



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**L-THEANİNİN
DOKSORUBİSİN UYGULANAN
SIÇANLARDA NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yahya ALTINKAYNAK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Birgül KURAL

TRABZON - 2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**L-THEANİNİN
DOKSORUBİSİN UYGULANAN
SIÇANLARDA NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yahya ALTINKAYNAK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Birgül KURAL

TRABZON - 2018

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Yahya ALTINKAYNAK tarafından hazırlanan; **“L-Theaninin Doksorubisin Uygulanan Sıçanlarda Nefrotoksisite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi”** başlıklı tez, KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Birgül KURAL



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Asım ÖREM

Prof. Dr. Birgül KURAL

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Doç. Dr. Hüseyin AVNİ UYDU

Yrd. Doç. Dr. Meltem MALKOÇ



Tarih: 28/03/2018

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağılı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 28/03/2018

Yahya ALTINKAYNAK

TEŞEKKÜR

“L-Theaninin Doksorubisin Uygulanan Sıçanlarda Nefrotoksisite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı proje kapsamında yürütülen ve tamamlanan bu çalışmada, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, lisansüstü eğitim hayatım boyunca yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Birgül KURAL’a,

Doktora eğitimimde büyük ve sayısız emekleri olan başta yüksek lisans danışmanım Prof. Dr. Asım ÖREM olmak üzere, emekli olan Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Anabilim Dalımız öğretim üyeleri sayın, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Ahmet ALVER ve Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN’a

Proje boyunca birlikte çalıştığımız, her zaman yanımda olan, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen yol arkadaşım, eşim, Yrd. Doç. Dr. Buket AKCAN ALTINKAYNAK'a,

Çalışmayı destekleyen TÜBİTAK’a, projedeki araştırmacı hocalarım Prof. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Sevdegül MUNĞAN ve Veteriner Hekim Sait AL’a

Yrd. Doç. Meltem MOLKOÇ 'a, Lisansüstü eğitimimde her zaman yanımda olan dostum Dr. Akın BODUR’a

Başta Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN, Dr.Hanife KARA ve Ertuğrul YİĞİT olmak üzere Anabilim Dalımızdaki tüm lisanüstü eğitim gören arkadaşlarıma ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü ailesine,

Her zaman bana destek olan, her türlü fedakarlığı ve sabrı gösteren aileme ve biricik kızım Umay Ege’ye en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yahya ALTINKAYNAK

Bu tez çalışması, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. (Proje no: 216Z025)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Böbrek ve Nefrotoksisite	5
4.1.1. Böbrek Anatomisi	5
4.1.2. Böbrek Fonksiyonları	6
4.1.3. Nefrotoksisite	7
4.1.3.1. Nefrotoksisite ve Etkileri	7
4.1.3.2. Nefrotoksisiteye Neden Olabilen İlaçlar	9
4.2. Glutasyon, Kaspaz-3 ve NF-kB	11
4.2.1. Glutasyon ve İlgili Enzimleri	11
4.2.1.1. İndirgenmiş/Yükseltgenmiş Glutasyon	11
4.2.1.2. Glutasyon Redüktaz	13
4.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz	13
4.2.1.4. Glutasyon S-Transferazlar	13
4.2.1.5. Gama Glutamil Transferaz	14
4.2.2. Nükleer Faktör Kappa B	15
4.2.3. Kaspaz-3	16
4.3. Theanin	17
4.3.1. Theaninin Yapısal Özellikleri	17
4.3.2. Theanin Biyosentezi, Farmakokinetiği ve Metabolizması	18
4.3.3. Theanin Kullanımı ve Biyoaktif Etkileri	20
4.3.3.1. Beyin Üzerine Etkisi	22

4.3.3.2. Antioksidan, Antiinflamatuvar, Antifibrotik ve Antinekrotik Etkileri	23
4.3.3.3. İmmünsistem Üzerine Etkileri	23
4.3.3.4. Tümör Hücreleri Üzerine Etkileri	24
4.3.3.5. Obezite ve Kardiyovasküler Hastalıklar Üzerine Etki	24
5. GEREÇ ve YÖNTEM	26
5.1. Gereç	26
5.2. Yöntem	27
5.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	27
5.2.2. Doksorubisin ve L-Theanin Uygulanması	28
5.2.3. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	29
5.2.4. BUN ve Kreatinin Parametrelerinin Belirlenmesi	30
5.2.5. Doku Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	30
5.2.6. Histopatolojik İşlemler	33
5.2.6.1. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması ve Kesitlerin Alınması	33
5.2.6.2. Histopatolojik İncelemeler	34
5.2.6.3. İmmünohistokimyasal İşlemler	35
5.2.7. Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi	36
5.2.7.1. Plazma Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi	37
5.2.7.2. Doku Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi	37
5.2.8. NF-κB p65 Seviyelerinin Belirlenmesi	38
5.2.8.1. Plazma NF-κB p65 Seviyelerinin Belirlenmesi	38
5.2.8.2. Doku NF-κB p65 Seviyelerinin Belirlenmesi	39
5.2.9. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi	40
5.2.9.1. Plazma MDA Seviyeleri	40
5.2.9.2. Doku MDA Seviyeleri	42
5.2.10. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutatyon Seviyelerinin Belirlenmesi	43
5.2.10.1. Plazma GSH ve GSSG Seviyelerinin Belirlenmesi	43
5.2.10.2. Doku GSH ve GSSG Seviyelerinin Belirlenmesi	45
5.2.11. Glutatyon Peroksidaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	46
5.2.11.1. Plazma GPx Aktivite Tayini	47
5.2.11.2. Doku GPx Aktivitesi Tayini	47
5.2.12. Glutatyon Redüktaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	48

5.2.12.1. Plazma GR Aktivitesi Tayini	48
5.2.12.2. Doku GR Aktivitesi Tayini	49
5.2.13. Glutasyon S-Transferaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	49
5.2.13.1. Plazma GST Aktivite Tayini	50
5.2.13.2. Doku GST Aktivite Tayini	50
5.2.14. Gama Glutamil Transpeptitaz 1 Seviyelerinin Belirlenmesi	51
5.2.14.1. Plazma GGT1 Seviyelerinin Belirlenmesi	51
5.2.14.2. Doku GGT1 Seviyelerinin Belirlenmesi	52
5.2.15. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	52
6. BULGULAR	53
6.1. Serum BUN ve Kreatinin Düzeyleri	53
6.2. Histopatolojik Bulgular	53
6.3. Apoptoz Bulguları	60
6.3.1. Apoptozun Histolojik Değerlendirilmesi	60
6.3.2. Apoptoz Seviyeleri	62
6.4. İnflamasyon Seviyeleri	64
6.5. Oksidan-Antioksidan Sistem Parametrelerinin Seviyeleri	64
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	70
8. ÖNERİLER	83
9. KAYNAKLAR	84
10. ETİK KURUL ONAY BELGESİ	98
11. ÖZGEÇMİŞ	99

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. L-Theaninin biyoaktif etkileri	21
Tablo 2. Kullanılan cihazlar, aletler, kimyasallar ve malzemeler	26
Tablo 3. Kullanılan ticari kitler	27
Tablo 4. TUNEL yöntemi uygulama aşamaları	36
Tablo 5. Plazma MDA seviyesi tayini işlem basamakları	41
Tablo 6. Doku MDA seviyesi tayini işlem basamakları	43
Tablo 7. Deney gruplarında BUN, kreatinin ve GGT1 seviyeleri	53
Tablo 8. Gruplardaki nefrotoksisite bulgularının skorlanması.	54
Tablo 9. Grupların böbrek dokularındaki morfolojik değişim skorları	56
Tablo 10. Sıçan numarasına göre Bowman boşluğunda dilatasyon skorları	56
Tablo 11. Sıçan numarasına göre tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon skorları	57
Tablo 12. Sıçan numarasına göre tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon skorları	57
Tablo 13. Sıçan numarasına göre intratübüler hiyalin birikimi skorları.	57
Tablo 14. Sıçan numarasına göre vazokonjesyon skorları.	57
Tablo 15. Böbrek dokusu apoptotik indeks yüzdeleri (% A.İ.).	63
Tablo 16. Deney gruplarında apoptoz parametrelerinin seviyeleri	63
Tablo 17. Deney gruplarında inflamasyon parametresinin seviyeleri	64
Tablo 18. Deney gruplarında plazma oksidan-antioksidan sistem parametrelerinin seviyeleri	65
Tablo 19. Deney gruplarında doku oksidan-antioksidan sistem parametrelerinin seviyeleri	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Böbrek anatomisi	6
Şekil 2. Doksorubisin yapısı	11
Şekil 3. Glutasyonun sentezi	11
Şekil 4. İnsan dokularındaki önemli antioksidan enzimler ve glutasyonla ilişkisi	12
Şekil 5. GR enzim reaksiyonu	13
Şekil 6. GPx enzim reaksiyonu	13
Şekil 7. Glutasyonun GST aracılığıyla ksenobiyotiklerle konjugasyonu	14
Şekil 8. Gama-glutamil döngüsü	15
Şekil 9. L-theaninin kimyasal yapısı	17
Şekil 10. L-Theaninin muhtemel sentez yolu	19
Şekil 11. L-theanin, L-glutamat ve L-glutamin'in kimyasal yapıları	19
Şekil 12. Doku MDA tayini için protein standart grafiği	31
Şekil 13. Doku GGT1, Kaspaz-3, NF-κB düzeyi için protein standart grafiği	32
Şekil 14. Doku GPx aktivitesi için protein standart grafiği	32
Şekil 15. Doku GR ve GST aktiviteleri için protein standart grafiği	33
Şekil 16. Kaspaz-3 seviyesi belirlenmesinde kullanılan standart grafik	37
Şekil 17. NF-κB p65 seviyesi belirlenmesinde kullanılan standart grafik	39
Şekil 18. MDA seviyesi tayininde kullanılan standart grafik	41
Şekil 19. GSSG ve GSH seviyeleri belirlenmesinde kullanılan standart grafik	45
Şekil 20. GPx aktivite tayininde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği	46
Şekil 21. GR aktivite tayininde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği	48
Şekil 22. GST aktivite tayininde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği	49
Şekil 23. GGT1 seviyesi tayininde kullanılan standart grafik	51
Şekil 24. Gruplara göre plazma ve doku GSSG/GSH düzeyleri	68
Şekil 25. L-theaninin doksorubisin uygulanan sıçanlarda nefrotoksisite üzerine etkileri	81

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AI	Apoptotik İndeks
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
BUN	Kan Üre Nitrojeni
DOX	Doksorubisin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorban Yöntem
ETS	Elektron Taşınım Zinciri
GGT	Gama Glutamil Transferaz
GSH	Redükte Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GR	Glutatyon Redüktaz
MDA	Malondialdehit
NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B
TCA	Trikarboksilik Asit Devri
TUNNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) deoksiüridin trifosfat işaretleme yöntemi

Simgeler

α	Alfa
μ	Mikro
κ	Kappa
γ	Gama
U	Ünite
L	Litre
M	Molar
m	Metre

1. ÖZET

L-Theaninin Doksorubisin Uygulanan Sıçanlarda Nefrotoksisite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

L-Theanin, ülkemizde fazla tüketilen *Camellia sinensis* çay türlerinde bulunan serbest amino asitlerin yaklaşık % 50'sini oluşturan, rahatlatıcı, antioksidan, antiinflamatuvar ve hepatoprotektif gibi özelliklere sahip bir amino asittir. Bu çalışmada L-theaninin, sıçanlarda doksorubisin (DOX) ile uyarılan nefrotoksisite üzerine muhtemel koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmaya 300-400 g ağırlığında 32 Sprague dawley erkek sıçan dahil edilerek rastgele dört grup oluşturuldu. İntraperitoneal olarak 1. gruba (Kontrol, n=8) serum fizyolojik, 2. gruba (Theanin, n=8) 5 gün 200 mg/kg/gün L-theanin, 3. gruba (DOX, n=8) tek doz 20 mg/kg DOX, 4. gruba (DOX+Theanin, n=8) tek doz 20 mg/kg DOX ve 5 gün 200 mg/kg/gün L-theanin uygulandı. Böbrek dokularında histopatolojik skorlama ve apoptoz belirteci olarak TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks (% Aİ), ELISA yöntemi ile kaspaz-3 ve inflamasyon belirteci olarak nükleer faktör kappa B (NF-kB) seviyeleri belirlendi. Oksidan-antioksidan sistem parametreleri olarak TBARS yöntemiyle malondialdehit (MDA), Ticari kitlerle indirgenmiş ve yükletgenmiş glutatyon (GSH ve GSSG) ve gamaglutamil transferaz (GGT) seviyeleri ile glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon S-transferaz (GST) doku ve plazma aktiviteleri belirlendi. Böbrek dokularında DOX+Theanin grubu DOX grubu ile karşılaştırıldığında % Aİ, kaspaz-3, NF-kBp65, MDA, GSSG ve GGT düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düşük, GSH, GPx, GR ve GST aktivite düzeyleri ise anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). Bu parametrelerin plazma düzeylerinde de benzer seyir gözlemlendi. Histopatolojik analizlerle de desteklenen bu bulgulara göre theanin, sıçanlarda DOX ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı apoptozu, inflamasyonu, oksidatif stresi baskılayıcı, antioksidan sistemi arttırıcı etkilere sahip olabilir. Sonuç olarak theaninin, nefrotoksisiteye karşı koruyucu yönde etki gösterebileceği ancak bunun ilave çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, apoptoz, inflamasyon, nefrotoksisite, theanin

2. SUMMARY

Investigation of The Effects of L-Theanine on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats

L-theanine is an amino acid comprising 50% of the free amino acids present in *Camellia Sinensis* tea species and it has such protective effects as relaxing, antioxidant, antiinflammatory and hepatoprotective etc. In this study, it is aimed to investigate whether theanine has a protective effect on Doxorubicin (DOX)-induced nephrotoxicity in rats. For this purpose, 32 male Sprague Dawley rats weighing 300-400 g were used and randomly assigned into 4 groups: 1st group (control, n=8) which was intraperitoneally given saline; 2nd group (Theanine, n=8) 200 mg/ kg/ day theanine for 5 days; 3rd group (DOX, n=8) single dose 20 mg/kg DOX; 4th group (DOX+Theanine, n=8) which was given 20 mg/kg DOX at first day and 200 mg/ kg/ day theanine for 5 days. In kidney tissues, histopathological scoring and apoptotic index (% AI) were determined with TUNEL method. Caspase-3 levels as apoptotic marker and Nuclear factor kappa B (NF- κ B) as inflammatory marker were determined with ELISA method. Malodialdehyde (MDA) levels were determined by TBARS method. Reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG) and gamaglutamyl transferase (GGT) levels, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) activities were determined by commercial kits as oxidant-antioxidant system parameters in plasma and tissues. In kidney tissues levels of % AI, Caspase3 NF- κ Bp65, MDA, GSSG and GGT were found low and levels of GSH and GPx, GR, GST activity were found high in the DOX+Theanin group according to DOX group ($P<0.05$). Similar courses was observed in plasma levels of these parameters. According to these findings, which are also supported by histopathological analyzes, L-theanine may have protective effects against DOX-induced nephrotoxicity in rats via the inhibition of apoptosis, inflammation, oxidative stress by enhancing effects on antioxidant system. It was concluded that theanine can protect against nephrotoxicity but this data should be supported with further studies.

Key Words: Antioxidant, apoptosis, inflammation, nephrotoxicity, theanine

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Nefrotoksisite nefrotoksik renal yetmezlik, akut glomerular nefritis, interstisyel nefritis, nefrotik sendrom ve nefron nefrozisi olarak tanımlanmaktadır. Böbrekler, yüksek orandaki kan perfüzyonu, metabolik yolaklardaki etkinlikleri ve ekspresyon fonksiyonları ile ilaçların ve toksinlerin etkilerine maruz kalabilen organlardır. Bu nedenle ilaç tedavisi gören hastaların % 20'den fazlasında ilaç toksisitesi akut böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilmektedir. Kanser kemoterapisinde sıklıkla kullanılan bir antineoplastik ajan olan doksorubisin (DOX), doku ve organlarda toksisiteye (nefrotoksisite, kardiyotoksisite, hepatotoksisite vs.) neden olabilmektedir (1).

