni ile oldukça sınırlıdır. Bu nefrotoksisteyi en aza indirmek için çeşitli stratejiler kullanılmıştır. Tolerabilitesini arttırmak, etkisini çoğaltmak için AmfB'nin yeni formülasyonları yapılmıştır. AmfB'nin 3 çeşit lipid formülasyonu üretilmiştir. Bunlar AmfB lipid kompleks; koloidal dağılımlı AmfB ve lipozomal AmfB'dir (2). Bu formülasyonlar şeklinde verilen AmfB özellikle retiküloendotel hücrelerden zengin dokularda konvansiyonel forma göre daha fazla birikir. Böbreklerde ise çok daha az miktarlarda toplanmaktadır (16). Lipid formülasyonların AmfB-deoksikolata nazaran yarılanma ömürleri daha fazla, dağılım hacmi daha geniş ve plazma hacmi ise daha düşüktür (20).

## **2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri**

Serbest radikaller; yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektronun olduğu atom veya atom gruplarıdır (24). Bu eşleşmemiş elektron nedeni ile serbest radikal molekülü kararsız konumdadır ve kararlı yapı kazanabilmesi için elektronunu başka bir elektronla eşleştirmesi gerekir. Bu nedenle serbest radikalın kimyasal aktivite potansiyeli yüksektir (25). Bu oksidan ürünlerin arttığı durumlarda hedef moleküller olan membran yapısındaki fosfolipidler, glikolipidler, membran proteinleri ve doymamış yağ asitleri oksidatif strese maruz kalırlar (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 asiti (HOCl) gibi nonradikal türleri sayabiliriz. Reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit ( $NO_2^-$ ) gibi serbest radikaller ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), nitroz 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 endotelial 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  $H_2O$  ve  $O_2$ 'e parçalanır.  $H_2O_2$  ayrıca Fe, Cu gibi elementlerin varlığında reaktif hidroksil (OH) radikaline dönüştürülebilir (Fenton reaksiyonu) (30).

### **2.3. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları**

Alkol, uyuşturucu gibi bağımsıklık yapan maddeler, radyasyon, hava kirliliği, pestisitler, solventler, anestetik maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara ve antineoplastikler eksojen 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).

#### **2.4. 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).

##### **2.4.1. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu**

Lipidler, biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Özellikle 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).

##### **2.4.2. 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

molekölünün hasarı kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenez, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara yol açar (35).

## **2.5. Antioksidan Sistem**

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

### **2.5.1. Nonenzimatik Antioksidanlar**

**Vitamin C:** Nitrik oksit sentaz tetrahidrofolatı stabilize ederek nitrik oksit (NO) üretimini artırır (30).

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

**$\beta$ -Karoten:** Serbest radikalleri temizler, peroksitleri inaktif hale getirir (37,38).

**Koenzim Q10:** Yağda çözünen bir antioksidan olup  $O_2^{\cdot}$ 'i temizleyerek endotelial disfonksiyonu azaltır (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).

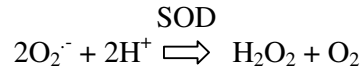
**Glutasyon (GSH):** Tiyol grubu içeren bir tripeptiddir. Hücredeki önemli fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi, enzim aktivitesi regülasyonu gibi) yanı sıra antioksidan olarak da görev yapar (42). Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girip oksidatif hasara karşı koruma yapar. Karaciğer vücuttaki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

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

## 2.5.2. Enzimatik Antioksidanlar

### 2.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

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



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

### 2.5.2.2. 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).

### 2.5.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon Redüktaz (GR):

GSH-Px, yapısında selenyum metali bulunan bir metalloenzimdir. Redükte glutasyonu okside glutasyona dönüştürürken aynı zamanda  $H_2O_2$ 'yi de suya çevirir. Okside glutasyon ise glutasyon redüktaz (GR) enzimi aracılığı ile NADPH

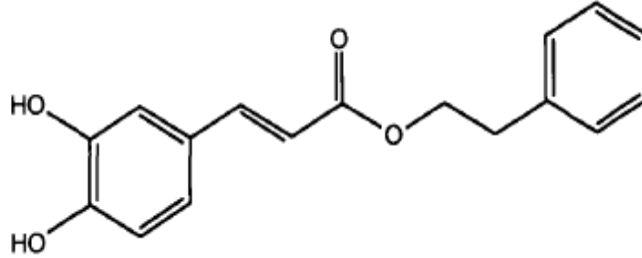
kullanılarak yeniden redükte glutatyona dönüştürülür (44). Ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düşük yoğunlukta ise GSH-Px, CAT'a göre daha aktiftir (26).

## 2.6. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

CAPE, bal arılarının ürettiği propoliste bulunan flavonoid benzeri bir yapıya sahip, antiinflamatuvar, 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).

### 2.6.1. 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).



### 2.6.2. CAPE'nin Fonksiyonel Özellikleri ve Antioksidan Etkisi

CAPE'nin 5-alfa redüktaz, proteaz, ornitin karboksilaz, Human Immunodeficiency Virus 1 integras gibi enzimleri inhibe etme özelliği mevcuttur (12,54,55). 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 adenosin 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 (60-62).

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). Streptozotosin 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).

### **3. MATERYAL ve METOD**

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji, Histoloji ve Biyokimya Anabilim Dallarının laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1457-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınarak etik kurallara uygun bir şekilde yapılmıştır.

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Deney Hayvanları**

Bu projede 200-250 gram arasında değişen toplam 40 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar çalışma süresince standart ışık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) ve ısı (25 C<sup>0</sup>)'da tutuldu. Sıçanların her bir grubu ayrı kafeslere konarak yeterli miktarda içme suyu ve standart sıçan pellet yemi verildi.

#### **3.2. Metod**

##### **3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması**

Çalışmada sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu n=10): 6 gün boyunca günde bir kez 1 mL/kg SF intraperitoneal (i.p.) yoldan verildi.

Grup 2 (CAPE kontrol grubu n=10): 6 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi.

Grup 3 (AmfB grubu n=10): 6 gün boyunca günde bir kez 1 mL/kg SF i.p. yoldan verildi. 2. gün AmfB (Fungizone, Bristol-Myers Squibb SA, France) 50 mg/kg tek dozda i.p. olarak enjekte edildi.

Grup 4 (AmfB + CAPE grubu n=10): 6 gün boyunca günde bir kez 10 µmol/kg CAPE i.p. yoldan verildi ve 2. gün AmfB (Fungizone, Bristol-Myers Squibb SA, France) 50 mg/kg tek dozda i.p. olarak enjekte edildi.

Deneye başlamadan ve sakrifikasyon işleminden hemen önce tüm sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Bütün grupların enjeksiyonu i.p. yoldan aynı gün başlandı ve 6 gün boyunca yapılarak aynı gün sonlandırıldı. Kontrol grubuna 1 ml/kg SF i.p. verildi. CAPE ve AmfB + CAPE gruplarına Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya (64) uygun şekilde 10 µmol/kg dozunda CAPE, AmfB ve AmfB + CAPE gruplarına Feldman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya (65) uygun şekilde 50 mg/kg dozda i.p. tek enjeksiyon AmfB (Fungizone, Bristol-Myers Squibb SA, France) uygulandı.

### **3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Biyokimyasal ölçümler için kullanılan kimyasal maddeler; Folin & Ciocalteus's Phenol Reagent (2N), kloroform, n-Butanol, etanol Merck firmasının; glycine (amino asetic acid; glycoll) ( $C_2H_5NO_2$ ), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form NADPH;  $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$ ), nitroblue tetrazolium (NBT  $C_{40}H_{30}C_{12}N_{10}O_6$ ), Xanthine ( $C_5H_4N_4O_2$ ), Xanthine Oxidase, Sigma firmasının üretimidir.