L-Theanin (molekül formülü: $C_7H_{14}N_2O_3$; diğer adları: L- γ -glutamiletamid, N⁵-etil-L-glutamil, γ -etilamino- L-glutamikasit, 2- amino-4-(etilkarbamoil) bütirik asit) 1949 yılında, Sakato tarafından yeşil çayda keşfedilen serbest bir amino asittir (2). *Camellia sinensis* çay türlerinde (yeşil-siyah vb çay) bulunan serbest aminoasitlerin % 50 kadarını oluşturan theanin, çaya umami tadı vermektedir. Çayın kalitesiyle theanin miktarı doğru orantılıdır, theanin miktarı yüksek olan çaylar daha pahalı ve değerlidir (3). Theaninin glutaminle benzer metabolik akibete uğradığı belirtilse de theaninin glutaminden farklı etkilerinin olabildiği ortaya konulmuştur (4). Sağlıklı hücrelerde L-theaninin antioksidan özellikleriyle kemoterapötik ajanların zararlarına karşı koruyucu etki gösterdiği, bu etkisini ise hücresele glutatyon (GSH) seviyesini artırarak gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (4-7). Ancak tümör hücrelerinde theaninin hücre içi GSH seviyelerinde azalmalara yol açtığı ve DOX gibi kemoterapi amaçlı kullanılan ajanların akümülyasyonunu sağlayarak etkinliğinin artmasını sağlayabildiği bildirilmektedir. Theaninin bu etkisini hücrelerdeki glutamat taşıyıcılarını % 15 oranında inhibe ederek hücre dışı alanda glutamat seviyesinin fazla olmasına yol açtığı ve DOX gibi antitümör özellikteki ajanların etkinliğinin uzun sürmesini bu sayede sağladığı ileri sürülmüştür (5, 7). Literatürde theaninin anti-neoplastik, anti-fibrotik, anti-nekrotik, anti-inflamatuvar ve anti-oksidan özellik gibi pek çok koruyucu etkilerinin belirtildiği çalışmalar bulunmasına rağmen, nefrotoksisite üzerine etkilerinin incelendiği ilk araştırma 2018 yılı başında, mevcut çalışmamız tamamlanmak üzere yayınlanmıştır (5-8). Sıçanlarda (n=4) DOX ile uyarılmış renal toksisiteye theaninin etkilerinin incelendiği ve çok az parametrenin değerlendirilip çok düşük dozda theanin uygulanan (15mg/kg) bu çalışmaya göre

theaninin lipid peroksidasyonunu azalttığı, GSH seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (8).

Bu çalışmada nefrotoksik ajan olarak DOX uygulanan Sprague Dawley cinsi sıçanlarda, L-theaninin nefrotoksisiteye karşı muhtemel anti-oksidan, anti-nekrotik, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkilerinin, özellikle glutatyon ve metabolizmasıyla ilişkili enzimler çerçevesinde değerlendirilmesi amaçlandı.



4. GENEL BİLGİLER

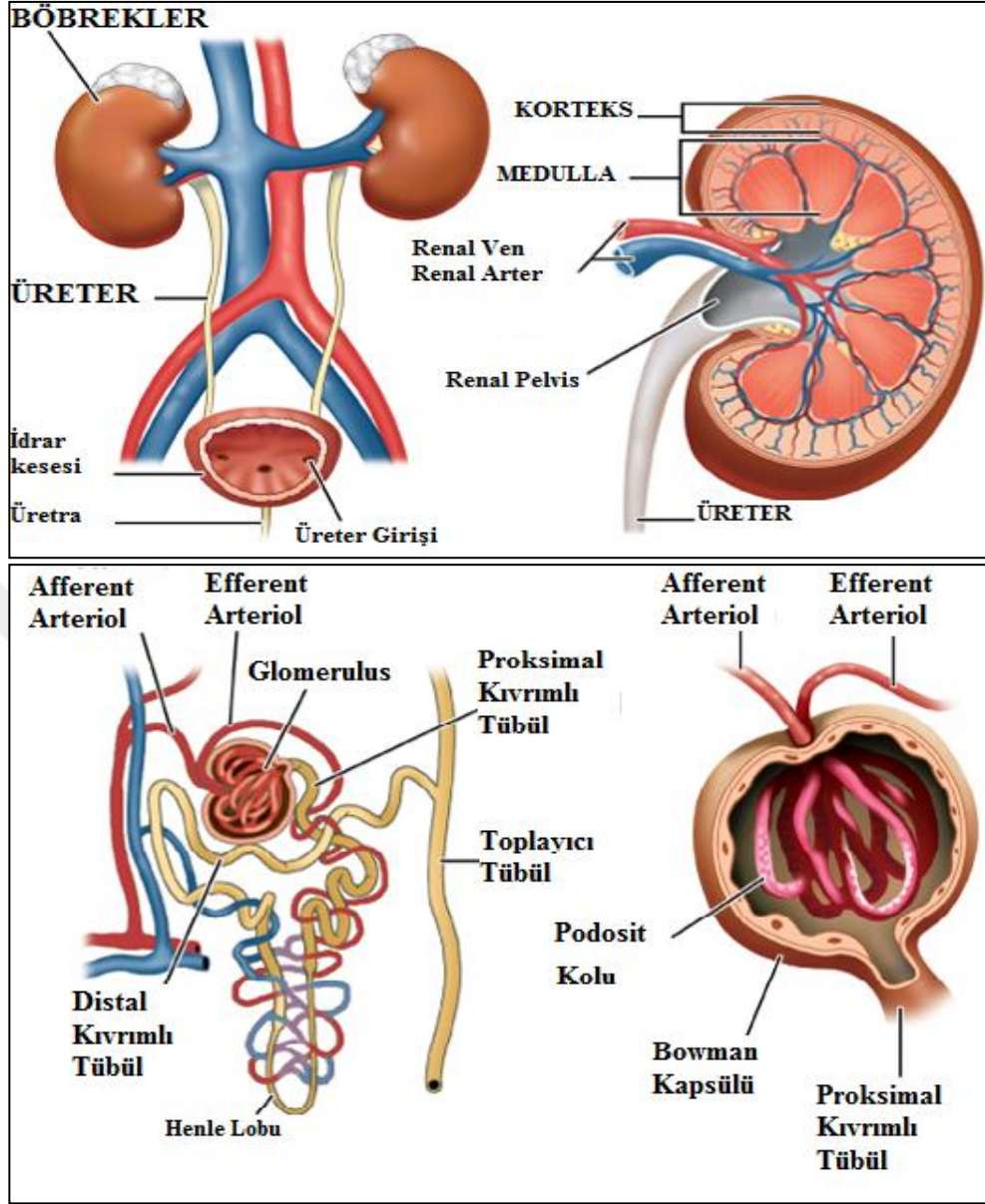
4.1. Böbrek ve Nefrotoksisite

4.1.1. Böbrek Anatomisi

Böbrekler, periton zarı arkasında bulunan organlardan olup paravertebral alanda yer alırlar. Karaciğerin pozisyonu nedeniyle sağ böbrek sol böbreğe oranla daha aşağıda bulunmakta ve yine sağ böbreğin boyu sol böbreğe kıyasla daha kısadır. Böbreklerin uzun eksenleri beslenme alışkanlıklarına göre farklılık gösterebilmesiyle birlikte bu uzunluk 12-14 cm, ortalama ağırlıklarıysa 140-170 g kadardır (9).

Böbreklerin en küçük fonksiyonel birimi nefronlardır ve böbrekler sayı olarak yaklaşık 1.000.000-1.300.000 nefrondan oluşur. Nefronların temel görevleri filtrasyon, sekresyon ve reabsorbsiyondur. Her nefronda filtrasyonun başlangıcında kan akımını sağlayan glomerulus ve filtrasyonun başladığı Bowman kapsülü bulunur. Nefronların sekretuar kısmı kortekste bulunur ve proksimal kıvrımlı tübül, henle kulpu ve distal kıvrımlı tübülden oluşur. Nefronların boşaltım kısmı ise medullada bulunur ve toplayıcı tübüllerden ibarettir (10). Renal stroma gevşek bağ dokusu, kan damarları, kapiller, lenf kanalları ve sinirleri içerir. Böbrek arterleri, anterior ve posterior arterler olarak iki kanala ayrılır. Posterior arterler böbreğin arka ve orta kısmını, anterior arterlerse böbreklerin kalan diğer tüm kısımlarını besleyen arter kanallarıdır. Renal sinirler böbrek damarlarına eşlik ederek renal sinir ağından çıkar. Renal sinir ağına 11. ve 12. spinal sinirlerin dorsal köklerinden duyu, sempatik ve splanknik sinirler, vagus sinirlerinde ise parasempatik lifler gelir (9-11).

Böbrekler, idrarın depolandığı mesaneye üreter tüpleriyle bağlanırlar. Böbreklerde oluşturulan idrar üreterler yoluyla, düz kaslardan oluşan ve idrarın gerektiğinde dışarı atılmasını sağlayan mesaneye aktarılır. Nefronlar tek başına idrar üretebilme özelliğine sahiptir (12, 13). Şekil 1'de böbrek anatomisi gösterilmiştir.



Şekil 1. Böbrek anatomisi (Longnecker'den, 14)

4.1.2. Böbrek Fonksiyonları

Böbrekler, vücut sağlığının devamı için temel olarak sıvı ve elektrolit dengesini sağlayan hayati organlardır. Vücuttaki sodyum, potasyum, klor, bikarbonat, hidrojen, kalsiyum ve fosfat gibi elektrolitlerin plazma düzeylerinin ayarlanması ve tansiyonun dengelenmesinde birinci derecede aktif rol oynarlar. Ayrıca, renin ve prostaglandin gibi hormonları salgılayarak elektrolit düzeylerinin dengelenmesinde ve eritropoetin gibi hormon salgılayarak kırmızı kan hücrelerinin üretiminde görev alırlar (15, 16).

Böbrekler temel fonksiyonlarını filtrasyon, reabsorbsiyon ve sekresyon özellikleriyle gerçekleştirir. Filtrasyon, kandaki atık ürünlerin damardan ayrılarak Bowman kapsülüne geçiş işlemidir. Sekresyon, nefron duvarında epitelyum hücre sitoplazmalarındaki maddelerin tübüler lümene doğru hareketidir. Bu maddeler doğrudan epitelyum hücrelerinin sentezlediği maddeler olabildiği gibi, böbrek epitelyum hücrelerini çevreleyen interstisyum bölgesinden gelebilirler. Reabsorbsiyon, lümene geçmiş olan maddelerin epitelyumu aşarak interstisyuma doğru geri akışıdır. Geri emilen maddeler interstisyumdan kan damarlarına doğru hareket eder. Kısaca reabsorbsiyonda maddeler lümeden interstisyuma, oradan da kana geçerler (9).

Böbrek dokusu başlıca;

- Üre ve kreatinin gibi metabolik atıkların uzaklaştırılması,
- Vücut sıvı-elektrolit dengesinin sağlanması ve devamlılığı,
- Salgıladığı hormonlar aracılığıyla, ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının düzenlenmesi,
- İlaçların, toksinlerin ve bunların metabolik atıklarının detoksifikasyonu ve atılımı,
- D-vitamini, renin ve eritropoetin gibi bazı hormonal özellikteki bileşenlerin sentez ve metabolizmalarına katkı,
- İnsülin ve glukagon gibi bazı peptit yapısındaki hormonların yıkımı,
- β -2 mikroglobulin gibi küçük molekül ağırlıklı proteinlerin yıkımı,
- Glukoneogenez ve lipid metabolizmasında aktif rol üstlenmek gibi hayati rollere sahip bir organdır (17).

4.1.3. Nefrotoksisite

4.1.3.1. Nefrotoksisite ve Etkileri

Nefrotoksisite nefrotoksik renal yetmezlik, akut glomerular nefritis, interstisyel nefritis, nefrotiksendrom ve nefron nefrozisi olarak tanımlanmaktadır. Böbrekler yüksek orandaki kan perfüzyonu, metabolik yollardaki etkinlikleri ve ekspresyon fonksiyonları sebebiyle ilaçların ve toksinlerin etkilerine maruz kalabilen organlardır (18). Ayrıca sekresyon, reabsorbsiyon ve idrar oluşturma mekanizmaları gibi fonksiyonları sebebiyle, böbrek renal tübüler hücreleri vücuttaki diğer doku hücrelerine oranla daha yüksek düzeylerde toksin konsantrasyonlarla karşılaşır ve

dolayısıyla böbrekler toksik ajanlardan daha fazla etkilenebilmektedir (19). İlaç tedavisi gören hastaların % 20'den fazlasındaki ilaç toksisitesinin, akut böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilmekte olduğu bildirilmiştir (1).

Proksimal nefron epitelyum hücreleri, çok sayıda taşıyıcı sistem bulundurmaları sebebiyle birçok toksik ajan için merkezi bir hedef olabilmektedir. Yine bu hücrelerde, muhtemelen oksidatif hasara karşı korunma amaçlı GSH ve GSH ilişkili enzimlerin hücre içi konsantrasyonları en yüksek seviyelerdedirler. Bu seviyelerin yüksek oluşu nedeniyle proksimal tübülün, medüller kısımlara kıyasla oksidatif hasara karşı daha dirençli olduğu belirtilmektedir (20).

Tübül epitellerinin çoğunluğunun oksidatif stres gibi çeşitli hasarlara karşı kendilerini yenileme yeteneklerinin hızlı olduğu fakat glomerül ve medulladaki epitel hücrelerin bu özelliklerinin zayıflığı sebebiyle kendilerini yenileyemediği ve bu bölgelerdeki hasarların böbrek yetmezliğiyle sonuçlanabileceği belirtilmektedir. Nefronların ise toksik etkenlere maruz kalmaları durumunda belirli bir düzeye kadar hasarı giderebilme yeteneklerinin olduğu düşünülmektedir. Böbrek hasarının değerlendirilmesinde glomerüler filtrasyon hızı (GFH), BUN, kreatinin ve elektrolit seviyeleri kullanılır. Bu düzeylerdeki anlamlı değişiklikler böbreklerin fonksiyonlarında bozulmalar olduğunun önemli göstergeleridir. Örneğin idrarla atılan üre ve kreatinin plazma değerlerindeki aşırı artış, kantitatif olarak böbrek epitelyum hücrelerinin % 70 kadarının kaybedildiği anlamına gelebilmektedir (18, 20).

Nefrotoksisite gelişiminde esas nokta böbrek dokusunun toksik ajana yeterli doz ve sürede maruz kalmasıdır. Bazı analjeziklerin, antibiyotiklerin, immünsüpresif ve kemoterapötik ilaçların nefrotoksisiteye yol açabildiği bilinmektedir (21). Besin takviyesi olarak alınan veya destekleyici olarak kullanılan bazı bitkisel veya doğal ürünlerin de nefrotoksisiteye sebep olabildikleri belirtilmektedir. Ayrıca çevresel maruziyetle alınan kadmiyum, bakır, uranyum ve bizmut gibi maddeler de nefrotoksisiteye yol açmaktadırlar. Düşük dozlarda maruziyetler daha çok kronik ve son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilirken, yüksek dozlarda maruziyet daha çok akut böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilmektedir. Akut böbrek yetmezliği, böbrek fonksiyonlarında saatler veya birkaç gün içinde bozulmanın yol açtığı üre ve kreatinin gibi nitrojen artık ürünlerinin birikmesi olarak tanımlanabilir (21, 22).

4.1.3.2. Nefrotoksisiteye Neden Olabilen İlaçlar

Çeşitli toplum ve hastane kaynaklarına göre böbrek rahatsızlıklarının önemli bir kısmı ilaçların sebep olduğu nefrotoksisitedir. Özellikle yaşlılarda gelişen nefrotoksisitenin % 60 kadarının ilaç kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Geçmişe oranla günümüzde çok daha fazla ilaç tüketimi ve diagnostik prosedürlerin uygulanması daha fazla insanda böbrek fonksiyonlarının bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. İlaçlar, akut böbrek yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği ve nefrotik sendromlara yol açabilmektedirler (20).

Akut böbrek yetmezliğiyle sonuçlanan oksidatif stres hasarının temelinde, oluşan serbest radikaller ve antioksidan ajanların yetersizliği yatmaktadır (23). Nefrotoksik ajanlar temel etkilerini, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve hipoklorik asit ($HOCl^{\cdot}$) gibi serbest radikalleri ortaya çıkararak gösterirler. Oksidatif stres sonucu gelişen nefrotoksisite beraberinde glomerüller, tübülointerstisyel ve endotelial değişiklikler de oluşabilmektedir (24).

Antineoplastikler

Kanser tedavisinde kullanılan antineoplastikler, kansere bağlı ölüm oranlarında önemli ölçüde azalmalara yol açıyorsa da tedavide kullanılan ajanların toksik etkileri nedeniyle böbrek gibi dokularda hasarlanmalara da yol açabilmektedirler. Antineoplastikler böbreklerde nefronun proksimal, distal tübül ve glomerül kısımlarının her üç ana bölümüne de zarar vererek hasara neden olabilmektedir. Bunun sonucu olarak glomerüller filtrasyonda azalma, plazma üre ve kreatinin düzeylerinde artma görünür. Bu toksik ajanların oksidan stresi artırdığı düşünüldüğünde dengelemek amaçlı antioksidan ajanların destekleyici olarak alınması ve hidrasyon gibi uygulamalarla toksisite hafifletilebilir (23, 25).

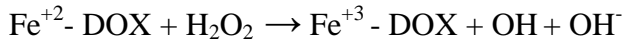
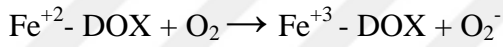
Doksorubisin

DOX, antrasiklin ailesinden olan, *Streptomyces* bakterilerinden; *Streptomyces peucetius* var. *caesius* türünden elde edilen, antrakininon, kromofor ve aminoglikozidlerden oluşan dört halka yapısına sahip bir moleküldür (Şekil 2) (26). Kanser kemoterapisinde sıklıkla kullanılan, doku ve organlarda toksisiteye yol açan, deneysel nefrotoksisite, kardiyotoksisite ve hepatotoksisite gibi çalışmalarda da

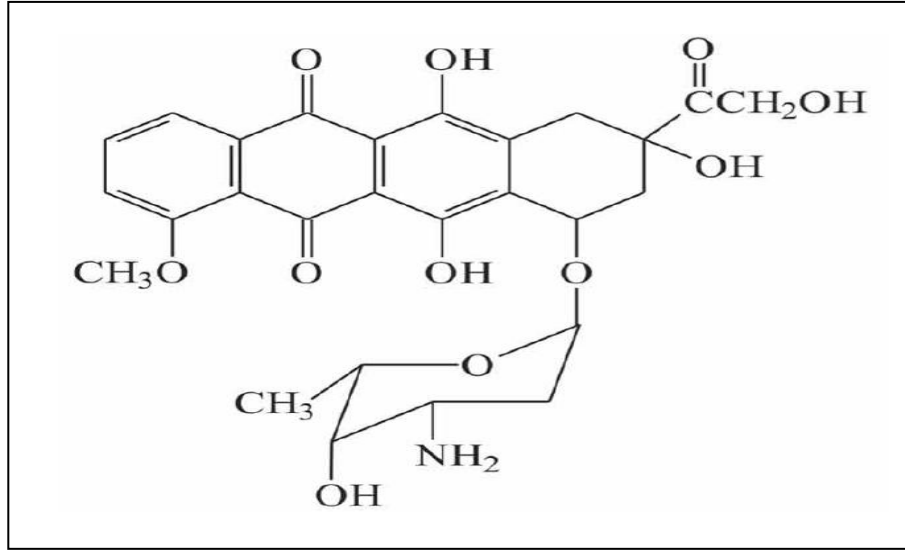
sıklıkla kullanılan bir antineoplastik ajandır (27). DOX'un sitotoksik etkilerini çeşitli molekülleri ve sinyal yollarını hedef alarak, DNA baz çiftleriyle etkileşerek ve DNA ilişkili enzimlere bağlanarak gösterdiği belirtilmektedir (28). Örneğin DOX, adenosin mono fosfat-aktive edilen protein kinazdan (AMPK) çeşitli moleküler sinyallerin aktivasyonuna yol açarak Bcl-2/Bax oranını değiştirebilmekte ve bu değişim kaspazların aktifleşmesi beraberinde apoptozisle sonuçlanabilmektedir (29).

DOX molekülünün, hücrelerdeki akıbeti (30-32);

- Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) tarafından indirgenerek hidrokinon yapısına dönüşmek.
- DNA baz çiftleri arasına girerek Topoizomerez II ve Helikaz'ı inhibe etmek, DNA ve RNA proteinlerine bağlanmak.
- Flavin içeren dehidrogenazlar sayesinde kararlı serbest radikal ürünlerine dönüşmek.
- Demir ve bakırı bağlayarak reaktif oksijen türlerinin oluşmasına yol açmak.



DOX'un Fe^{+3} ile oluşturduğu kompleks ve oluşan diğer oksijen radikalleri hücre içi taşıyım sistemini engellediği gibi hücredeki katalaz ve GPx gibi hayati önemi olan antioksidan savunma sistemlerini de baskılamakta ve lipid peroksidasyonlarına neden olabilmektedir (30, 33). Güçlü bir şekilde enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla demir ve bakırı bağlayarak reaktif oksijen türlerinin oluşmasına yol açan DOX'un, diğer pek çok dokuda olduğu gibi böbrek dokusu hücrelerinde de yüksek sitotoksik etkilerinin olduğu, antioksidan sistemi baskıladığı, oksidatif stresi artırdığı ve hücre apoptozisini tetiklediği belirtilmektedir (33). DOX'un insanlardaki kümülatif dozu olan $450-500 \text{ mg/m}^2$ 'nin üzerinde böbrek, karaciğer, kalp gibi çoğu doku ve organlarda ciddi toksik etkilere neden olduğu rapor edilmiştir (30, 32, 34).



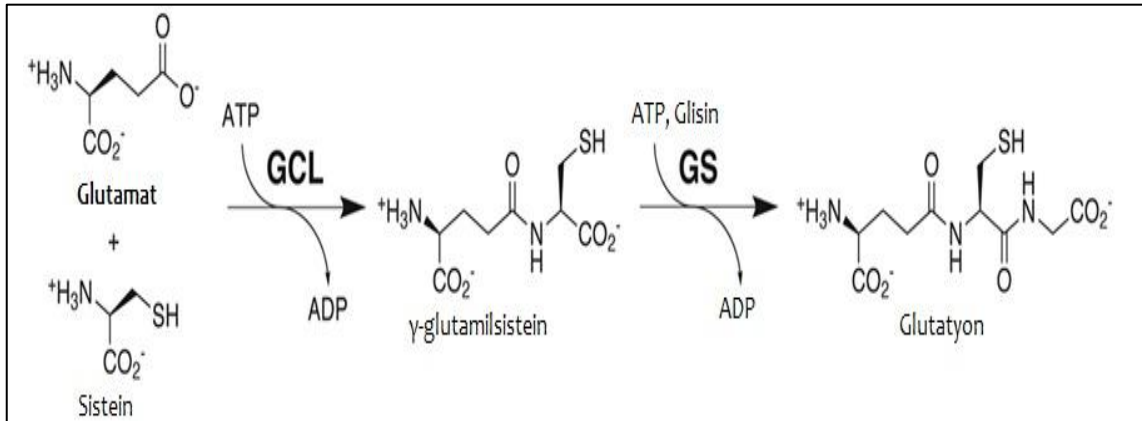
Şekil 2. Dokсорubisin yapısı (Cuts'dan, 26)

4.2. Glutasyon, Kaspaz-3 ve NF-kB

4.2.1. Glutasyon ve İlgili Enzimleri

4.2.1.1. İndirgenmiş/Yükseltgenmiş Glutasyon

Glutasyon (γ -glutamilsisteinilglisin), bitki ve hayvanlarda yaygın bir şekilde bulunan bir tripeptiddir. Glutasyon, γ -glutamilsisteinil sentetaz (GCL) ve glutasyon sentetaz (GS) enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla sentezlenir (Şekil 3) (35).

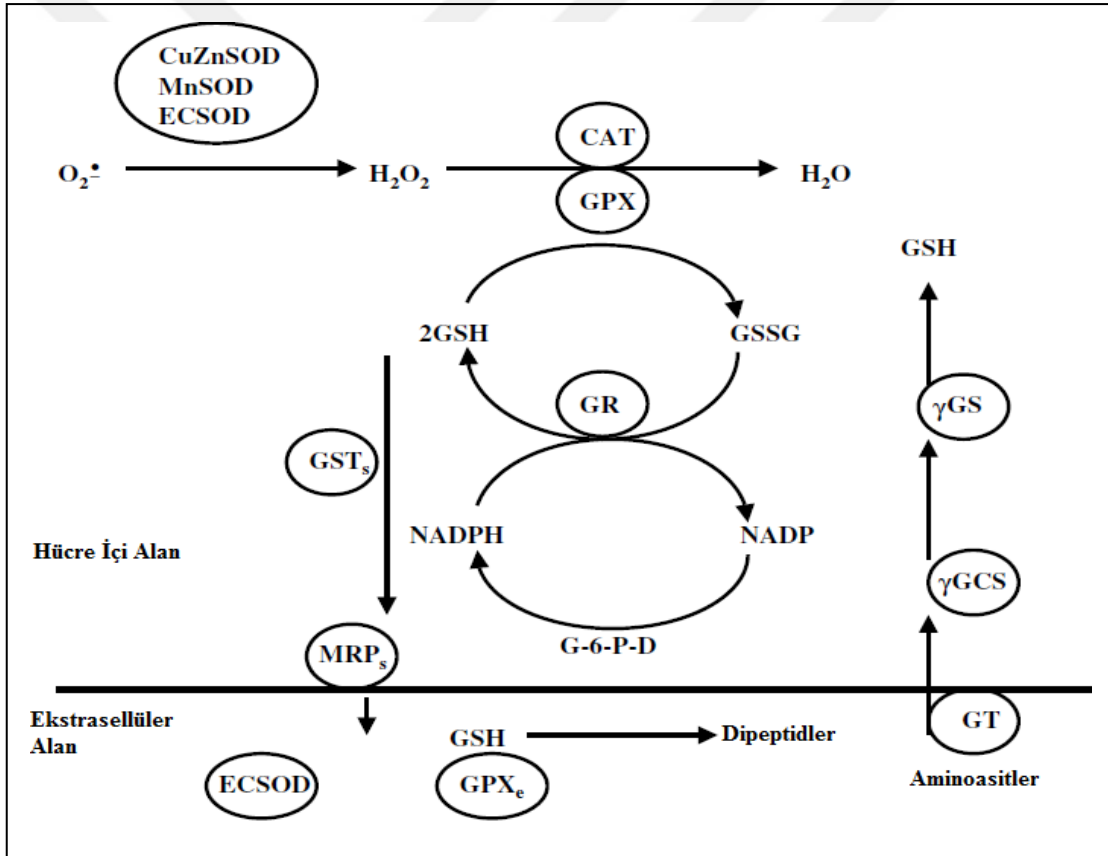


Şekil 3. Glutasyon sentezi (Galant'dan, 35)

Plazma düzeyleri birkaç mikromolarken, karaciğer ve böbrek gibi dokularda birkaç milimolar seviyelerindedir (36, 37).

Glutasyonun indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) şekli vardır. Düşük GSSG/GSH oranı, oksidatif strese karşı korunmada esansiyeldir (38). GSH, hidroperoksitlerin redüksiyonunda elektronların vericisi olarak ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda nükleofilik bir ko-substrat olarak görev yapmasıyla canlılarda hayati öneme sahiptir. Ayrıca GSH, proteinlerin sülfidril gruplarının indirgenmesinde ve aminoasitlerin membranlardan taşınımında önemli rolleri olan bir bileşiktir (39, 40).

Glutasyonun fonksiyonlarını yerine getirmede görev alan GR, GPx, GST ve GGT önemli rolleri olan enzimlerdir. Bu enzimler ve ilişkili diğer bazı antioksidan enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlar Şekil 4'de özetlenmiştir (39).



Şekil 4. İnsan dokularındaki önemli antioksidan enzimler ve glutasyonla ilişkisi (Kinnula'dan, 39)

CuZnSOD (bakır-çinko-SOD), MnSOD (manganez SOD), ECSOD (ekstrasellüler SOD), CAT (katalaz), GPX (glutasyon peroksidaz), GR (glutasyon redüktaz), GSH (indirgenmiş glutasyon), GSSG (yükseltgenmiş glutasyon), GST (glutasyon S transferaz), MRP (Multidrug resistans protein), G6PD (glukoz-6- fosfat dehidrogenaz), γ GT (gama glutamil transpeptidaz), γ GCS (gama glutamil sisteinil sentetaz veya glutamat sistein ligaz), γ GS (gama glutasyon sentaz), GPXe (ekstrasellüler glutasyon peroksidaz).

4.2.1.2. Glutasyon Redüktaz

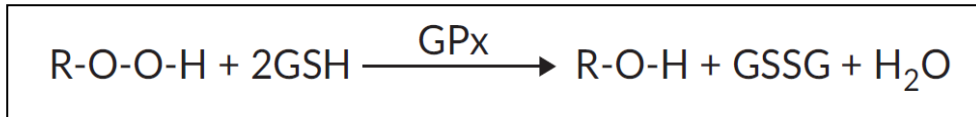
Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2), glutasyonun yükseltgenmiş şeklini nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) bağımlı olarak indirgenmiş formuna dönüştüren, flavoprotein yapısındaki antioksidan bir enzimdir (Şekil 5). GR, hücrel GSH düzeylerinin uygun seviyelerde tutulması açısından GSH redoks döngüsü için esansiyel bir enzimdir. (41).



Şekil 5. GR enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon

4.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9) 1957 'de Mills tarafından keşfedilmiş bir enzim ailesinin genel adıdır. GPx, başta karaciğer ve eritrositler olmak üzere, kalp, akciğer, böbrek gibi pek çok dokuda bulunmaktadır (42, 43). Lipid peroksitler, DNA peroksitler gibi organik hidroperoksitlerin veya hidrojen peroksitlerin indirgenmesi reaksiyonunu katalizlemektedirler (Şekil 6). Bu reaksiyonlarda indirgeme işleminde elektron vericisi olarak GSH kullanılmaktadır. GPx'in katalizlediği bu reaksiyon, hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasında esansiyeldir (43).



Şekil 6. GPx enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon

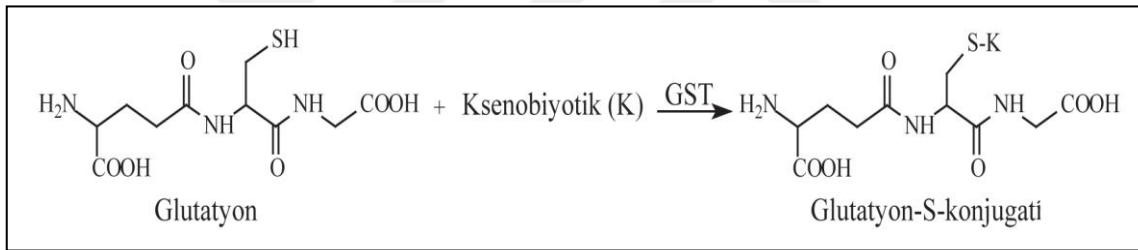
Ayrıca GPx'in hidrojen peroksitinde dahil olduğu hidroperoksitlere etkili olan selenyum bağımlı ve hidrojen peroksit dışındaki diğer organik hidroperoksitlere etkili olan selenyumdan bağımsız olmak üzere iki türü vardır (43).

4.2.1.4. Glutasyon S-Transferazlar

Glutasyon S-transferazlar (GST, EC 2.5.1.18), sitozolik, mikrozomal ve membrana bağlı formlarda bulunan antioksidan enzimlerdir. Çözülebilir formda GST-alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, teta ve zeta olmak üzere 8 izoformdan oluşur. GST- α izoformu sadece böbrek proksimal tübüllerinde bulunurken, GST-pi formu distal

tübüler hücrelerde bulunmaktadır. GST- α formunun nefrotoksisitede, akut böbrek hasarlarında erken bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (44, 45). GST'ler toksinleri GSH ile konjuge ederek elektrofilik alanlarını nötralize ederler ve sudaki çözünürlüklerini artırırlar (44).