### 3.2.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Deneyde kullanılan cihazlar Tablo 1’de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** Deneyde kullanılan cihazlar

|   |                       |                                       |
|---|-----------------------|---------------------------------------|
| 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)     |

### 3.2.4. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Sıçanlar, son enjeksiyondan 1 saat sonra (deneyin 6. günü) i.p. ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) 80 mg/kg + ksilazin (Alfamin, Alfasan IBV) 10 mg/kg ile anestezi yapılarak, orta hat insizyonuyla sıçanların batınları açıldı. Vena portadan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün 1000xg’de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum üre ve kreatinin ölçümleri Abbott Aeroset cihazında uygun ticari kitleri ile çalışıldı.

### 3.2.5. Böbreklerin Çıkarılması

Sıçanların böbrekleri deneyin başlangıcından altı 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 eppendorf tüplerine konarak histopatolojik değerlendirme

yapılıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi. Sağ böbrek analizini yapıldığı tarihe kadar  $-80\text{ C}^0$ 'de muhafaza edildi.

### **3.2.6. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için Hazırlanması**

#### **3.2.6.1. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler**

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

#### **3.2.6.2. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin 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  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant sağlandı. Ayrılan süpernatantlardan CAT enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilerek ekstrakt hazırlandı. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzimi aktivite tayini yapıldı.

### **3.2.7. Dokularda Biyokimyasal Analizler**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle MDA ve NO seviyeleri ile CAT ve SOD enzim aktiviteleri ölçüldü.

MDA düzeyini tayin için Draper ve Hadley çift ısıtma yöntemi kullanıldı (67). SOD (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre (68), CAT (EC 1.11.1.6) enzim aktivitesi Aebi metoduna göre (69), çalışıldı. Nitrik oksit ise Cortas'ın metoduna göre çalışıldı (70). Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı. (71).

### **3.2.8. 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. Hematoksilin-eozin ile boyanarak Olympus BX50 araştırma mikroskopunda değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi. Değerlendirme Wahhab ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya (72) paralel olarak yapıldı.

#### **Histopatolojik değerlendirmede kullanılan parametreler şunlardır:**

- Proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon
- Hiperkromatik hücre çekirdekleri
- Medullada hemorajik alanlar
- Kortekste nekrotik alanlar
- Medullada mononükleer hücre infiltrasyonu
- Kortekste mononükleer hücre infiltrasyonu
- Toplayıcı tubüllerde genişleme / dejenerasyon

**Tablo 2: Histolojik parametrelerin skorlaması**

|                             |                                      |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| ( - )<br>(negatif skor)     | Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması |
| ( + )<br>(1 pozitif skor)   | Hafif derecede yapısal değişik       |
| ( ++ )<br>(2 pozitif skor)  | Orta derecede yapısal değişik        |
| ( +++ )<br>(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  $\pm$  standart sapma olarak verildi ve  $p < 0.05$  olan değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Bu deneysel çalışmada sıçanlara anestezi verilmeden önceki aşamada AmfB grubu ve AmfB+CAPE grubunun her ikisinden üçer sıçan olmak üzere toplam altı adet sıçan ölmüştür. Yapılan homojenizasyon işlemi sırasında CAPE grubundan bir doku tüpü kırıldığı için kırılan tüpün sıçanı çalışmadan çıkarıldı.

### 4.1. Biyokimyasal Parametreler

Biyokimyasal parametrelerin sonuçları **Tablo 3** ve **Tablo 4**'de verilmiştir.

**Tablo 3:** Sıçanların BUN ve kreatinin değerleri.

| GRUPLAR           | n  | BUN<br>(mg/dL) | Kreatinin<br>(mg/dL) |
|-------------------|----|----------------|----------------------|
| 1-Kontrol grubu   | 10 | 21.4 ± 3.4     | 0.58 ± 0.10          |
| 2-CAPE grubu      | 9  | 18.7 ± 2.6     | 0.51 ± 0.03          |
| 3-AmfB grubu      | 7  | 73.5 ± 39.2    | 1.61 ± 1.13          |
| 4-AmfB+CAPE grubu | 7  | 88.5 ± 29.1    | 1.54 ± 0.74          |

*P*-değerleri

|     |  |         |         |
|-----|--|---------|---------|
| 1-2 |  | AD      | AD      |
| 1-3 |  | <0.0001 | <0.0001 |
| 1-4 |  | <0.0001 | =0.005  |
| 2-3 |  | <0.0001 | <0.0001 |
| 2-4 |  | <0.0001 | =0.003  |
| 3-4 |  | AD      | AD      |

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



**Tablo 4:** Sıçan böbrek dokusunda ölçülen MDA ve NO seviyeleri ile enzim aktiviteleri.

| GRUPLAR                  | n  | SOD<br>(U/mg protein) | CAT<br>(k/g protein) | MDA<br>(nmol/g protein) | NO<br>( $\mu$ mol/g protein) |
|--------------------------|----|-----------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| <b>1-Kontrol grubu</b>   | 10 | 0.055 $\pm$ 0.008     | 1.30 $\pm$ 0.15      | 5.10 $\pm$ 0.83         | 0.216 $\pm$ 0.029            |
| <b>2-CAPE grubu</b>      | 9  | 0.053 $\pm$ 0.007     | 1.30 $\pm$ 0.17      | 5.34 $\pm$ 0.81         | 0.202 $\pm$ 0.015            |
| <b>3-AmfB grubu</b>      | 7  | 0.086 $\pm$ 0.007     | 0.85 $\pm$ 0.15      | 6.64 $\pm$ 1.38         | 0.295 $\pm$ 0.047            |
| <b>4-AmfB+CAPE grubu</b> | 7  | 0.063 $\pm$ 0.006     | 1.13 $\pm$ 0.23      | 5.56 $\pm$ 0.82         | 0.237 $\pm$ 0.031            |

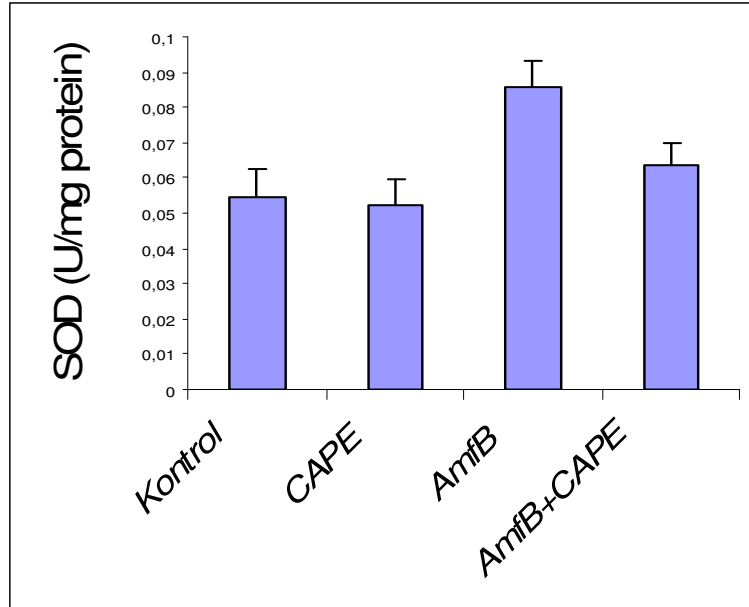
*P*-değerleri

|            |  |         |         |        |         |
|------------|--|---------|---------|--------|---------|
| <b>1-2</b> |  | AD      | AD      | AD     | AD      |
| <b>1-3</b> |  | <0.0001 | <0.0001 | =0.003 | <0.0001 |
| <b>1-4</b> |  | =0.023  | AD      | AD     | AD      |
| <b>2-3</b> |  | <0.0001 | <0.0001 | =0.012 | <0.0001 |
| <b>2-4</b> |  | =0.006  | AD      | AD     | =0.032  |
| <b>3-4</b> |  | <0.0001 | =0.005  | =0.044 | =0.002  |

AD, anlamlı değil. *n* = sıçan sayısı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