GST'ler hücre sel detoksifikasyonda anahtar rol oynayan multifonksiyonel enzimlerdir. Endojen ve eksojen kaynaklı elektrofilik ve hidrofobik özellikteki ksenobiyotiklerin GSH ile konjugasyonu reaksiyonunu katalizleyerek atılabilecek şekle veya daha az toksik metabolitlerine dönüşümünü sağlayan faz II detoksifikasyon enzim ailesindedirler. Oluşan glutatyon konjugatları, daha sonra merkaptobütirik asite metabolize edilerek vücuttan atılmaktadır (44). Özetle GST'ler karsinojenler, terapötik ilaçlar, çevresel toksinler ve oksidatif stres ürünlerinin detoksifikasyonunda büyük önemi olan enzimlerdir (46, 47). Glutatyonun GST aracılığıyla ksenobiyotiklerle konjugasyonu şekil 7'de gösterilmiştir.



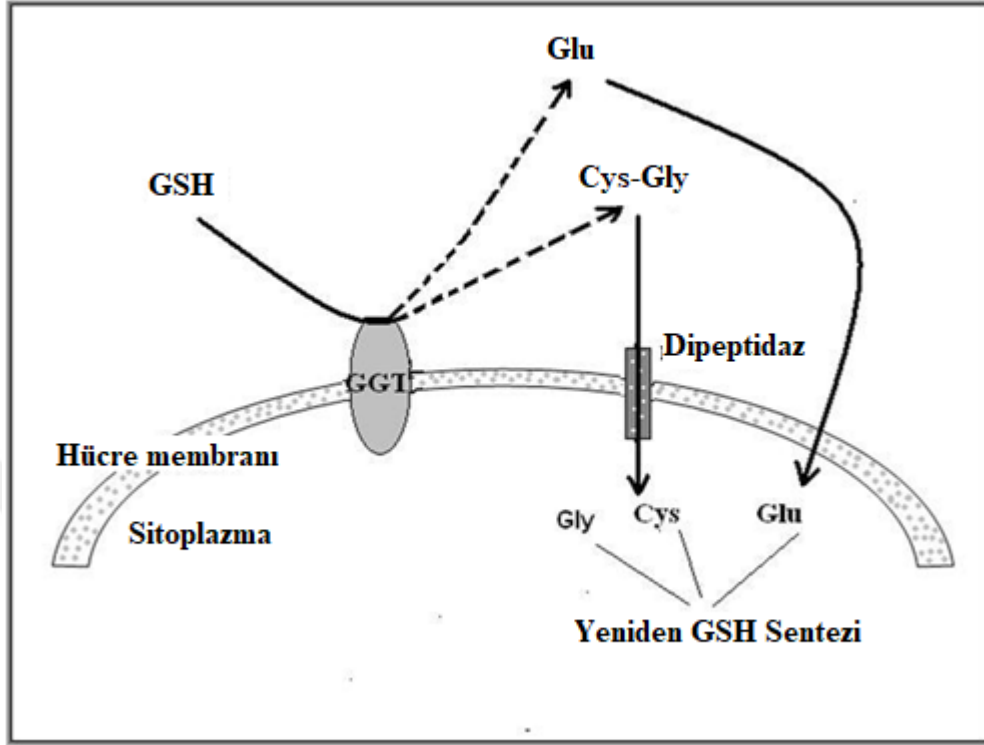
Şekil 7. Glutatyonun GST aracılığıyla ksenobiyotiklerle konjugasyonu (Tozkoparan'dan, 47)

Literatürde, GST'lerin inaktive yapıda inhibitör kappa B-NF- κ B (I κ B-NF κ B) halinde bulunan yapıdaki, I κ B'nin fosforilasyonunu sağlayarak NF- κ B sinyal yolağını aktive ettiği, indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) ve NO'in regülasyonuna etki ettiği yönünde veriler elde edilmiştir. Ayrıca *in vitro* ortamda oksidatif sitrese karşı koruyucu etkilerinin de olduğu belirtilmektedir (48).

4.2.1.5. Gama Glutamil Transferaz

Gama glutamil transferaz veya diğer ismi ile gama glutamil transpeptidaz (GGT, EC 2.3.2.2) hücre membranlarında bulunan, γ -glutamiletamid bağlarını hidroliz eden, ekstrasellüler GSH yıkımının ilk basamağını katalizleyen, reaksiyon sonucu sisteinil glisin oluşan, ara ürün temini sayesinde hücre içi GSH sentezlerinin

gerçekleşmesi yönünde etkileri olan bir enzimdir (49-51). Şekil 8’de gama glutamil döngüsü özetlenmektedir.



Şekil 8. Gama-glutamil döngüsü (Şener’den, 51)

(GSH: İndirgenmiş glutatyon, GGT: Gama-glutamiltransferaz, Glu: Glutamik asit, Cys Gly:Sisteinilglisin, Cys:Sistein, Gly: Glisin).

GSH hücre içine direkt alınmadığı için yapıtaşları olan amino asitlere GGT sayesinde parçalanır. Böbreklerde GGT enzimi, proksimal tübüllerin fırçamsı kenarlarında lokalize olmuş bir enzimdir ve normal olarak idrarda bazal seviyelerde bulunurlar. Plazma GGT düzeyleri akut tübüler nekrozda hücre kayıplarından dolayı artar ve ayrıca yükselmiş GGT seviyeleri, proksimal tübüler hasarlarının bir biyobelirteci olarak değerlendirilmektedir (45).

4.2.2. Nükleer Faktör Kappa B

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) transkripsiyon faktörlerinin bilinen beş proteininden birisidir. NF κ B p60 ve p65’in heterodimer bir oluşumudur. Nükleer inhibitörü olan I κ B proteinleri tarafından G₀ fazındaki hücrelerin sitoplazmasında sentezlenir ve inaktif olarak bulunur. Sitokinler, radyasyon, çeşitli antineoplastik ajanlarla fosforilasyon veya ubiquitinyasyon sonucu I κ B’nin proteozom aracılığıyla yıkımına yol açarak NF- κ B nin aktive olmasına neden olabilmektedir (52). NF- κ B,

ekzojen indükleyiciler (lipopolisakkaritler) ve endojen indükleyiciler (sitokinler, interferon gama, tümör nekroz faktör α (TNF- α) tarafından aktive edilerek sitozolden çekirdeğe geçer ve inflamasyon artar. Ayrıca indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gen ekspresyonunu da tetikleyebilmektedir. (53). NF- κ B yolağı inflamatuvar mekanizmalar açısından önemli olarak ele alınmaktadır. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin oluşumu mekanizmalarının DOX ile uyarılmış toksisitelerde NF- κ B yolağının aktifleşerek inflamasyonun arttığı ve ayrıca bu artışın hücrelerin apoptozisinde önemli olduğu düşünülmektedir (54). İNOS ekspresyonunun peroksizom proliferatör-aktive reseptörleri ile ilişkili olduğu, NF- κ B gibi transkripsiyonel faktörlerinin antagonisti olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca NF- κ B, peroksizom proliferatörünü aktive eden reseptörünü (PPAR) modifiye edici etkiye sahip olabilmektedir (55).

4.2.3. Kaspaz-3

Hücre ölümü, membrana bağlı apoptotik cisimlerin çeşitli etkileşimler sonucu apoptozisi tetiklemesiyle veya membranın geçirgenliğinin artması beraberinde mitokondriyal bozulma sonucu oluşan nekroz ile gerçekleşmektedir. Kaspazlar, apoptozisin başlatılması ve uygulanmasında görev alan, sitozolik aspartat spesifik sistein proteaz ailesinin üyelerindedir. Kaspazların aktivasyonu apoptozisin uygulanmasında merkezi bir rol oynar (56).

Kaspazların aktivasyonu ile ilgili iki temel yolak üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu yollardan biri hücre yüzeyi ölüm reseptör yolağı, diğeri mitokondriyal başlatılan yolak olarak nitelendirilmektedir. Mitokondriyal yolda üç genel mekanizma ile apoptozisin tetiklenmekte olduğu belirtilmektedir. Bunlar sırasıyla, elektron taşınımının, oksidatif fosforilasyonun ve ATP sentezinin bozulması, mitokondride bulunan ve kaspaz protein ailelerini aktive eden sitokrom-c gibi proteinlerin salınımı ve hücrel indirgenme-yükseltgenme potansiyelindeki değişimler olarak sıralanmaktadır (57).

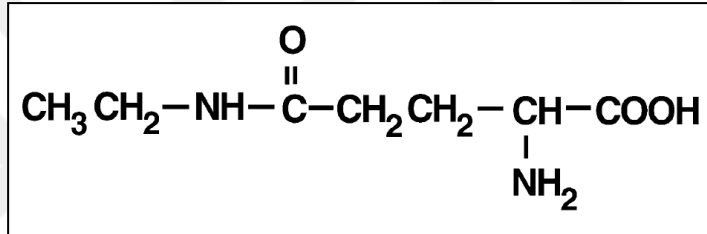
Mitokondriyal yolda kaspaz-9 un aktif formuna dönüşmesi ile kaspaz-3 de aktifleşmektedir. Aktifleşen kaspaz-3 apoptozisin uyarılma mekanizmasında ve değerlendirilmesinde bir biyobelirteç olarak sıklıkta kullanılmaktadır. Özellikle anti

kanser ilaçların etkileri ve keşifleriyle ilgili çalışmalarda kaspaz-3 ve ilişkili yollar sıklıkla değerlendirilmektedir (57, 58).

4.3. Theanin

4.3.1. Theaninin Yapısal Özellikleri

L-Theanin (2-amino-4- (etilkarbamoyl) bütirik asit; γ -glutamiletamid, 5-N-etilglutamin, γ -glutamyl-L-etilamid, γ -etilamino-L-glutamik asit, $C_7H_{14}N_2O_3$), 174.20 Da molekül ağırlığında, çay türlerinde bulunan en önemli serbest amino asittir (2). Kimyasal yapısı (Şekil 9) nörotransmitter glutamat ve gama amino butirik asit (GABA) ile benzerlik gösterir. Glutamatın karboksilik ucu ile bir etil grubun takip ettiği diğer bir amino grubun modifikasyonu ile L-theanin oluşmaktadır (5).



Şekil 9. L-theaninin kimyasal yapısı

L-Theanin, *Xerocomus badius* mantarı hariç genel olarak *Camellia* cinslerinde, özellikle çay üretiminde kullanılan *C. Sinensis var. sinensis* ve *C. sinensis var. Assamica*, *C. japonica* ve *C. sasanqua* türlerinde bulunmasıyla doğadaki eşsiz bir amino asit olarak nitelendirilmektedir (3, 59). 1949 yılında Sakato tarafından yeşil çayda keşfedilmiştir ve 1964 yılları itibariyle de besin takviyesi olarak kullanılmaktadır (2).

Çay yaprağının kuru ağırlığın % 1-3 kadarı ve çayda bulunan serbest amino asitlerin % 50 kadarını theanin oluşturur. Theanin miktarı yüksek olan çaylar daha pahalı ve değerlidir. Çaydaki theanin miktarının, güneş ışınlarına maruz kalma süresiyle ters orantılı olduğu belirtilmektedir. Az güneş alan iklimlerde kateşin konsantrasyonlarının düşük, theanin konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (3). Baros ve ark. (60) theanin miktarlarını beyaz, yeşil, oolong ve siyah çayda sırasıyla 6.26, 6.56, 6.09 ve 5.13 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Alasalvar ve ark. (61) 100 g instant siyah çayda yaklaşık 500 mg theanin tespit etmişlerdir. Diğer

bir çalışmada demlenme süresine bağlı olarak bir kupa (200 mL) çayda yaklaşık 25 mg theanin bulunduğu belirtilmiştir (61).

Theanin, 0 °C'de 1/3 oranında, 100 °C'de 1/8 oranında suda çözünebilme potansiyeliyle yüksek çözünürlüğe sahiptir. Fakat etanol, metanol ve kloroform gibi çözücülerde çözünmez. Asidik durumlarda (pH= 3.0-6.6) yüksek oranda stabildir. Sıcak sıvı tüketim düzeylerinde (örneğin 121 °C'de 5 dk. .) yıkıma uğramadığı, modifiye olmadığı belirtilmektedir (59, 62).

Çaydaki umami tat theanin kaynaklıdır ve çayın kalitesiyle theanin miktarı doğru orantılıdır. T1R1 + T1R1 umami tat reseptörleri üzerinden umami tadın algılanmasına sebep olur (3, 63).

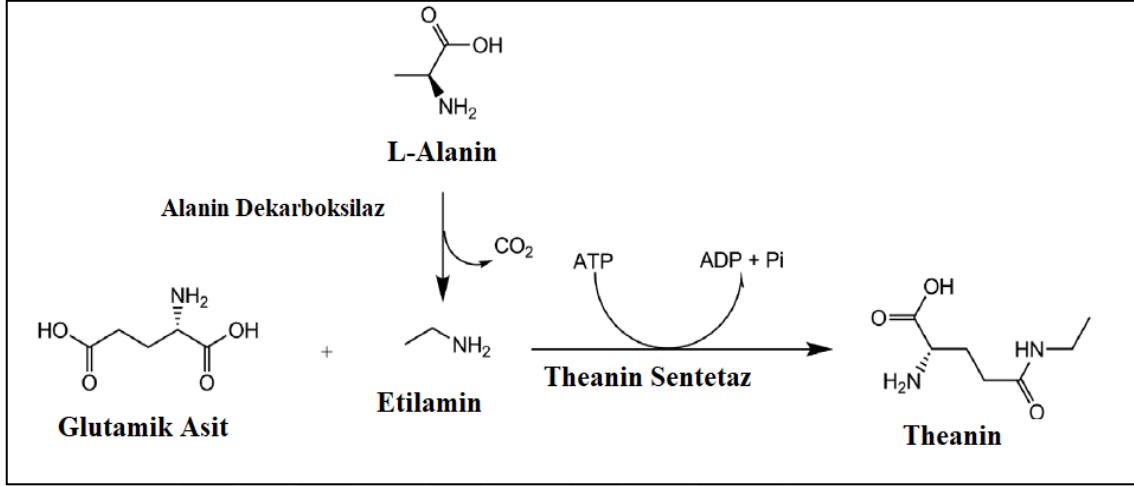
4.3.2. Theanin Biyosentezi, Farmakokinetiği ve Metabolizması

Theaninin özellikle çay bitkilerinde glutamattan ve etilaminden, magnezyumlu bir enzim olan theanin sentetaz (L-Glutamik Asit: Etilamin Ligaz, EC 6.3.1.6) enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla sentezlenmektedir (64). Bitkinin kotiledonlarından kök, gövde ve yapraklarına kadar tüm kısımlarında sentez gerçekleşebilmektedir. Olgun bir çay bitkisinde kotiledonlardan ziyade kök kısımlarında daha fazla theanin sentetaz geni (TS₁, TS₂) transkripsiyonu görülür. Bitkinin besin kanalları olan floemler ve su kanalları olan ksilemler aracılığıyla taşınarak olgunlaşmış yapraklarda depo edilir (3, 65). Theanin konsantrasyonu, bitkinin germinasyonundan sonra 60 gün boyunca artar. Oluşan yoğun konsantrasyon veya magnezyum eksikliği gibi durumlarda theanin hidrolaz (ThYD) enzimi aracılığıyla yıkılarak glutamik asit ve etilamin ürünlerine yıkımının başladığı belirtilmektedir (62, 66).

Sentetik olarak genellikle insanlar için patolojik veya toksik olmayan *Pseudomonas nitroreducens* ve *Bacillus amyloliquefaciens* türlerinden elde edilen glutaminaz enzimi ile besin kaynaklı etilamin ve L-glutamin' den suntheanin adı da verilen sentetik theanin üretilmektedir (59, 65). Mikrobiyal enzimlerle L-theanin biyotransformasyonu çalışmalarında enzim olarak GGT ve Glutaminaz, γ -glutamil vericisi olarak glutamin ve alıcı substrat olarak etilamin kullanılmaktadır (67). Şekil 10'da L-theanin'in muhtemel sentez yolu gösterilmiştir (68).

Theanin, oral yolla alındığında ince bağırsaklardan Na⁺ beraberinde emilmektedir. Ayrıca metiyonin taşıyıcı transport sistem tarafından da

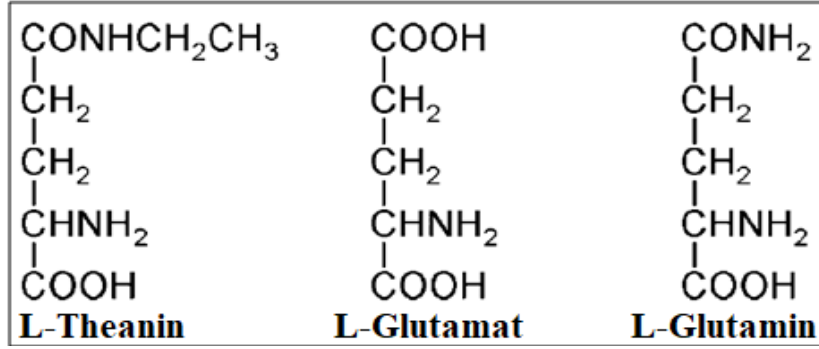
emilebilmektedir. Theaninin hidrolizasyonu büyük ölçüde böbreklerdeki fosfat bağımsız glutaminaz enzimi ile gerçekleştiği, reaksiyon sonucu glutamik asit ve etilamin ürünlerine dönüştüğü belirtilmektedir. Daha sonra oluşan metabolitlerin kan düzeylerindeki seviyelerinin yükselmesiyle idrarla atılabilmektedir (68, 69).



Şekil 10. Theaninin muhtemel sentez yolu (Unno'dan, 68)

Theanince zengin (25-100 mg theanin içeren) bir çayın tüketilmesi akabinde absorpsiyon ve emilimin yarılanma zamanının 15-65 dk. . içerisinde gerçekleştiği belirtilmektedir. Bu dozda theanin alınımı sonrası maksimum plazma konsantrasyonunun 1.0- 4.4 mg/L aralığında, bu konsantrasyona ulaşma zamanının ise 30-50 dk. . ile 2 saat aralığında olduğu gösterilmiştir (70). Theaninin plazma klerensi ise 24 saat kadar sürmektedir (59).

Theaninin glutaminle benzer metabolik akibete uğradığı belirtilse de, hipertansif ratlarda glutamin verilen grupta bir farklılık gözlemlenmezken, theanin verilen grupta hipotansif etki gözlemlenmiş, bu noktada theaninin glutaminden farklı etkilerinin olabildiği ortaya konmuştur (4). Şekil 11'de L-theanin, L-glutamat ve L-glutaminin kimyasal yapıları karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir (71).



Şekil 11. L-theanin, L-glutamat ve L-glutamin'in kimyasal yapıları

4.3.3. Theanin Kullanımı ve Biyoaktif Etkileri

Keşfinin ardından 1964 yılında Japonya Sağlık ve Refah bakanlığı tarafından theaninin besin katkısı olarak kullanılabilceği önerilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) ya göre L-theanin; "Genellikle Güvenilir Tanınan" (GRAS) FDA referansı ile da toksik olmayan bileşik olarak tabir edilerek besin takviyesi olarak satışı onaylanmıştır. Özellikle yeşil çay tüketimi tarihi ve geniş kullanım alanları da göz önüne alındığında, L-theaninin herhangi bir diyet sınırlandırılma önerisi kaydedilmemiştir (59). Taiyo Kagaku 1999 yılında mikrobiyal enzimlerle L-theanin üretmesiyle Japonya Besin Bileşeni Araştırma ödülü almıştır (59).

L-theaninin toksik veya yan etkilerinin olup olmadığıyla ilgili, 2016 yılında, deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya göre L-theanin, vücut kütlelerine göre; 0 mg/kg, 1500 mg/kg, 3000 mg/kg ve 4000 mg/kg dozlarla dişi ve erkek sıçanların günlük diyetlerine eklenmiş, 13 hafta bu uygulamaya devam edilmiştir. Bulgularına göre; davranışlarda, morbiditede, mortalitede, vücut ağırlığında, besin alınımı ve verimliliğinde, organ kütlelerinde kimyasal veya histopatolojik herhangi bir yan etki veya toksisiteye rastlanmadığı belirtilmiştir (62). İnsanlarda oral olarak 2000 mg/kg/gün ölçüsünden fazla L-theanin alındığında yan etkilerin gözlemlenebileceği bildirilmiştir (72). Ayrıca theaninin ölümcül dozunun ortalama 5g/kg olduğu belirtilse de literatur verilerinin bu çerçevede zayıf kaldığı ifade edilmiştir (62).

Türkiye çay tüketiminde lider durumda olmasına rağmen theanin ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Ulusal tez merkezi taramasında theanin ile ilgili bir yüksek lisans ve bir doktora tezi mevcuttur. Yüksek lisans tezinde doğrudan theanin

değil, günde 5 fincan siyah çay tüketimi sağlanarak araştırma yapılmış, yani polifenoller gibi çayda bulunan tüm içerikler tüketilmiş, bunula birlikte antioksidan kapasitede önemli artış, MDA ve oxLDL seviyesinde önemli düşüş görülmüştür. Plazma serbest amino asit miktarında da çay tüketen grupta önemli oranda artış gözlemlenmiştir. Gıda alanında yapılan doktora tez çalışmasında ise “Çay işlemede teanin miktarının değişimi” başlıklı konu incelenmiştir (73).

Tablo 1. L-Theaninin biyoaktif etkileri (1, 65, 75-77)

Özellik	Etki
Rahatlatıcı (Antidepresan)	Serotonin düzeyini arttırıcı Akut stresi baskılayıcı
Hafıza ve Konsantrasyonu Artırıcı	GABA benzerliği ile nörotransmitter, Hafıza güçlendirici, Nöroprotektif
Antioksidan	Lipid peroksidasyonunu ve LDL oksidasyonunu azaltıcı, GSH seviyesini arttırıcı
İmmün sistemi güçlendirici	Grip vb. soğuk algınlıklarıyla ilgili hastalıkların gelişimine karşı koruyucu İmmün globulinleri arttırıcı
Antiinflammatuvar	IL-6 seviyesi azaltıcı, IL-10 seviyesi arttırıcı
Antikanserojen	Göğüs, kolon, karaciğer ve prostat kanser hücrelerinde apoptozisi stimüle edici
Kemoterapötik İlaçların Etkinliğini Arttırıcı	Glutamat taşıyıcılarını inhibe edici etki glutamattan GSH sentezinin inhibisyonu
Vazodilatör	ERK/eNOS yolağı üzerinden NO üretimini arttırıcı
Antilipidemik	Serum kolesterol seviyesi düşürücü
Antihipertansif	Tansiyon seviyesini düşürücü

Theaninin etkilerinin incelendiği *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışma literatürde mevcuttur. Son yıllarda çayda bulunan en önemli serbest aminoasit olan theaninin başta rahatlatma etkisi olmak üzere, zihinsel performans, uyku kalitesi, duygusal durum, kanser, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar gerçekleştirilmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (3, 74). Tablo 1'de L-Theaninin biyoaktif etkileri özetlenmiştir.

4.3.3.1. Beyin Üzerine Etkisi

Eski çağlardan beri çayın rahatlatıcı etkisinin olduğu bilinmektedir. Beyin dalgaları arasında rahatlama hissi veren α -dalgalarının, theanin aracılığıyla aktive edilerek artırıldığı, dolayısıyla çayın bu rahatlatıcı etkisini içerdiği theanin amino asidi vasıtasıyla gerçekleştirdiği, tam mekanizması bilinmemekle beraber ortaya konmuştur. Theaninin zihinsel ve fiziksel rahatlama, algıyı ve bilinci geliştirme, duygu durumu ve konsantrasyonu artırıcı etkilere sahip olduğu belirtilmektedir (59, 74). Uyumadan önce 200 mg theanine almanın uykü kalitesini de arttırdığı belirtilmektedir (72).

Antidepresan tedavilerde sabah ve akşam 200 mg olmak üzere günde 400 mg theanin kullanılması önerilebilmektedir (78). Theaninin yüksek dozlarının kafeinin beyindeki uyarıcı etkisini inhibe ettiği, kafein ile uyarılmış uykü bozukluğuna negatif yönde etki ettiği, theanin ile kafeinin antagonist davrandığı ileri sürülmüştür (79). Diğer taraftan theanin, kafeinle kombine edilerek tüketildiğinde konsantrasyon ve algı durumunun yükseldiği, kafeinin uykü bozukluklarına yol açan uyarıcı etkisinin azaldığı rapor edilmiştir (80). Konvansiyonel uykü haplarının aksine, theanin sedatif değildir. Uykü düşkünlüğü olmadan rahatlatıcı etkisini gösterebilmekte ve anksiyoliz üzerinden kaliteli uyküyü indükleyebilmekte olduğu ileri sürülmüştür (81).

Kan-beyin bariyerini geçebilen theanin, beyinde dopamin, serotonin ve GABA üretimini arttırmaktadır (82). GABA-(A) reseptörüyle etkileşerek nöron koruyucu etkisini göstermektedir. Bir GABA-(A) reseptör antagonisti olan *Bicucullinin*, theaninin nöroprotektif etkisini inhibe edebildiği, bir glutamat dekarboksilaz enzim inhibitörü olan 3-merkaptopropiyonik asitin ise theaninin nöroprotektif aktivitesine etki etmediği gösterilmiştir (83). Theaninin glutamik asitle yapısal benzerliklerinden dolayı beyinde L- glutamik asitin bağlandığı glutamat reseptörlerini blokladığı ve bu sayede kortikal nöron uyarılarını inhibe ederek stres azaltıcı etkinliğini gösterdiği düşünülmektedir (84).

Theaninin serebral iskemiyle indüklenen hafıza zayıflığını engellediği, nörotoksin ile uyarılmış Parkinson hastalığı gelişiminde koruyucu etkisinin olduğu, hipokampus CA1 alanındaki nöronal hücre ölümlerini inhibe ettiği yönünde bulgular mevcuttur (62, 75, 85). Ayrıca theaninin, şizofreni ve şizofektif bozukluğu olan hastalarda aktivite ve endişe semptomlarını hafifletip rahatlattığı belirtilmektedir.

Hipokampusde beyin türevli nörotrofik faktörü (BDNF) uyardığı, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörüne yarışmalı bağlandığı, böylece antidepresan etkisinin olduğu ve antipsikotik etkiyle benzer bir etki gösterdiği belirtilmektedir (86, 87).

4.3.3.2. Antioksidan, Antiinflamatuvar, Antifibrotik ve Antinekrotik Etkileri

Son zamanlarda yapılan pek çok çalışmayla koruyucu etkileri ve bu etkilerin moleküler mekanizmaları ortaya konulmaya çalışılan theaninin özellikle karaciğer dokusunda antioksidan kapasiteyi artırıcı yönde önemli etkilerinin olduğu göstermiştir (62). Theaninin hepatositlerde antioksidan sistemin en önemli bileşenleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, GR aktivitelerini ve GSH seviyelerini artırarak koruyucu etkinlik gösterdiği, hücreleri apoptozdan koruduğu ve lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinin toksik grubu oranla theanin verilen grupta çok daha düşük seviyelerde olduğu rapor edilmiştir (88). Ayrıca theaninin, karaciğer hücrelerinde doku büyüme faktörü-beta (TGF- β), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) kapasitesini azaltarak ve matriks metaloproteinaz 13 (MMP-13) enzimini aktifleştirerek antioksidan ve antifibrotik özellik sergilediği düşünülmüştür (89).

Theaninin antiinflamatuvar ve antinekrotik özelliklerinin ise oksidatif stres ile uyarılmış hücre ölümüne yol açan NF κ B yolağını inaktive ederek interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe ve antiinflamatuvar özellikteki IL-10 düzeyini artırarak gerçekleştirdiği yönünde veriler mevcuttur (89). Bu veriler ışığında L-theaninin muhtemel antifibrotik, antinekrotik ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu düşünülmekte ve bu kapsamlarda literatür çalışmaları devam etmektedir.

4.3.3.3. İmmünsistem Üzerine Etkileri

Literatürdeki çeşitli çalışmalar, çay tüketiminin hastalıklara karşı vücut direncinin gelişimi açısından olumlu katkılarının olduğu yönünde veriler ortaya koymuştur. Theaninin yıkım ürünü olan ve peptid yapısında olmayan etilaminin immünsistem elemanlarından gama-delta T hücrelerini aktive etmesi sebebiyle, immünsistemin güçlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca theaninin yine gama delta alt tipi olan T hücrelerini destekleyerek kanser gelişimini önlemede rol oynayabileceği belirtilmektedir (62, 90).

Deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada L-sistin ve L-theaninin primer immünizasyondan önce 14 gün boyunca kombine edilerek uygulanmasıyla

serum antijen spesifik IgG ve IgM düzeylerinde artış olduğu, 24 aylık yaşlı fareleri influenza virüsü enfeksiyonuna karşı koruduğu rapor edilmiştir (91).

4.3.3.4. Tümör Hücreleri Üzerine Etkileri

Tümör hücreleri ve bu hücreler üzerinde kemoterapötik ajanların etkinlikleri kapsamında theanin ile ilgili pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma gerçekleştirilmiştir. Temel olarak theaninin, antikanser ilaçlarının tümöral bölgedeki akışkanlıklarını azaltarak tümör kütlelerinin gelişimini engelleyici yönde etki ettiği belirtilmektedir (5).

Theaninin tümör hücrelerinde DOX gibi kemoterapi amaçlı kullanılan ajanların akümülyasyonunu sağlayarak bu ajanların etkinliklerinin artmasını da sağlayabildiği bildirilmektedir. Öyle ki theaninin, tümör hücresindeki ilaç etkisini üç kata kadar artırdığı rapor edilmiştir. Theaninin bu etkisini, hücrelerdeki glutamat taşıyıcılarını % 15 oranında inhibe ederek hücre dışı alanda glutamat seviyelerini yükselttiği ve böylece DOX gibi antitümör özellikteki ajanların etkinliğinin uzun sürmesini sağladığı belirtilmektedir. Kansere hücrelerinin aksine theanin, diğer normal hücreleri antioksidan etkileriyle kemoterapötik ajanların zararlarından koruduğu, bu etkisini ise hücre GSH seviyesini artırarak gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (5-7). Benzer bir çalışmada theaninin tümör hücrelerinde glutamat transportunu inhibe etmek suretiyle hücre içi GSH seviyelerinde azalmalara yol açtığı, normal hücrelerdeyse glutamat reseptörlerine bağlanmasıyla antikanser ilaçların akışkanlığını artırarak koruyucu etkinlik gösterdiği ifade edilmektedir (76).

Yapılan diğer bazı çalışmalarda theaninin göğüs (MCF7), kolon (HT29), karaciğer (HepG2) ve prostat (PC-3) kanser hücre serilerinde hücre ölümlerini indüklediği gözlemlenmiştir. Yine theaninin *in vivo* ve *in vitro* ortamda insan akciğer kanser hücresi A549 ve lösemi K562 hücre serilerinin büyümesini inhibe ettiği yönünde veriler elde edilmiştir (62, 76).

4.3.3.5. Obezite ve Kardiyovasküler Hastalıklar Üzerine Etki

Hiperkolesterolemi, obezite, oksidatif stres beraberinde lipid peroksidasyonları, hipertansiyon, artmış kan basıncı ve endotel disfonksiyonu kardiyovasküler hastalık gelişimi için önemli risk faktörlerindedir. Çayda bulunan temel bileşenlerden olan theaninin, kafein ile kombine edilerek uygulandığı bir çalışmada deney hayvanlarında kilo artışının ve yağ akümülyasyonunun baskılandığı belirtilmektedir. Theanin,

kolesterol peroksidasyonunu engellediği, ayrıca besin alınımını azaltıcı etkisinin olduğu, bu çalışma kapsamında ileri sürülmüştür (92). Yine başka bir çalışmada insan ve deney hayvanlarında theaninin serum kolesterol düzeylerini azalttığı, bu etkisiyle obezite ve kalp hastalıkları gelişimini engelleyici yönde etkilerinin olabileceği rapor edilmiştir (77, 92). Son yıllarda yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalara göre düzenli olarak yeşil veya siyah çay tüketiminin önemli ölçüde kardiyovasküler hastalıkların gelişim riskini azaltıcı yönde etkilerinin olabileceği ifade edilmektedir. Ayrıca kalp damar sağlığının korunması açısından theaninin çayda bulunan önemli bir biyoaktif bileşen olarak değerlendirilebileceği belirtilmektedir (93).