#### 4.1.1. Gruplarda SOD Aktivitesi:

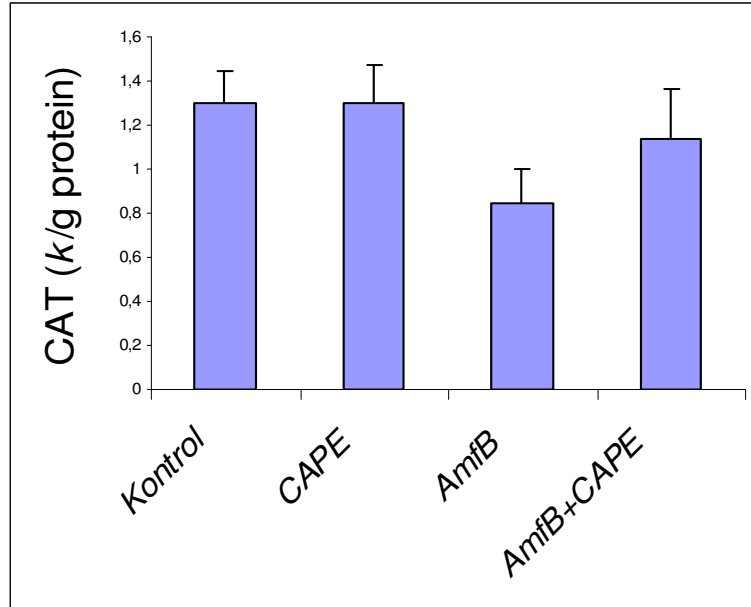
Şekil 3’de ifade edilmiştir. Sonuçlara göre kontrol ve CAPE grupları arasında böbrek dokusu SOD aktivitesinde istatistiksel olarak fark saptanmadı. AmfB grubu böbrek dokusunda SOD aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p=0.0001$ ). AmfB+CAPE grubundaki SOD aktivitesi ise AmfB grubundakinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olmasına karşın ( $p=0.0001$ ), kontrol grubu SOD aktivitesinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0.023$ ).



Şekil 3: Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki SOD aktivitesi

#### 4.1.2. Gruplarda CAT Aktivitesi:

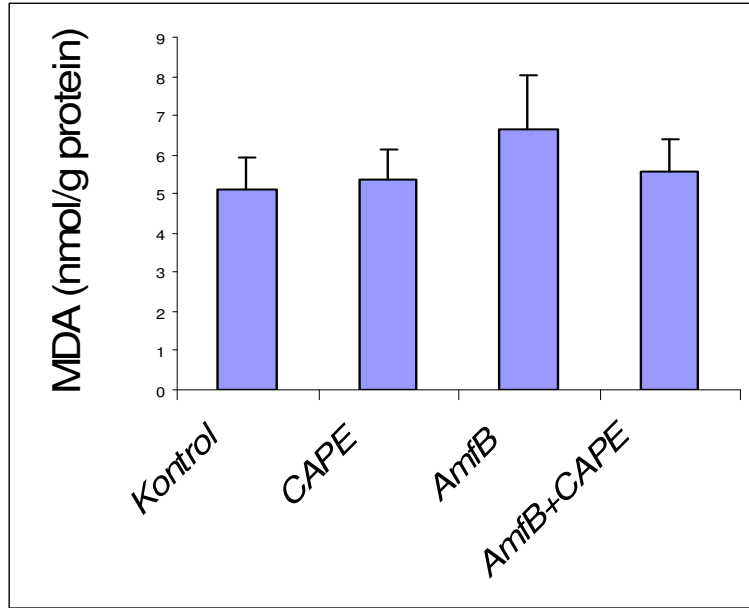
Şekil 4’de görüldüğü üzere kontrol ve CAPE grupları arasında böbrek dokusu CAT aktivitesinde istatistiksel olarak fark gözlenmemektedir. AmfB grubu böbrek dokusunda CAT aktivitesi kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptandı ( $p=0.0001$ ). AmfB+CAPE grubunda ise CAT aktivitesi AmfB grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0.005$ ). AmfB+CAPE grubu ile kontrol grubu CAT aktivitesi karşılaştırılığında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4: Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki CAT aktivitesi

#### 4.1.3. Gruplarda Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri:

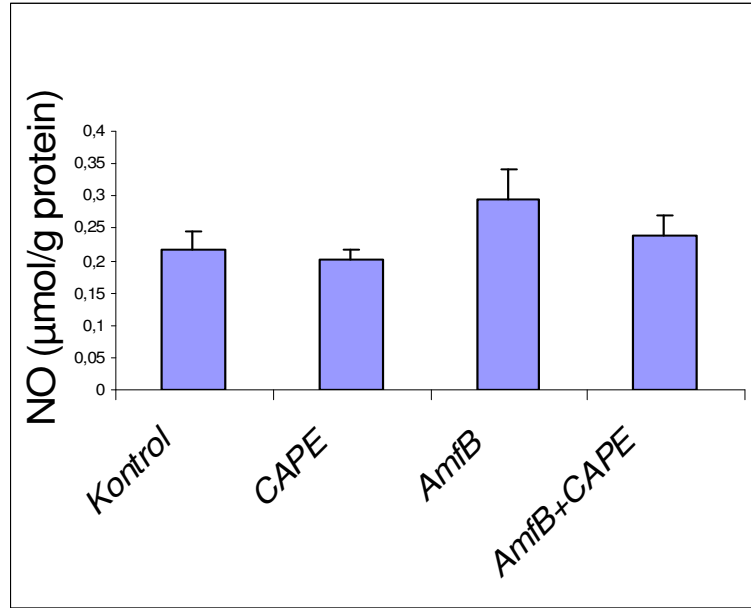
Şekil 5’de görüldüğü gibi kontrol ve CAPE gruplarının MDA düzeyleri benzerdi. AmfB grubu MDA düzeyi, kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ( $p=0.003$ ). AmfB+CAPE grubunda ise MDA düzeyi AmfB grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0.044$ ). AmfB+CAPE ve kontrol grupları MDA düzeyleri açısından benzerdi.



Şekil 5: Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki MDA düzeyleri

#### 4.1.4. Gruplarda Böbrek Dokusu NO Düzeyleri:

Şekil 6'de görüldüğü gibi kontrol ve CAPE gruplarının NO düzeyleri benzerdi. AmfB grubu NO düzeyi, kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ( $p=0.0001$ ). AmfB+CAPE grubunda ise NO düzeyi AmfB grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ( $p=0.002$ ). AmfB+CAPE ve kontrol gruplarının NO düzeyleri benzerdi.



Şekil 6: Çalışma gruplarının böbrek dokusundaki NO düzeyleri

## 4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Kontrol ve CAPE gruplarının sol böbreklerinin histolojik değerlendirilmesinde aldıkları skorlar **Tablo 5a**'da ve AmfB ve AmfB+CAPE gruplarının histolojik skorları ise **Tablo 5b**'de gösterilmiştir.

**Tablo 5a:** Kontrol ve CAPE gruplarının böbrek histopatolojik skorları

| Deney grupları                                    | Kontrol grubu<br>(n=10) |   |    |     |   | CAPE grubu<br>(n=9) |   |    |     |   |
|---|-------------------------|---|----|-----|---|---------------------|---|----|-----|---|
|   | -                       | + | ++ | +++ | O | -                   | + | ++ | +++ | O |
| Proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon         | 10                      | 0 | 0  | 0   | - | 8                   | 1 | 0  | 0   | - |
| Tübüler epitelde hiperkromatik hücre çekirdekleri | 7                       | 3 | 0  | 0   | - | 7                   | 1 | 1  | 0   | - |
| Medullada hemorajik alanlar                       | 10                      | 0 | 0  | 0   | - | 8                   | 1 | 0  | 0   | - |
| Kortekste nekrotik alanlar                        | 10                      | 0 | 0  | 0   | - | 9                   | 0 | 0  | 0   | - |
| Medullada mononükleer hücre infiltrasyonları      | 10                      | 0 | 0  | 0   | - | 8                   | 1 | 0  | 0   | - |
| Kortekste mononükleer hücre infiltrasyonları      | 10                      | 0 | 0  | 0   | - | 7                   | 2 | 0  | 0   | - |
| Toplayıcı tübüllerde genişleme/dejenerasyon       | 9                       | 1 | 0  | 0   | - | 7                   | 2 | 0  | 0   | - |

n= sıçan sayısı. O=ortanca değer.

**Tablo 5b:** AmfB ve AmfB+CAPE gruplarının böbrek histopatolojik skorları

| Deney grupları                                    | AmfB grubu<br>(n=7) |   |    |     |     | AmfB+CAPE grubu<br>(n=7) |   |    |     |   |
|---|---------------------|---|----|-----|-----|--------------------------|---|----|-----|---|
|   | -                   | + | ++ | +++ | O   | -                        | + | ++ | +++ | O |
| Proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon         | 0                   | 0 | 1  | 6   | +++ | 2                        | 3 | 1  | 1   | + |
| Tübüler epitelde hiperkromatik hücre çekirdekleri | 1                   | 2 | 3  | 1   | ++  | 1                        | 5 | 1  | 0   | + |
| Medullada hemorajik alanlar                       | 0                   | 2 | 4  | 1   | ++  | 5                        | 2 | 0  | 0   | - |
| Kortekste nekrotik alanlar                        | 0                   | 1 | 5  | 1   | ++  | 2                        | 5 | 0  | 0   | + |
| Medullada mononükleer hücre infiltrasyonları      | 2                   | 4 | 1  | 0   | +   | 1                        | 4 | 2  | 0   | + |
| Kortekste mononükleer hücre infiltrasyonları      | 0                   | 1 | 5  | 1   | ++  | 2                        | 4 | 1  | 0   | + |
| Toplayıcı tübüllerde genişleme/dejenerasyon       | 0                   | 1 | 1  | 5   | +++ | 2                        | 5 | 0  | 0   | + |

n= sıçan sayısı. O=ortanca değer.

**Tablo 6:** Sıçan gruplarının böbrek histopatolojik değerlendirmesi

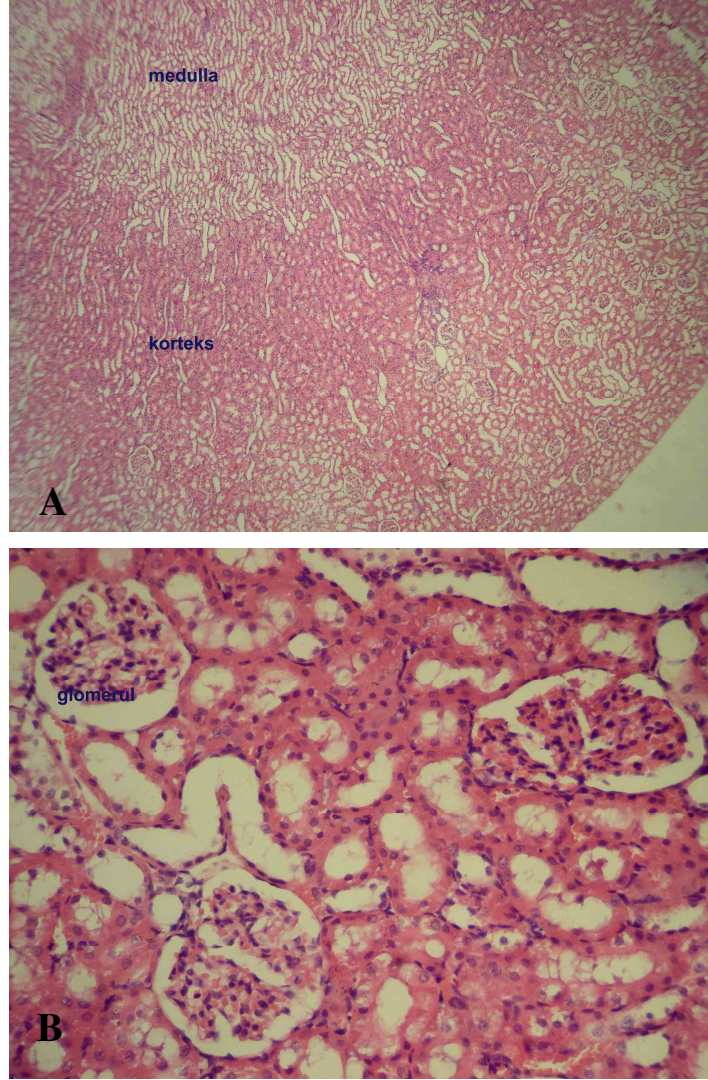
| GRUPLAR                  | n  | Proksimal ve distal tübüler dilatasyon (Ortalama± SD) | Tübüler epitelde hiperkromatik hücre çekirdekleri (Ortalama± SD) | Medullada hemorajik alanlar (Ortalama± SD) | Kortekste nekrotik alanlar (Ortalama± SD) | Medullada mononükleer hücre infiltrasyonu (Ortalama± SD) | Kortekste mononükleer hücre infiltrasyonu (Ortalama± SD) | Toplayıcı tübüllerde genişleme/dejenerasyon (Ortalama± SD) |
|--------------------------|----|---|--|--|---|--|--|--|
| <b>1-Kontrol grubu</b>   | 10 | 0.00 ± 0.00   | 0.30 ± 0.48  | 0.00 ± 0.00                                | 0.00 ± 0.00                               | 0.00 ± 0.00  | 0.00 ± 0.00  | 0.10 ± 0.32  |
| <b>2-CAPE grubu</b>      | 9  | 0.11 ± 0.33   | 0.33 ± 0.71  | 0.11 ± 0.33                                | 0.00 ± 0.00                               | 0.11 ± 0.33  | 0.22 ± 0.44  | 0.22 ± 0.44  |
| <b>3-AmfB grubu</b>      | 7  | 2.86 ± 0.38   | 1.57 ± 0.98  | 1.86 ± 0.69                                | 2.00 ± 0.58                               | 0.86 ± 0.69  | 2.00 ± 0.58  | 2.57 ± 0.79  |
| <b>4-AmfB+CAPE grubu</b> | 7  | 1.14 ± 1.07   | 1.00 ± 0.58  | 0.29 ± 0.49                                | 0.71 ± 0.49                               | 1.14 ± 0.69  | 0.86 ± 0.69  | 0.71 ± 0.49  |

P- değerleri

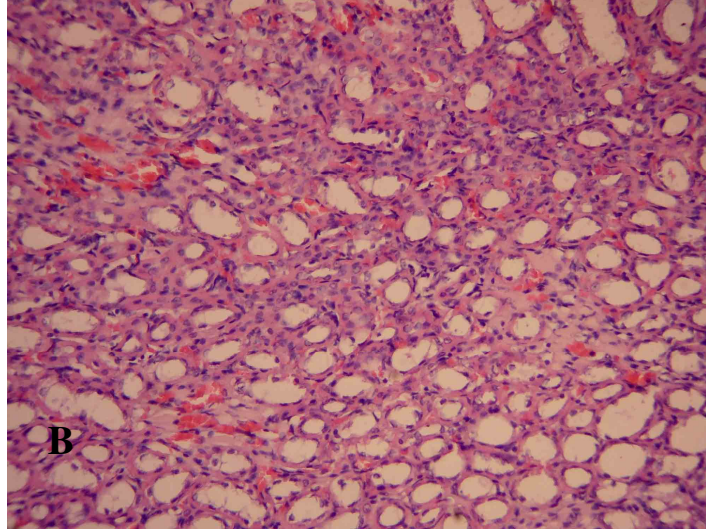
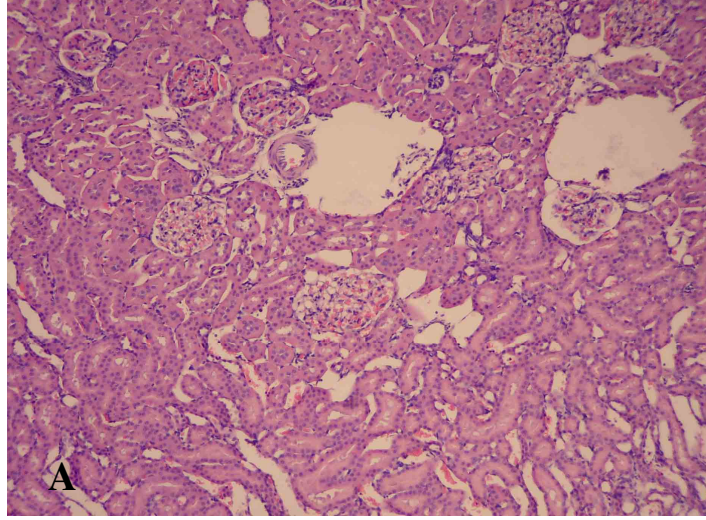
|     |         |        |         |         |         |         |         |         |
|-----|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1-2 | AD      | AD     | AD      | AD      | AD      | AD      | AD      | AD      |
| 1-3 | <0.0001 | =0.001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | =0.001  | <0.0001 | <0.0001 |
| 1-4 | <0.0001 | =0.049 | AD      | AD      | <0.0001 | <0.0001 | =0.001  | =0.21   |
| 2-3 | <0.0001 | =0.001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | =0.004  | <0.0001 | <0.0001 |
| 2-4 | =0.001  | AD     | AD      | AD      | <0.0001 | <0.0001 | =0.012  | AD      |
| 3-4 | <0.0001 | AD     | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | AD      | <0.0001 | <0.0001 |

AD, anlamlı değil. n = sıçan sayısı. SD=standart sapma.