Theaninin hipertansif ratlarda kan basıncını önemli ölçüde düşürdüğu, ayrıca kafein tarafından indüklenen tansiyon artışını inhibe ederek damar sağlığını koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca serebral iskemi reperfüzyon hasarlarında da koruyucu etkisi olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir (93, 94).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

Tablo 2. Kullanılan cihazlar, aletler, kimyasallar ve malzemeler

Biyokimya Tüpleri	(BD Vacutainer)
Buzdolabı (+4 °C)	(Arçelik, Vestel)
Çalkalayıcı	(IKA- ultra turrax T 18)
Derin Dondurucu (-20 ve -80 °C)	(Thermo Electron Corp. Farma -86C ULT Freezer)
Doksorubisin (Hidroklorid)	(Cayman,15007)
EDTA'lı Tüpler	(Vacutest Plast)
ELISA yıkayıcısı	(Biotek ELx 50)
Etüv	(Galenkamp)
Hassas Terazı	(Mettler Toledo AB 204-S)
Homojenizatör	(IKA- ultra turrax T 18)
Işık mikroskobu	(Olympus BX-51, Olympus, DP 71)
L-Theanin (N-Etil-Lglutamin)	(Chem-Impex Intl, Inc. Kn:14293, Chicago, ABD)
Manyetik karıştırıcı	(Ikamagrh)
Metafosforikasit	(Sigma-Aldrich)
Mikroplaka okuyucu	(Moleculardevices Versa Max)
Mikrotom	(Leica RM2255, Japonya)
Otoanalizör	(Becman Coulter AU5800)
Otomatik pipetler	(Socorex, Isolab, Ependorf)
pH Metre	(Hanna Instruments pH211)
Pipet Uçları	(ExPell, Axygen)
Saf Su Arıtma Cihazı	(Kros)
Santrifüj (soğutmalı)	(Centrifuge 5810, Beckman Coulter, Allegra 64R)
Santrifüj tüpleri (1,5 mL)	(Isolab)
Sıçan terazisi	(Kern-Sohn-GmbH, PCB-800-1)
Tartım Aleti	(Tanita Body Composition Analyzer, TBF-300)
TEAM reagent	(Sigma-Aldrich)
Trietanolamin	(Merck)
Vorteks	(IKA® Vortex, Genius 3)

Tablo 3. Kullanılan ticari kitler

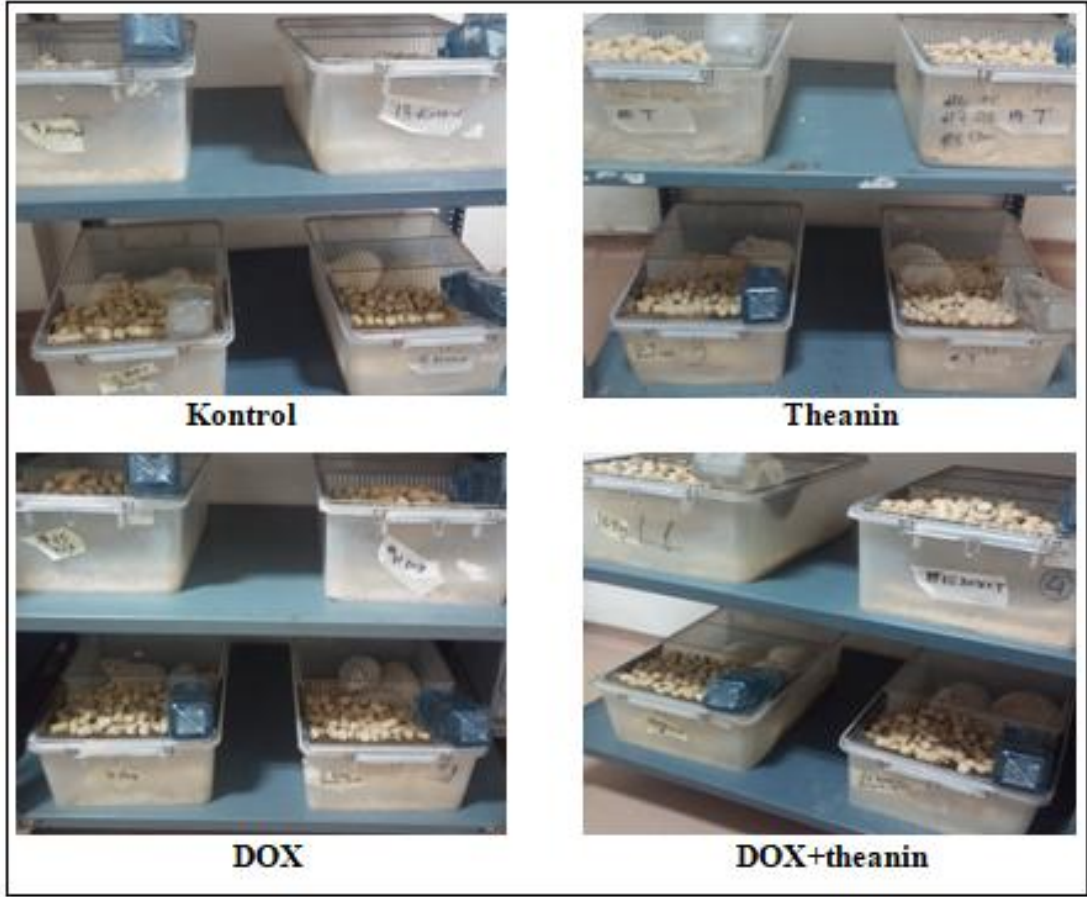
Kit Adı	Marka, Ürün Kodu, Şehir, Ülke
Caspase-3 Kiti	(Elabscience, E-EL-R0160, Teksas, ABD)
Gamma Glutamil Transferaz 1 Kiti	(Elabscience, E-EL-R0404, Teksas, ABD)
Nükleer Faktör Kabba B Kiti	(Elabscience, E-EL-R0674, Teksas, ABD)
Glutasyon Kiti	(Cayman, 703002, Michigan, ABD)
Glutasyon Peroksidaz Kiti	(Cayman, 703102, Michigan, ABD)
Glutasyon S-Transferaz Kiti	(Cayman, 703302, Michigan, ABD)
Glutasyon Redüktaz Kiti	(Cayman, 703202, Michigan, ABD)
<i>In situ</i> cell death detection kit pod	(Roche, 11684817910, Berlin, Almanya)
Kan Üre Azotu (BUN) Kiti	Becman Coulter, OSR6134, Kaliforniya, ABD
Kreatinin Kiti	Becman Coulter, OSR6678, Kaliforniya, ABD

5.2. Yöntem

5.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, "L-Theaninin Doksorubisin Uygulanan Sıçanlardaki Nefrotoksisite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli TÜBİTAK destekli (Proje No: 216Z025) projedir. Çalışmanın etik kurul onayı alınmıştır (Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleleri Etik Kurulu, toplantı no: 2016/08, tarih: 21/06/2016, dosya no: 2016/26; Bkz. Ek1: Etik Kurul Onay Belgesi).

Çalışmada 32 adet 2-4 aylık, 300-400 g ağırlığında, Sprague Dawley erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Cerrahi uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilip yine aynı yerde deneyler için oda sıcaklığında 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortam (gündüz 07:00- 19:00 aydınlık) sağlanarak barındırıldı. Tüm gruplara standart sıçan yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verilmiştir. Deney grupları resim 1'de gösterildiği gibi barındırılmıştır.



Resim 1. Deney hayvanlarının barındırılması

Sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı;

- 1. grup:** Kontrol grubu (n=8); uygulamaların paralelinde aynı miktarda intraperitoneal enjeksiyon (i.p.) ile serum fizyolojik uygulanan,
- 2. grup:** Sağlıklı Theanin grubu (n=8); 5 gün süresince i.p. olarak 200 mg/kg/gün theanin uygulanan,
- 3. grup:** DOX grubu (n=8); doksorubisin (20 mg/kg, tek doz, i.p.) uygulanan,
- 4. grup:** DOX + Theanin grubu (n=8); doksorubisin (20 mg/kg, tek doz, i.p.) ve 5 gün süresince i.p. olarak 200 mg/kg/gün theanin uygulanan grup.

5.2.2. Doksorubisin ve L-Theanin Uygulanması

Çalışmamızda deneysel nefrotoksisite meydana getirmek için antrasiklin ailesinden bir antineoplastik ajan olan DOX uygulandı. Ağırlıkları tartılarak belirlenen 3. ve 4. gruptaki sıçanlara deneyin başlatıldığı ilk gün tek doz olarak 20 mg/kg serum fizyolojikte çözülmüş DOX i.p. olarak verildi (Resim 2). Çalışmamız

kapsamında doksorubisin tercih edilme sebebi, kanser kemoterapisinde sıklıkla kullanılması ve böbrek dokusuna da önemli toksik etkilerinin olmasıdır.



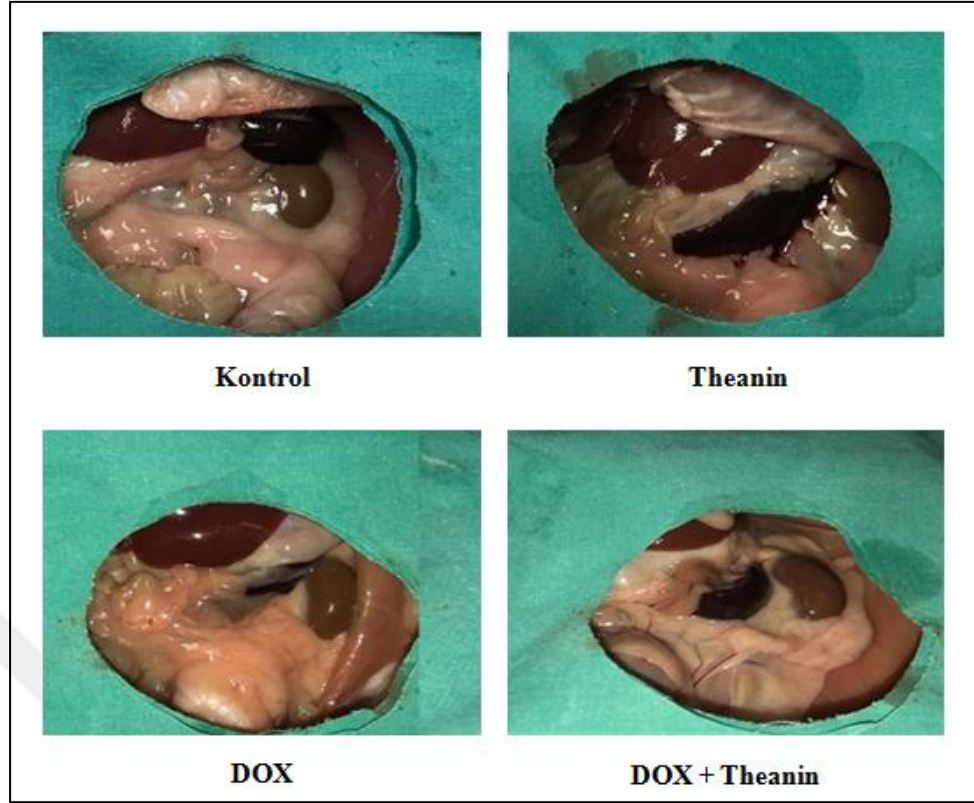
Resim 2. Deney hayvanlarına DOX uygulaması

Böbrek dokusu üzerine etkilerini araştırdığımız L-theanin, serum fizyolojikte çözülerek, DOX uygulaması ile aynı zamanda uygulanmaya başlanmış, 5 gün süresince 200 mg/kg/gün dozunda i.p. olarak verilmiştir.

5.2.3. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Uygulamanın 6. gününde sıçanlara ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) i.p. olarak uygulandıktan sonra anestezi altında etik yönergelere uygun şekilde dekapite edilerek kan örnekleri, böbrek dokusu ve diğer dokuları alınmıştır. Grupların sol Böbrek dokularının bir kısmı histolojik ve patolojik çalışmalar için formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Antikoagülsüz tüplere alınan kanlar, 3000 rpm'de 10 dk. . santrifüj edilerek serum numuneleri elde edildi. EDTA'lı tüplere alınan kanlar 1000 g de 15 dk. . santrifüj edilerek plazma elde edildi. Serum BUN ve kreatinin seviyeleri aynı gün çalışıldı. Kitler ile çalışılacak biyokimyasal parametreler için kan (serum veya plazma) ve doku numuneleri -80 °C de saklandı. Ancak glutatyon tayini için kullanılacak numuneler kit protokolüne uygun olarak deproteinize edildikten sonra -20 °C'de saklandı.

Çalışmamız kapsamında 6.günde deney hayvanlarından alınan böbrek dokularının görünümü Resim 3'de gösterilmiştir.



Resim 3. Deney gruplarının böbrek dokularının alınmadan önceki görünümü

5.2.4. BUN ve Kreatinin Parametrelerinin Belirlenmesi

BUN ve Kreatinin değerleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi, Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nda Becman Coulter Otoanlizör (Kaliforniya, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Sıçanlardan alınan serum numunelerinde orijinal Becman Coulter kitleri kullanılarak kolorimetrik olarak ölçüldü. Sonuçlar mg/dL cinsinden verildi.

5.2.5. Doku Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Araştırılacak parametrelerin, kit protokollerine göre farklı yöntemlerle elde edilen böbrek dokusu homojenatlarında Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı (95). Bu yöntem fosforik asitli ortamda Coomassie Brilliant Blue G250'nin proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbanı vermesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

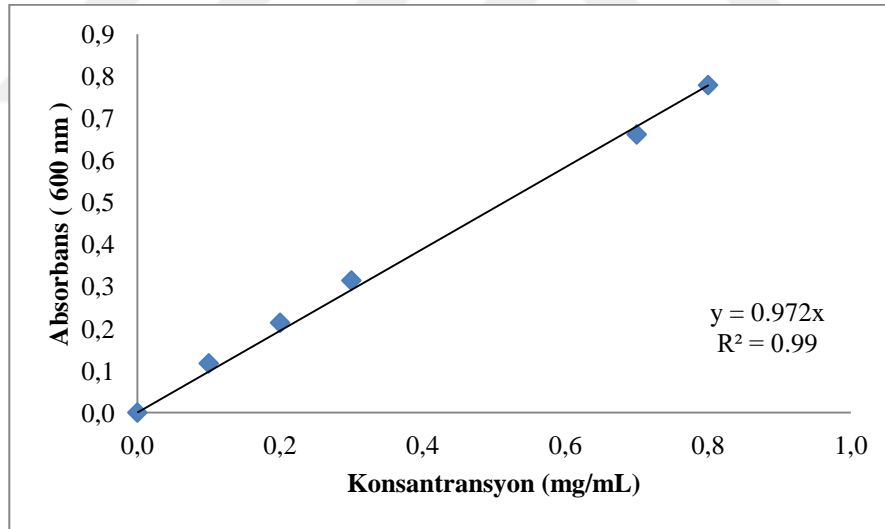
1. Bradford Reaktifi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 5 mL % 95'lik etanolde çözüldü, üzerine 10 mL % 85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2. Standart Çözeltiler: Albümin (BSA:Bovin serum albumin) standartları 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 mg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlandı.

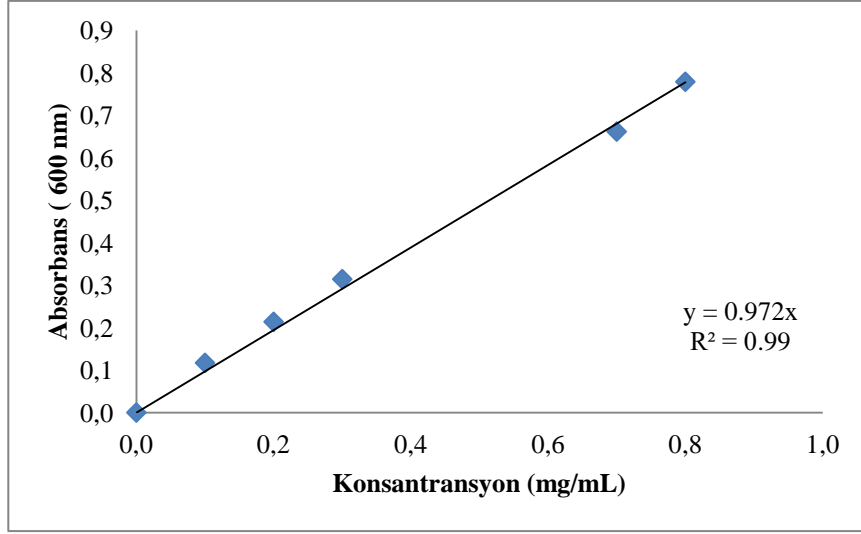
Deneyin Yapılışı:

Eluatlardaki protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 100 µL Bradford Reaktifi ve 10 µL numune alındı. Bu miktarlar mikropalakaya yüklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı. Mikropalaka okuyucu ile 600 nm'de absorbanslar okundu. Protein konsantrasyonları mg/mL olarak hesaplandı.