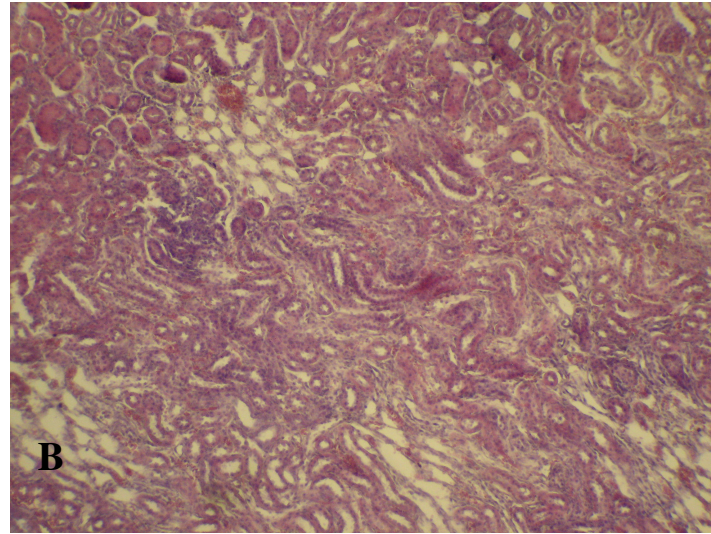
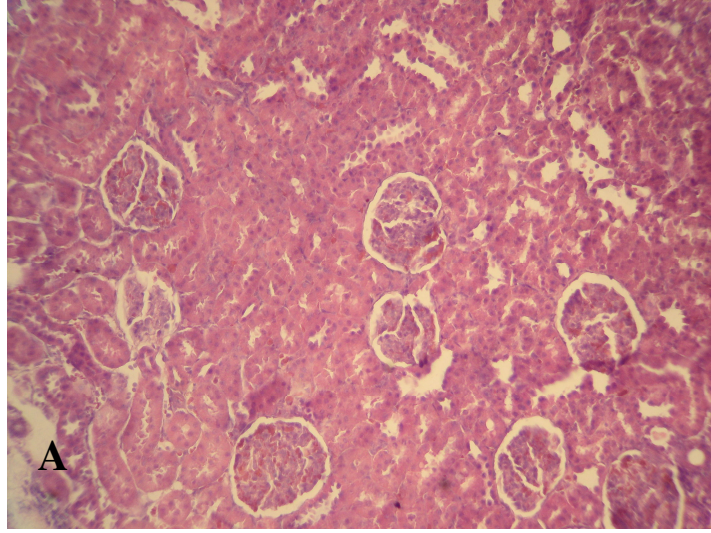


**Resim 1:** Kontrol Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları: Böbreğin korteks ve medulla bölgesi (**resim 1-A**), proksimal ve distal tübül yapıları (**resim 1-B**) normal histolojik görünümde izlendi (A: x40, B:x200) (H-E).

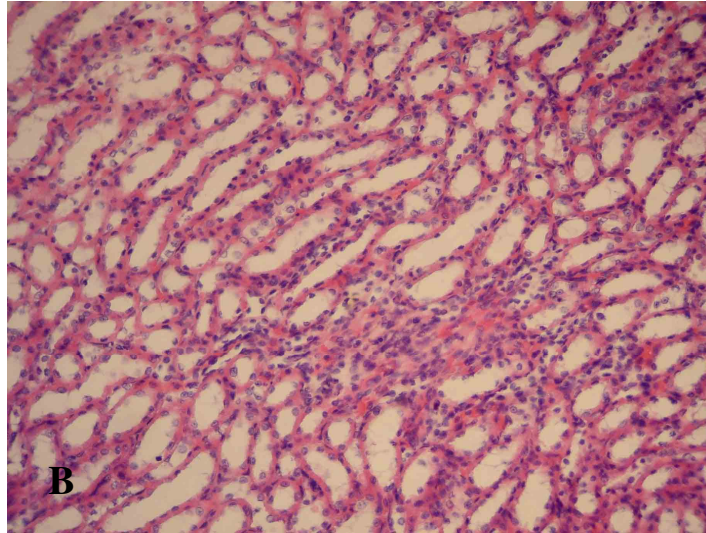
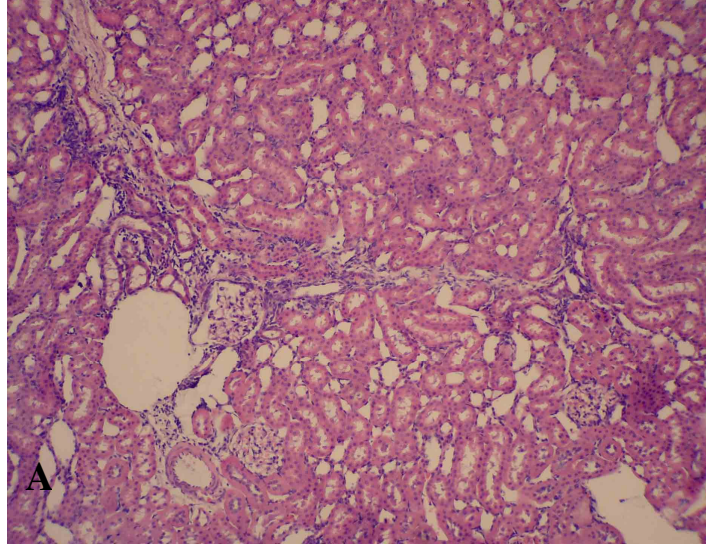


**Resim 2:** CAPE Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları: Korteks bölgesinde tübüller arasında nadir mononükleer hücre infiltrasyonları, proksimal ve distal tübüllerde hafif derecede genişleme (**resim 2-A**), medulla bölgesinde, toplayıcı tübüllerde düşük düzeyde genişleme (**resim 2-B**) gözlenmektedir.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





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



**Resim 4:** AmfB + CAPE Grubu Böbrek Histopatolojik Bulguları: Proksimal ve distal tübüllerde genişleme (**resim 4-A**) ve medullada hemorajik alanlar, mononükleer hücre infiltrasyonları, toplayıcı tübüllerde 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

“Sıçanlarda deneysel amfoterisin B nefrotoksitesinde oksidatif stresin rolünün ve olası oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil esterinin etkisinin araştırılması” adlı çalışmamızda i.p. olarak 50 mg/kg dozunda uygulanan AmfB’nin sıçanlarda serum BUN ve kreatinin düzeylerini yükselttiğini tespit ettik. Böbrek dokusundaki SOD enzim aktivitesi AmfB nefrotoksitesinde oluşturulan sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptandı. AmfB+CAPE grubunda ise bu enzim aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte, AmfB grubundakinden anlamlı derecede daha düşük tespit edildi. CAT ise, AmfB grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı. AmfB+CAPE grubundaki CAT aktivitesi sadece AmfB verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek olmakla birlikte, kontrol grubu enzim aktivitesiyle benzerdi. MDA ve NO düzeyleri, AmfB grubunda, hem kontrol hem de AmfB+CAPE grubundakilere göre anlamlı derecede yüksek saptandı. AmfB+CAPE grubu ile kontrol grubunun MDA ve NO düzeyleri ise benzerdi. AmfB’nin ayrıca böbrekte proksimal ve distal tübüler dilatasyon, tübüler 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 tübüler dilatasyonda, medullada hemorajik alanlarda, kortekste nekrotik alanlarda, kortekste mononükleer hücre infiltrasyonu ve toplayıcı tübüllerde dilatasyon/dejenerasyonda düzelme olduğunu tespit ettik. Sonuç olarak CAPE uygulamasının deneysel AmfB toksitesinde böbrekteki histopatolojik değişikliklerde kısmen düzelmeye neden olduğu ve antioksidan özelliğe sahip olduğu görüldü.