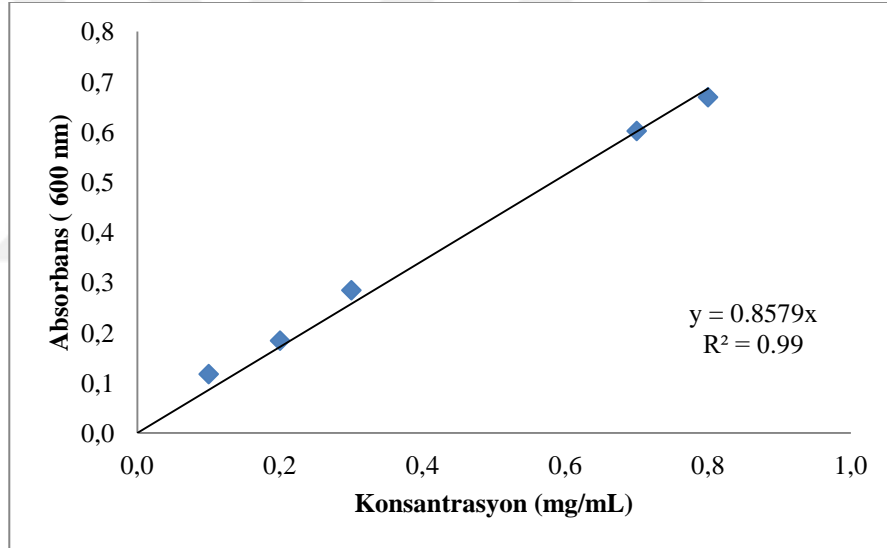
Her doku homojenatında ayrı ayrı protein tayini yapıldı. Standart grafikleri Şekil 12-15'lerde gösterilmektedir.



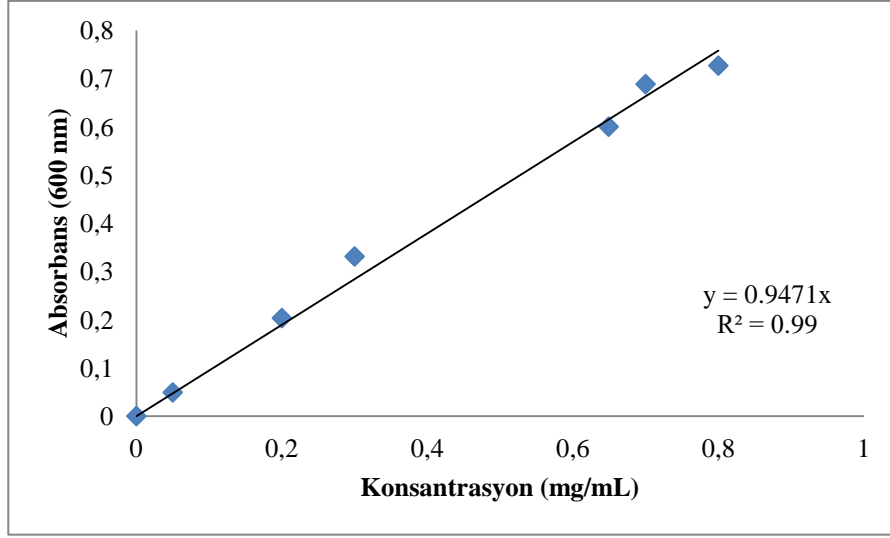
Şekil 12. Doku MDA düzeyi için protein standart grafiği



Şekil 13. Doku GGT1, Kaspaz-3, NF-κB düzeyi için protein standart grafiği



Şekil 14. Doku GPx aktivitesi için protein standart grafiği



Şekil 15. Doku GR ve GST aktiviteleri için protein standart grafiği

5.2.6. Histopatolojik İncelemeler

5.2.6.1. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması ve Kesitlerin Alınması

Dokuların takip, kesit alma ve boyama işlemlerinin tümü KTÜ Tıp Fakültesi Patoloji ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Çalışma sonunda gruplara ait tüm ratların (deney ve kontrol gruplarına ait) böbrek dokularının yaklaşık aynı kısımlarından alınan doku örnekleri histopatolojik değerlendirme yapılması için % 10'luk nötral formaldehit solüsyonu içinde 48 saat tespit edildi. Dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Xylen'de şeffaflaştırıldı ve parafinde bloklandı. Hazırlanan parafin bloklar mikrotom (Leica RM2255, Japonya) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesit alınan dokular lam üzerine alındıktan sonra H&E boyaması için zembile yerleştirildi. Örnek 1 saat 58 °C'de etüvde bekletildi parafin eridikten sonra H&E ile boyandı. Genel histopatolojik yapının değerlendirilmesi için H&E ile boyandı.

Gruplara ait böbrek dokularının preparatlarının değerlendirilmesinde Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japonya) mikroskop kullanıldı. Elde edilen bulgular ışık mikroskopa adapte kamera ataçmanı (Olympus DP71; Olympus, Tokyo, Japonya) ile farklı büyütmelelerde fotoğraflandı.

5.2.6.2. Histopatolojik İşlemler

Histopatolojik incelemeler alanında uzman histolog ve patolog tarafından farklı parametrelerin değerlendirilmesiyle 2 farklı yöntemle gerçekleştirildi.

KTÜ Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilen incelemede, bütün preparatlar tedavi gruplarından haberdar olmayan bir patolog tarafından değerlendirildi. Böbrek hasarı; kesitlerde saptanan fokal glomerüler nekroz, Bowman kapsül dilatasyonu, tübüler epitelyal dejenerasyon, tübüler epitelyal nekroz, tübüler dilatasyon, intertisyal inflamatuvar infiltrasyon ve konjesyona göre aşağıdaki skalaya uygun olarak skorlandı (96).

0= hasar yok;

1= (<25% hasar) fokal, hafif değişiklikler;

2= (25–50% hasar) multifokal, belirgin değişiklikler;

3= (50<% hasar) yaygın belirgin değişiklikler.

KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında alanında uzman histolog tarafından da ayrıca incelemeler gerçekleştirildi. Bu kapsamda böbrek dokularının değerlendirilmesinde; korteks ve dış medüller alan esas alındı. Skorlama için preparatlar X400 büyütmede 10 farklı alan gözden geçirilerek değerlendirildi. Böbrek kesitleri Bowman boşluğunda dilatasyon (genişleme), tubul epitel hücrelerinde vakuolizasyon, tübüll epitel hücrelerinde dejenerasyon, intratubuler hyalin birikimi ve intertubuler vazokonjesyon açısından histopatolojik olarak değerlendirildi ve 0-4 arasında derecelendirilerek skorlama gerçekleştirildi.

Skorlamada;

0= Normal böbrek (hasar yok)

1= minimal hasar (<25% hasar)

2= hafif hasar (25–50% hasar)

3= orta hasar (50–75% hasar)

4= şiddetli hasar (75<% hasar)

Her bir patolojik değişikliğin skorları ayrı ayrı hesaplanıp ortalamaları alındı ve total skor bu skorların toplanması ile hesaplandı (97).

5.2.6.3. İmmünohistokimyasal İşlemler

Alınan doku örneklerinin apoptozis değerlendirmesinde TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) tekniği kullanıldı ve her bir dokuya ait hücrelerde DNA fragmentasyonları tanımlandı. Apoptozis değerlendirilmesinde *In situ* cell death detection, POD kiti kullanıldı (Roche, 11684817910, Berlin, Almanya). Epitel hücrelerinin renklendirilmesinde 3,3'-diaminobenzidine (DAB) içeren kit (Sigma, 11718096001, MO, ABD) kullanıldı. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış kahverengi nükleuslu hücreler TUNEL (+) hücreler (apoptotik hücre) olarak tanımlandı. Her dokuda 400X büyütmede 5 farklı alanda toplam 100 hücre (glomeruler ve tubuler hücreler) Analysis 5 Research programı (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Almanya) kullanılarak sayıldı. Apoptotik ve normal hücreler kaydedildi ve apoptotik hücre yüzdesi Apoptotik index (A.İ.) olarak hesaplandı (98). İmmünohistokimyasal işlemlerin ölçümü KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji laboratuvarındaki Olympus DP 71 (Olympus, Tokyo, Japan) kameralı ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Tokyo, Japonya) incelenerek yapıldı.

TUNEL Boyama:

TUNEL tekniği için *In situ* cell death detection, POD kiti kullanıldı (Roche, 11684817910, Berlin, Almanya).

Lam üzerine alınan 5 µm'lik kesitler 1 saat 60 °C'ye ayarlanan etüvde bekletildikten sonra aşağıdaki işlemlerden geçirildi (Tablo 4).

Tablo 4. TUNEL yöntemi uygulama aşamaları

İşlem No	Uygulama	İşlem No	Uygulama
1.	Oda sıcaklığında 3 x 5 dk.	14.	100 µL konverter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde kapladı ve 37 °C'lik etüvde 30 dk. inkübasyon.
2.	inkübasyon		
3.	% 100 etanol 2 x 5 dk.		
4.	% 95 etanol 2 x 5 dk.		
5.	% 70 etanol 2 x 5 dk. Distile su ile yıkama	15.	PBS' de 3 x 5 dk. yıkama
6.	Oda sıcaklığında 20 µg/mL proteinaz K ile 15 dk. muamele	16.	100 µL DAP ile dk. karanlıkta oda sıcaklığında bekleme
7.	PBS tamponuyla yıkama	17.	Distile suda 1 x 5 dk. yıkama
8.	% 3 H ₂ O ₂ 'de 15 dk.	18.	Hematoksilen-Eozin ile 15 sn boyama ve çeşme suyu ile yıkama
9.	Distile su ile yıkama		
10.	PBS' de 2 x 5 dk.		
11.	Oda ısısında Large Volume UV (ultraviyole ışık) blok 10 dk.	19.	% 70 etanol 2 x 5 dk.
12.	75 µg Terminal deoksinuukleotidil transferaz (TdT) ve 50 µL TdT/dUTP karışımı ile dokular kaplandı, 37 °C'lik etüvde 1.5 saat nemli ortamda bekletildi.	20.	% 95 etanol 2 x 5 dk.
13.	PBS ile yıkama yapıldı	21.	% 100 etanol 2 x 5 dk.
		22.	Ksilen 2 x 5 dk.
		23.	Kurutulma
		24.	Kapatma
		23.	Kurutulma
		24.	Kapatma

5.2.7. Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi

Apoptoz belirteci olarak değerlendirilen kaspaz-3 seviyeleri ticari olarak alınan Kaspaz-3 ELISA kiti (Elabscience, Ürün no: E-EL-R0160, Teksas, ABD) kullanılarak belirlendi. Plazma ve doku homojenatında numune hazırlama ve uygulama yöntemi ticari kitle belirtilen şekilde yapıldı. Çalışmada % CV 3.52 (n=8) olarak belirlendi. Standart grafik çizilerek, kaspaz-3 düzeyleri belirlendi.

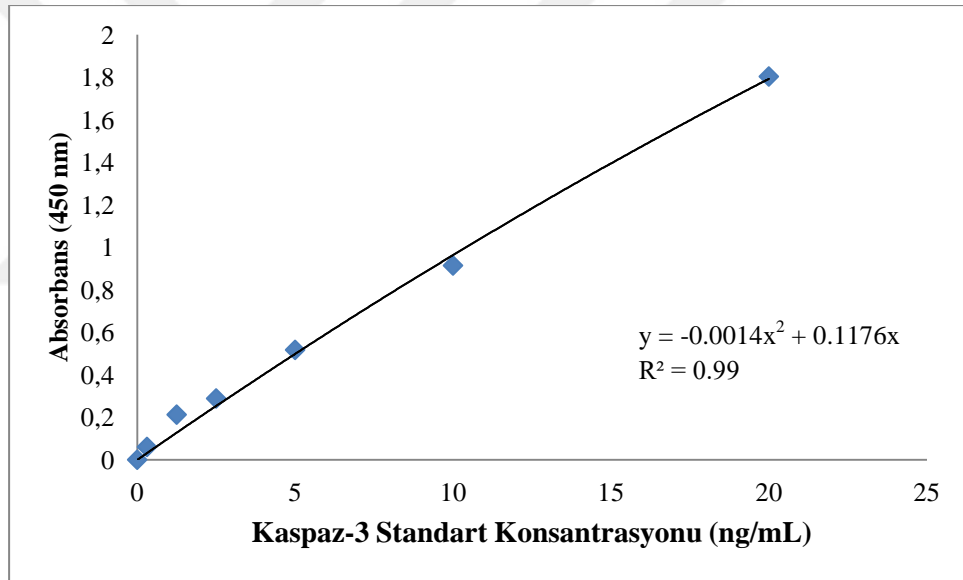
5.2.7.1. Plazma Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi

Deneyin Yapılışı:

1. Sıçanlardan alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere aktarıldı. Sonra 1000 g'de +4 °C'de 15 dk. santrifüj edilerek -80 °C'de çalışma gününe kadar protokole uygun şekilde muhafaza edildi.

2. Numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 450 nm'de mikropalaka okuyucusunda absorbansları okundu.

3. Standart grafik (Şekil 16) yardımıyla ng/mL birimi ile plazma kaspaz-3 seviyeleri belirlendi.



Şekil 16. Kaspaz-3 seviyesi belirlenmesinde kullanılan standart grafik

5.2.7.2. Doku Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi

Kullanılan Çözeltiler:

1. Homojenizasyon tamponu (1 mM EDTA içeren 50 mM MES, pH: 7.0): 10.66 g MES tartılarak bir miktar deiyonize suda çözüldü, üzerine 0.372 g EDTA eklenerek 900 mL saf suda çözüldü ve pH: 7.00'ye ayarlanarak son hacim saf suyla 1 L'ye tamamlandı.

Homojenat Hazırlama:

1. 100 mg doku 1 mL'lik homojenizasyon tamponuna aktarıldı.
2. Dokular 30 s süreyle, buz küveti içerisinde, soğuk ortamda, homojenizatör aracılığıyla 5000 rpm'de homojenize edildi.
3. 50000 g'de, 5 dk. , +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

Deneyin Yapılışı:

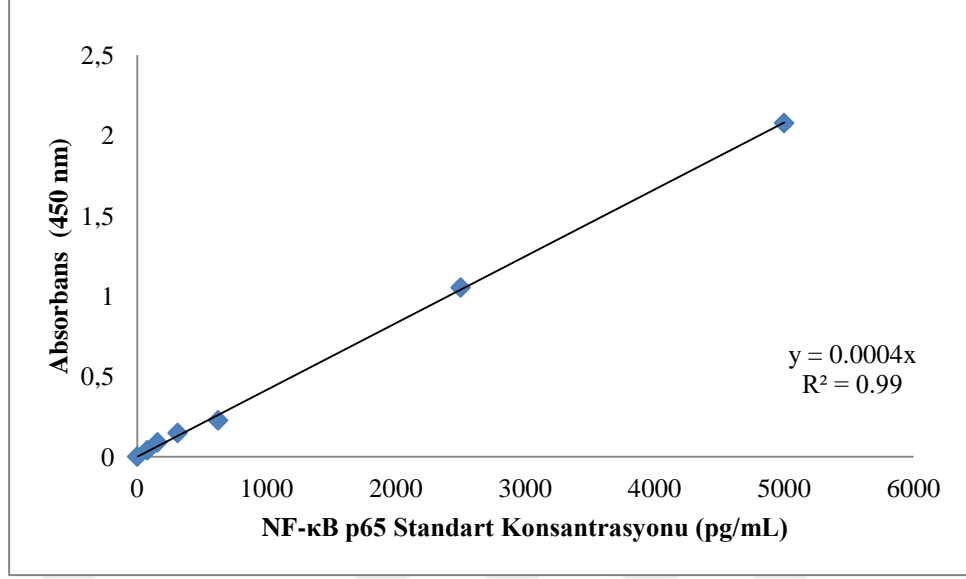
1. Kaspaz-3 ölçümü için hazırlanan süpernatant numuneler ve kitte mevcut olan reaktifler mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 450 nm'de mikropalaka okuyucusunda absorbansları okundu.
2. Standart grafik (Şekil 17) yardımı ile sonuçlar ng/mL birimi ile hesaplandı. Ancak doku kaspaz-3 seviyesi doku homojenatı protein seviyeleri gözönüne alınarak ng kaspaz-3/mg protein şeklinde verildi.