Bu çalışma antioksidan özelliği olduğu daha önce gösterilen CAPE’nin deneysel AmfB nefrotoksitesinde etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bununla birlikte CAPE uygulamasının belirgin antioksidan özelliği olduğunu göstermemize rağmen bu etkinin doz bağımlı olup olmadığı bilinmemektedir. Ayrıca bu çalışma sırasında ölen sıçanlara otopsi yapılmaması bu çalışmanın eksik bir yönüdür. Yine çalışmada serum BUN ve kreatinin değerlerinde yükseklik ile gösterilen

nefrotoksisitenin değerlendirilmesinde GFR ölçümü kullanılmaması çalışmanın diğer eksik bir yönüdür. Tüm bunlara rağmen bu çalışma CAPE'nin AmfB nefrotoksisitesinde önleyici etkisinin araştırıldığı ve AmfB nefrotoksisitesinde oksidatif stresin rolününün gösterildiği ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir.

AmfB hayatı tehdit edici bazı fungal infeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (18,73). Ancak AmfB'nin yaygın bir yan etkisi nefrotoksisitedir (74). Ciddi mikotik infeksiyonlar için AmfB tedavisi almış hastaların % 80'den fazlasında azotemi meydana gelmektedir (18,74). Bu nefrotoksisitenin AmfB'nin yüksek kümülatif dozları, birlikte diüretik kullanımı, yüksek serum kreatinin değerleri ve beraber kullanılan nefrotoksik ilaçlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (1,6). AmfB nefrotoksisitesinin klinik belirtileri böbrek yetmezliği, üriner potasyum kaybı ve hipokalemi, üriner magnezyum kaybı ve hipomagnezemi, tip 1 renal tübüler asidoza bağlı metabolik asidoz ve nefrojenik diyabetes insipitusa bağlı poliüridir (5). Böbreklerin AmfB'den etkilenmesinin mekanizması kesin olarak açıklanamamıştır (6). Bununla birlikte hem tübüler hasar hem de renal vazokonstriksiyonun nefrotoksisitede önemli rolü olduğu öne sürülmüştür (5,7,8). AmfB'nin bilinen mekanizması renal vasküler hücreler ve renal epitelyal hücrelerde porlar oluşturarak membran permeabilitesini arttırmasıdır. Vasküler ve tübüler etkilerinin hücre membranında oluşturduğu değişikliklere sekonder olduğu düşünülmektedir (4-6). AmfB hücre zarı yapısını değiştirerek membran geçirgenliğinde artışa neden olur, hücre içerikleri ve iyon kaybına bağlı olarak sonuçta hücre nekroza gider (7,22). AmfB'nin intravenöz veya renal arter içine infüzyonu, renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızında kısa dönemde bir azalmaya ve glomerüler afferent arteriolar ve renal vasküler dirençte artışa neden olmaktadır (5). AmfB'nin oksidatif hasara neden olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Sokol-Anderson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada AmfB'nin *Candida albicans* hücreleri ve protoplastların üzerindeki letal ve litik etkilerini oksidatif hasar aracılığı ile yaptığını göstermişlerdir (13). Bununla birlikte *in vivo* çalışmada kullanılan AmfB'nin akciğer dokusu ve plazmada oksidatif stres belirteci olan oksitlenmiş glutasyon disülfid seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (9). Dotis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada AmfB'nin hem konvansiyonel, hem de lipid formülasyonlarının kullanımı ile insan monositlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve buna bağlı hücre içi ara maddelerin belirgin şekilde üretiminin artmış

olduğu belirtilmiştir (75). Antioksidan özelliği bilinen N-asetilsisteinin AmfB'nin neden olduğu nefrotoksisitede koruyucu olduğu gösterilmiştir (65). Bu sonuç antioksidan ajanların AmfB nefrotoksisitesinde koruyucu ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Serbest radikaller aracılığıyla, dokular, membranlar ve biyomoleküllerde oluşan oksidasyonun bir çok patolojik olayda önemli rol oynadığı bilinmektedir (76). Hücredeki mitokondri, ksantin-ksantin oksidaz, NADPH oksidaz sistemi aracılığıyla serbest oksijen radikalleri üretilmektedir (77). Aşırı miktarda üretilen SOR'nin lipidler, nükleik asitler, çeşitli proteinler ve polisakkaritler gibi biyomoleküllerle etkileşmesi, hücre ve doku hasarlarına yol açmaktadır (78). Serbest oksijen radikalleri ortamda olduğu zaman lipit peroksidasyonuna neden olarak hücre zarının akışkanlığında ve geçirgenliğinde değişikliklere neden olmaktadır (79). Lipid peroksidasyonu sırasında biyolojik yapılardan kolayca tespit edilebilen ve peroksidatif hasarın belirteci olan MDA, lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (32,80). Bizim çalışmamızda AmfB verilmesiyle doku düzeyindeki MDA miktarının anlamlı şekilde arttığını gösterdik. Bu bulgu AmfB nefrotoksisitesinin oluşmasında oksidatif hasarın önemli bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir. Bir antioksidan olan N-asetilsisteinin de Feldman ve arkadaşlarının (65) yaptığı çalışmada AmfB'nin neden olduğu nefrotoksisitesinin azaltılmasında koruyucu etkinliği gösterilmiştir. Biz de bu çalışmada, antioksidan özelliği bilinen CAPE'nin verilmesi ile AmfB'nin neden olduğu nefrotoksisitede oksidatif hasarın şiddetinin azaldığını gösterdik. Bu sonuç antioksidanların AmfB nefrotoksisitesinde koruyucu bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte antioksidanların etkinliğinin değerlendirileceği klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bir antioksidan enzim olan SOD'un aktivitesi değerlendirildiğinde ise AmfB nefrotoksisitesi oluşturulan sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptandı. AmfB ile birlikte CAPE verilen grupta ise bu enzim aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte, AmfB grubundakinden anlamlı derecede daha düşük tespit edildi. Bu durum ise şu şekilde izah edilebilir: AmfB nefrotoksisitesi neticesinde ortamda artan oksidatif stres sonucu artan  $O_2^-$  radikalini temizlemek için

SOD aktivitesi artmış olabilir. CAPE'nin ise koruyucu etkinliği SOR'lerini toplaması sonucunda oksidatif stresi azaltarak, bununla ilişkili antioksidan enzim aktivitesinin daha düşük olmasına yardımcı olabilir. Benzer şekilde Serarslan ve arkadaşlarının (81) sıçanlarda yara iyileşmesi modelinde oksidatif stresin artışına bağlı olarak SOD aktivitesinin arttığını, CAPE verilmesi ile SOD aktivitesinin düşük olduğunu göstermişlerdir.

CAT H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi suya çeviren bir antioksidan enzimdir (30). Çalışmamızda AmfB verilen gruptaki CAT aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük saptandı. AmfB ile birlikte CAPE verilen gruptaki CAT aktivitesi sadece AmfB verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek olmakla birlikte, kontrol grubu enzim aktivitesiyle benzerdi. Oksidatif hasarda CAT enzim aktivitesinin düşük olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (58,82 ). Bu alışmamızda AmfB grubunda tespit edilen CAT enzim aktivitesinin düşük olmasının nedeni, daha önce Öktem ve arkadaşlarının (83) sıçan böbreğindeki lityum toksisitesini araştırmaya yönelik yapılan deneysel çalışmada ifade ettikleri gibi artmış oksidatif stresle ilişkilidir. Yani ortamda artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeyi sonucunda oluşan yüksek oksidatif stres nedeniyle, böbrekte CAT enzim aktivitesinin baskılanması ve/veya tüketilmesi sonucunda bu enzimin aktivitesi düşük saptanmış olabilir. Aynı şekilde Zhu ve arkadaşlarının (84) yaptığı çalışmada antioksidan enzim aktivitesindeki azalmanın, aşırı miktarda serbest oksijen radikallerinin ortamda oluşması sonucu olabileceğini belirtmişlerdir. AmfB+CAPE grubundaki CAT aktivitesinin sadece AmfB verilen gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanması Yılmaz ve arkadaşlarının (64) yaptığı çalışmanın sonuçları ile uyumludur. Bunun iki nedeni olabilir: Birincisi CAPE'nin serbest radikalleri ortamdaki temizlemesinin sonucu olabilir. İkinci olarak ise CAPE'nin CAT enzim aktivitesini transkripsiyonel veya translasyonel olarak artırmasına bağlı olabilir.

NO biyolojik sistemlerde L-argininin 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). O<sub>2</sub>'nin,



peroksinitrit anyonlarını ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşturmak için NO ile reaksiyona girdiği rapor edilmiştir. Peroksinitrit anyonları ise nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2$ ) ve  $\text{OH}^-$ 'yi oluşturmak için parçalanır (86). Peroksinitrit hücrel yapıları oksitler ve lipid peroksidasyonuna neden olur (85). Parlakpınar ve arkadaşlarının (87) yaptığı gentamisininden neden olduğu akut böbrek yetmezliği modelinde ve Özen ve arkadaşlarının (58) yaptığı sisplatininden neden olduğu akut böbrek yetmezliği modelinde NO seviyelerinin arttığı ve CAPE verilmesi ile NO seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bizim yaptığımız AmfB'nin neden olduğu deneysel akut böbrek yetmezliği modelinde NO seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını saptadık. AmfB ve CAPE'nin birlikte verildiği grupta ise NO seviyesinin kontrol grubuna benzer olduğunu tespit ettik. CAPE'nin bu olumlu etkisi AmfB ile ortamda oluşan serbest oksijen radikallerinin üretimini azaltması ve/veya oluşan serbest radikalleri direkt olarak temizlemesine bağlı olabilir.

Günümüzde ilaçların klinikte yaygın şekilde kullanılması nedeniyle ilaçlara bağlı nefrotoksisite sıklığı giderek artmaktadır. Bu nedenle koruyucu ajanların etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalar yaygın olarak yapılmaktadır. Bu çalışmada 10  $\mu\text{mol/kg}$  dozunda uygulanan CAPE'nin deneysel AmfB nefrotoksisitesinde koruyucu etkinliğini gösterdik. Bu bulgumuzun çeşitli doz titrasyonlarının da kullanıldığı deneysel ve/veya klinik çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmamızda deneysel AmfB nefrotksisitesinde oksidatif hasarın önemli bir mekanizma olduğunu gösterdik. Bu bulgu antioksidan ajanların AmfB nefrotksitesinde koruyucu bir ajan olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada antioksidan etkinliği bilinen CAPE'nin uygulanmasıyla, AmfB'nin neden olduğu oksidatif hasar sonucunda oluşan nefrotksisitenin değelendirilmesindeki biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerde düzelme sağladığını ama mortalite üzerine etkisinin olmadığını tespit ettik. Bununla birlikte gözlenen bu olumlu etkinin klinik ve geniş katılımlı çalışmalarda değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

## 7. ÖZET

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

Bu çalışmada sıçanlarda deneysel amfoterisin B (AmfB) nefrotoksitesinde oksidatif stresin rolü ve olası oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) etkisi araştırıldı.

Çalışmamıza 40 erkek Wistar-albino sıçan alınarak, her grupta 10 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 1 ml/kg/gün serum fizyolojik, CAPE ve AmfB+CAPE gruplarına 10 µmol/kg/gün intraperitoneal (i.p.) CAPE 6 gün boyunca verildi. AmfB ve AmfB+CAPE grubuna deneyin 2. gününde tek doz 50 mg/kg i.p. AmfB uygulandı. Altıncı gün tüm sıçanların yaşamına son verilerek kan örnekleri ve böbrekleri alındı. Sol böbrek dokusunda histopatolojik değerlendirme yapıldı. Sağ böbrekte ise malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri; süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ölçüldü. Serumda BUN ve kreatinin değerleri ölçüldü.

AmfB ve AmfB+CAPE gruplarında histopatolojik değerlendirmede nefrotoksositeye ait bulgular gözlemlendi. AmfB ve AmfB+CAPE gruplarında kontrol grubuna göre serum BUN ve kreatinin değerlerinde anlamlı artış saptandı (sırasıyla  $p=0.0001$ ,  $p=0.0001$ ). AmfB grubunda, kontrol grubuna göre böbrek dokusunda antioksidan enzimlerden SOD'un aktivitesinin yüksek ( $p=0.0001$ ), CAT'ın aktivitesinin düşük ( $p=0.0001$ ) olduğu tespit edildi. NO ve MDA seviyeleri ise yüksek olarak saptandı (sırasıyla  $p=0.003$ ,  $p=0.0001$ ). AmfB'ye CAPE'nin eklendiği grupta ise AmfB'nin renal dokuda oluşturduğu oksidatif stresin azaldığı tespit edildi.

Bu bulgular AmfB nefrotoksitesinde oksidatif stresin önemli bir mekanizma olabileceğini ve klinikte CAPE kullanımının, AmfB nefrotoksitesini sonucunda oluşan oksidatif stresin önlenmesinde etkin bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Amfoterisin B (AmfB) nefrotoksitesini, kafeik asit fenetil ester (CAPE), oksidatif stres.

## 8. SUMMARY

### INVESTIGATION OF THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN EXPERIMENTAL AMPHOTERICIN B INDUCED NEPHROTOXICITY AND EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON POSSIBLE OXIDATIVE STRESS IN RATS

In this study, the role of oxidative stress in experimental amphotericin B (AmfB) induced nephrotoxicity and the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on possible oxidative stress in rats were investigated.

Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups. Each group consisted of 10 rats. Control group received 1 ml/kg serum physiologic intraperitoneally (i.p.) once a day, CAPE and AmfB+CAPE groups received 10  $\mu\text{mol/kg/day}$  CAPE i.p. for 6 days. AmfB and AmfB+CAPE groups received single dose of 50 mg/kg i.p. AmfB on the 2nd day of the study. On the sixth 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, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities were determined in right kidneys of rats. Levels of BUN and creatinin were studied in serum.

Histopathologic evaluation showed nephrotoxicity findings in AmfB and AmfB+CAPE groups. Serum BUN and creatinin levels of AmfB and AmfB+CAPE groups were significantly higher than control group (respectively;  $p=0.0001$ ,  $p=0.0001$ ). In AmfB group, SOD activity was higher ( $p=0.0001$ ), CAT enzyme activity was lower ( $p=0.0001$ ) than the control group. NO and MDA levels were higher (respectively  $p=0.003$ ,  $p=0.0001$ ) than the control group. Whereas in AmfB 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 AmfB nephrotoxicity and clinically using of CAPE may be an effective treatment option in prevention of oxidative stress due to AmfB nephrotoxicity.

**Key words:** Amphotericin B (AmfB) nephrotoxicity, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), oxidative stress.

## 9. KAYNAKLAR

1. TIPHINE M, LETSCHER-BRU V, HERBRECHT R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis* 1999; 1(4):273-83.
2. KLEINBERG M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27 Suppl 1:12-6.
3. SLAIN D, MILLER K, KHAKOO R, FISHER M, WIERMAN T, JOZEFczyk K. Infrequent occurrence of amphotericin B lipid complex-associated nephrotoxicity in various clinical settings at a university hospital: a retrospective study. *Clin Ther* 2002; 24(10):1636-42.
4. DERAY G. Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49 Suppl 1:37-41.
5. BAGNIS CI, DERAY G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2002; 13(4):481-91.
6. DOUBEK M, MAYER J, LAUSCHOVA I, SCHEER P, KREJCIROVA L, HORKY D, DOUBEK J. Comparison of the effect of amphotericin B desoxycholate and amphotericin B colloidal dispersion on renal functions and renal morphology in rats. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10(1):57-62.
7. SABRA R, BRANCH RA. Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Saf* 1990; 5(2):94-108.
8. FANOS V, CATALDI L. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *J Chemother* 2000; 12(6):463-70.
9. MCDONNELL TJ, CHANG SW, WESTCOTT JY, VOELKEL NF. Role of oxidants, eicosanoids, and neutrophils in amphotericin B lung injury in rats. *J Appl Physiol* 1988; 65(5):2195-206.
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, NAQVI SA, DANDIYA PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35(1):77-82.
12. SUD'INA GF, MÍRZOEVA 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. SOKOL-ANDERSON ML, BRAJTBURG J, MEDOFF G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1986; 154(1):76-83.
14. OSAKA K, TYURINA YY, DUBEY RK, TYURIN VA, RITOV VB, QUINN PJ, BRANCH RA, KAGAN VE. Amphotericin B as an intracellular antioxidant: protection

against 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)-induced peroxidation of membrane phospholipids in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 1997; 15;54(8):937-45.

15. WILSON E, THORSON L, SPEERT DP. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(5):796-800.

16. KAYAALP O. Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ilaçlar. Kayaalp O, Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji (10. Baskı). Hactepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara 2002; 301-309.

17. SHEPPARD D, LAMPIRIS 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. Molinoff PB, Ruddon RW. (eds). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basic of therapeutics (9th). Mc Graw –Hill New York 1996; 1175-1190.

19. WARNOCK DW. Antifungal agents. O Grady F, Lambert HP, Finch RG, Greenwood D. (eds). Antibiotic and Chemotherapy (7th) Churchill Livingstone New York 1997; 48-498.

20. LYMAN CA, WALSH TJ. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs* 1992; 44(1):9-35.

21. HASCELİK G. İnfeksiyon etkenlerinin temel özellikleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Nobel Tıp Kitabevleri, Nobel Matbaacılık İstanbul 2002; 3-30.

22. GOLDMAN RD, KOREN G. Amphotericin B nephrotoxicity in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26(7):421-6.

23. SAWAYA BP, BRIGGS JP, SCHNERMANN J. Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6(2):154-64.

24. MAHER P, SCHUBERT D. Signaling by reactive oxygen 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. GILBERT DL, COLTON CA. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. Kluwer Academic Publishers, 2002.

27. BOYUNAGA H, ÇELİK C. Serbest radikaller ve hücresel denge. *Bilim Teknik Dergisi* 1996; 347:98-100.

28. SIES 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; 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 esterinin etkinliğinin araştırılması*. Doktora tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi 2007.
32. DE ZWART LL, MEERMAN JHN, COMMANDEUR JNM, VERMEULEN NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and inhumans. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:202-226.
33. REZNICK A.Z, PACKER L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-363.
34. WISEMAN H, HALLIWELL 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, OLINSKI R, EVANS MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006;365: 30-49.
36. JERRY P, LIU L, ZENG M, STAMLER J.S. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 2000; 39:1040-1047.
37. DRISKO 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. CRİCHTON 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, LIMSON J, WEINTRAUB ST, QI WB. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin transformation. *Free Rad Biol Med* 2000; 29: 1177-85.
42. MEİSTER 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; 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. HALLIWELL B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.

47. YILMAZ HR, UZ E, YUCEL N, ALTUNTAS I AND OZCELİK 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. HAVSTEEN BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *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, KERWIN 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, BUZZI FC, NIERO R, CAMPOS MM, CALIXTO JB. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic Res* 2004; 38: 1241-1253.
54. FESEN MR, POMMIER Y, LETEURTRE E, HIROGUCHI 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. LIN MW, YANG SR, HUANG MH, WU SN. Stimulatory actions of caffeic acid phenethyl ester, a known inhibitor of NF-kappaB activation, on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in pituitary GH3 cells. *J Biol Chem* 2004; 279:26885-26892.
56. NATARAJAN K, SINGH 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 apoptosis 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, ODACI E, YILDIRIM Z. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, against 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, PARLAKPINAR H, VARDI N, CİGREMİS 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. SAHİN 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: comparison of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and methylprednisolone. *Neurosci Res Commun* 2002; 31:111-21.
62. GUREL A, ARMUTCU F, SAHİN S, SOGUT S, OZYURT H, GULEC M, KUTLU NO, AKYOL O. Protective role of  $\alpha$ -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. BORRELLI F, MAFFIA P, PINTO L, IANARO A, RUSSO A, CAPASSO F, IALENTI A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002;73: 53-63.
64. YILMAZ HR, SOGUT S, OZYURT B, OZUGURLU F, SAHİN S, ISIK B, UZ E, OZYURT H. 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, EFRATI S, DISHY V, KATCHKO L, BERMAN S, AVERBUKH M, ALADJEM M, AVERBUKH Z, WEISSGARTEN J. 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, YING L. A simple method for clinical assay superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34:497-500.
69. AEBI H. Catalase in Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer U, Ed. New York and London: *Academic Press* 1974; 673-677.
70. SAAD SY, AL-RIKABI AC. Protection effects of taurine supplementation against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Chemotherapy* 2002; 48: 42-48.
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, ARBID MS. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. *J Appl Toxicol.* 1999; 19(1):7-12.
73. GALLIS HA. Amphotericin B: a commentary on its role as an antifungal agent and as a comparative agent in clinical trials. *Clin Infect Dis* 1996; 22 Suppl 2:145-147.
74. BATES DW, SU L, YU DT, CHERTOW GM, SEGER DL, GOMES DR, PLATT R: Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. *Kidney Int* 2001; 60(4):1452-9.
75. DOTIS J, SIMITSOPOULOU M, DALAKIOURIDOU M, KONSTANTINOU T, TAPARKOU A, KANAKOUDI-TSAKALIDOU F, WALSH TJ, ROILIDES E. Effects of lipid formulations of amphotericin B on activity of human monocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(3):868-73.

76. HALLIWELL B. Reactive oxygen species in living system: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 30;91(3C):14-22.
77. KAWAI Y, NAKAO T, KUNIMURA 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.
78. DARGEL R. Lipid peroxidation a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxic Pathol* 1992; 44(4):169-81.
79. SCHMIDLEY JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21:1086-90.
80. OKTEM F, YILMAZ HR, OZGUNER F, OLGAR S, AYATA A, UZARE E, UZ E. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health* 2006; 22(6):241-7.
81. SERARSLAN G, ALTUG E, KONTAS T, ATIK E, AVCI 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.
82. SURU SM. Onion and garlic extracts lessen cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *Biomaterials* 2008; 3.
83. OKTEM F, OZGUNER F, SULAK O, OLGAR S, AKTURK O, YILMAZ HR, ALTUNTAS I. Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem* 2005; 277(1-2):109-15.
84. ZHU YJ, ZENG T, ZHU YB, YU SF, WANG QS, ZHANG LP, GUO X, XIE KQ. Effects of Acrylamide on the Nervous Tissue Antioxidant System and Sciatic Nerve Electrophysiology in the Rat. *Neurochem Res* 2008;10.
85. SOGUT S, ZOROGLU SS, OZYURT H, YILMAZ HR, OZUGURLU F, SIVASLI E, YETKIN O, YANIK M, TUTKUN H, SAVAS HA, TARAKCIOGLU M, AKYOL O. 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.
86. KIRKEBOEN KA, STRAND OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43(3):275-88.
87. PARLAKPINAR H, TASDEMIR S, POLAT A, BAY-KARABULUT A, VARDI N, UCAR M, ACET A. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (cape) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology* 2005; 14;207(2):169-77.