5.2.8. NF-κB p65 Seviyelerinin Belirlenmesi

İnflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen NF-κB p65 seviyesi, ticari NF-κB p65 ELISA kiti (Elabscience, Ürün no: E-EL-R0674, Teksas, ABD) kullanılarak belirlendi. Plazma ve doku homojenatında numune hazırlama ve uygulama yöntemi ticari kitte belirtilen şekilde yapıldı. Çalışmada % CV 6.52 (n=8) olarak belirlendi.

5.2.8.1. Plazma NF-κB p65 Seviyelerinin Belirlenmesi

1. Sıçanlardan alınan kanlar EDTA'lı tüplere aktarıldı. Sonra 1000 g'de 4 °C'de 15 dk. santrifüj edilerek -80 °C'de çalışma gününe kadar protokole uygun şekilde muhafaza edildi.
2. Numuneler ve kitte mevcut olan reaktifler mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 450 nm'de mikropalaka okuyucusunda absorbansları okundu.
3. Plazma NF-κB p65 seviyesi standart grafik (Şekil 17) yardımı ile hesaplanarak pg/mL birimi ile verildi.



Şekil 17. NF-κB p65 seviyesi tayininde kullanılan standart grafik

5.2.8.2. Doku NF-κB p65 Seviyelerinin Belirlenmesi

Kullanılan Çözeltiler:

1. Homojenizasyon tamponu (1 mM EDTA içeren 50 mM MES, pH: 7.0): 10.66 g MES tartılarak bir miktar deiyonize suda çözüldü, üzerine 0.372 g EDTA eklenerek 900 mL saf suda çözüldü, pH 7.0'ye ayarlanarak son hacim saf suyla 1L'ye tamamlandı.

Homojenat Hazırlama:

1. 100 mg doku 1 mL lik homojenizasyon tamponuna aktarıldı.
2. Dokular 30 s süreyle, buz küveti içerisinde, soğuk ortamda, homojenizatör aracılığıyla 5000 rpm'de homojenize edildi.
3. 50000 g'de, 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

Deneyin Yapılışı:

1. Homojenizasyon işlemi ile hazırlanan süpernatant numuneler ve kitte mevcut olan reaktifler mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 450 nm'de mikropalaka okuyucusunda absorbansları okundu.

2. Standart grafik (Şekil 18) yardımı ile sonuçlar pg/mL birimi ile hesaplandı. Ancak doku NF-κB p65 seviyesi doku homojenatı protein seviyeleri göz önüne alınarak pg NF-κB p65/mg protein şeklinde verildi.

5.2.9. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesi, TBARS (Tiyobarbiturik asit reaktif maddesi) yöntemi ile belirlendi. Yöntem MDA'nın asidik ortamda tiyobarbutirik asit (TBA) ile renkli şelat oluşturması ve oluşan şelatın spektrofotometrik yöntemle 512 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (99).

5.2.9.1. Plazma MDA Seviyeleri

Plazma MDA seviyelerinin ölçümü Yagi yöntemine göre yapıldı (99).

Kullanılan Çözeltiler:

1. Sülfürik asit (0.0084 NH_2SO_4) çözeltisi: 342 μL H_2SO_4 bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacim deiyonize su ile 150 mL'ye tamamlandı.

2. Fosfotungstik asit (% 10' luk, $\text{H}_3(\text{W}_3\text{O}_{10})_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) çözeltisi: 2.5 g fosfotungstik asit 25 mL deiyonize suda çözüldü.

3. TBA çözeltisi (0.1 M): 0.335 g TBA tartılarak, 25 mL deiyonize suda 10 dk. ısıtılarak manyetik bar aracılığıyla karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Ardından üzerine 25 mL glasiyel asetik asit eklendi.

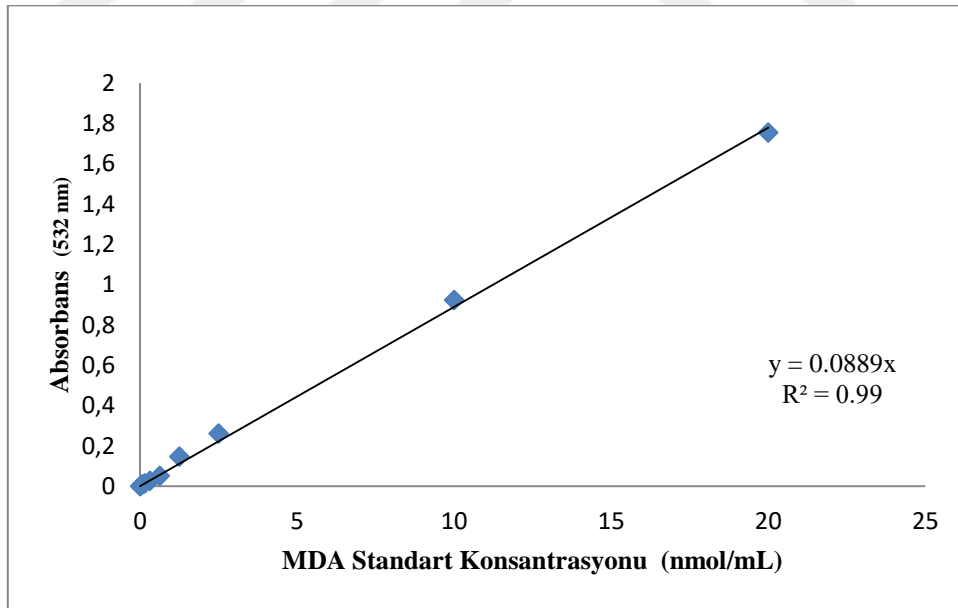
4. Standart çözeltiler: 82.5 μL 1,1,3,3-tetrametoksipropan, 0.01 M 50 mL HCl çözeltisine ilave edildi. Çözelti 50 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu hazırlanan ana stok çözeltinin konsantrasyonu 10 $\mu\text{mol/mL}$ 'dir. Hazırlanan ana stok çözeltilerden sırasıyla 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Deney, Tablo 5 'de belirtilen pipetlemelere ve uygulamalara göre yapılarak 532 nm'de spektrofotometrik olarak okutuldu. Standart grafik (Şekil 18) yardımıyla plazma MDA seviyeleri belirlenerek sonuçlar nmol/mL birimi ile verildi. Çalışmada % CV 6.87 (n=8) olarak belirlendi.

Tablo 5. Plazma MDA seviyesi tayini işlem basamakları

Reaktifler	Numune (µL)	Standart (µL)
Numune	150	150
H ₂ SO ₄	1500	1500
Fosfotungstik asit	150	150
Vorteksleme, 5 dakika bekleme, 4000 rpm’de 10 dk. santrifüjleme, üst fazın atılması		
Deiyonize Su	2000	2000
Çökelek vorteksenerek çözüldü.		
TBA	500	500
1 saat 100 °C’de etüvde inkübasyon Oda sıcaklığında 3000 rpm’de 10 dk. santrifüjleme 300 µL üst faz mikropialalara yüklenerek 532 nm’de okuma		



Şekil 18. MDA seviyeleri belirlenmesinde kullanılan standart grafik

5.2.9.2. Doku MDA Seviyeleri

MDA tayini Uchiyama ve Mihara yöntemi modifiye edilerek yapıldı (100).

Kullanılan Çözeltiler:

1. PBS (0.01 M, pH:7.4): 1.08 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.02 g NaCl ve 0.18 g KCl 900 mL saf suda çözüldü, pH 7.40'a ayarlanıp hacim 1 L'ye tamamlandı.

2. Homojenizasyon tamponu (0.5 mL Triton X-100 içeren % 1.15'lik KCl çözeltisi): 1.15 g KCl hassas terazide tartıldı, üzerine 0.5 mL Triton X-100 eklendi ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

3. % 1'lik H_3PO_4 çözeltisi: Bir deiyonize su üzerine 11.77 mL % 85'lik H_3PO_4 alındı ve son hacim saf suyla 1 L'ye tamamlandı.

4. TBA çözeltisi (0.1 M): 0.335 g TBA tartıldı ve 25 mL deiyonize su eklendi. 10 dk. karıştırıcıda ısıtılarak manyetik bar kullanılarak çözünmesi sağlandı. Ardından üzerine 25 mL glasiyel asetik asit eklendi.

5. Standart (1,1,3,3-tetrametoksipropan) çözeltiler: Hazırlanan ana stoktan sırasıyla 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Homojenat Hazırlama:

1. Böbrek dokusu buz kalıpları üzerinde kesildi ve hemolizli numunelerin sonuçları etkilemesinden dolayı soğuk PBS (0.01 M, pH:7.4) ile kan hücreleri ve pıhtılar temizlenerek hassas terazide yaklaşık 50-100 mg arası tartıldı.

2. 500 μL soğuk homojenizasyon tamponu konuldu.

3. Soğuk ortamda 30 s süresince homojenizatörle 5000 rpm'de homojenize edildi.

4. Homojenizat 4 °C'de, 3000 rpm'de, 10 dk. santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısım alındı.

Deneyin Yapılışı:

Deneyin yapılışı Tablo 6'da özetlenmektedir.

Tablo 6. Doku MDA seviyesi tayini işlem basamakları

Reaktifler	Eklenen Miktar (mL)
Süpernatant	0.25
H ₃ PO ₄	1.5
TBA	0.5

Vorteksleme, 100 °C’de etüvde inkübasyon,
Oda sıcaklığında soğuması için bekleme
4000 rpm’de 10 dk. santrifüjleme
300 µL üst faz mikropalakalara yüklenerek 532 nm’de okuma

Standart grafik (Şekil 19) yardımı ile sonuçlar nmol/mL birimi ile hesaplandı. Ancak doku MDA seviyesi, doku homojenat süpernatanı protein seviyeleri göz önüne alınarak nmol TBARS/mg protein şeklinde verildi. Çalışmada % CV 6.1 (n=8) olarak belirlendi.

5.2.10. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku ve plazmada GSH ve GSSG seviyesi tayini ticari glutasyon kiti (Cayman, item no:703002, Michigan, ABD) kullanılarak, Ellman reaktifi ile enzimatik yöntem esasına dayanılarak belirlendi. Plazma ve doku homojenatlarında numune hazırlama ve uygulama yöntemi ticari kitte belirtilen şekilde yapıldı.

5.2.10.1. Plazma GSH ve GSSG Seviyelerinin Belirlenmesi

Deney hayvanlarından EDTA’lı tüplere alınan kan örneklerinden elde edilen plazmada aynı gün deproteinizasyon işlemi uygulandı.

Kullanılan Çözeltiler:

1. Metafosforik asit (MPA) çözeltisi (% 10): 5 g MPA 50 mL deiyonize suda çözüldü.
2. TEAM çözeltisi (4 M): 531 µL trietanolamin 469 µL deiyonize suda çözüldü.
3. 2-Vinilpiridin (1 M): 108 µL 2-vinilpiridin 892 µL etanolde çözüldü.

Deneyin Yapılışı:

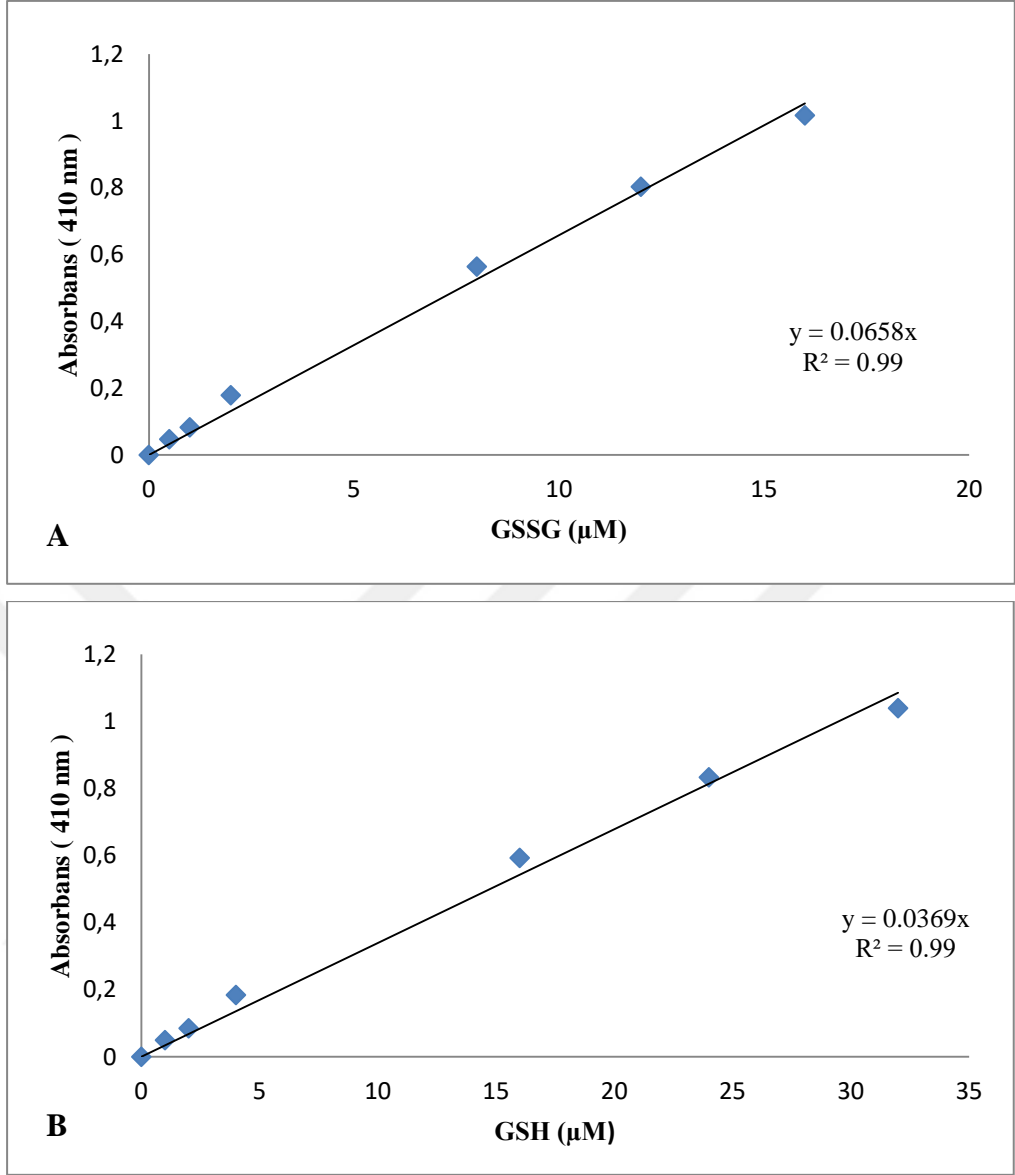
1. 150 µL plazma üzerine 150 µL % 10'luk MPA çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı. 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. 1000 g'de 10 dk. santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant deney gününe kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2. Deney günü 200 µL süpernatant alınıp üzerine 4 M'lık 10 µL TEAM reaktifi eklendi ve hemen karıştırıldı. Deproteinize hale getirilmiş olan numuneler toplam glutatyon (GSH ve GSSG) tayini için hazırlanmış oldu.

3. GSSG tayini için 2. deney aşamasından sonra numuneler 2-vinilpiridin ile türevlendirildi. 100 µL deproteinize numuneye 1 µL 2-vinilpiridin eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 60 dk. inkübasyona bırakıldı. Numunelere uygulanan her işlem standartlara da uygulandı.

4. Toplam GSH ve GSSG tayini için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 410 nm'de mikropalaka okuyucusunda absorbansları okundu.

5. Standart grafik (Şekil 19) yardımıyla toplam GSH ve GSSG seviyeleri belirlendi. Plazma toplam GSSG değerlerinden GSH değerleri çıkarılarak yükseltgenmiş GSSG değerleri hesaplandı.



Şekil 19. GSSG ve GSH seviyeleri belirlenmesinde kullanılan standart grafikler (sırasıyla A ve B)

5.2.10.2. Doku GSH ve GSSG Seviyelerinin Belirlenmesi

Kullanılan Çözeltiler:

1. Homojenizasyon tamponu: (1 mM EDTA içeren 50 mM MES, pH: 7.0): 1 mM EDTA içeren 50 mM MES, pH: 7.0; 10.66 g MES tartılarak bir miktar deiyonize suda çözüldü, üzerine 0.372 g EDTA eklenerek 900 mL saf suda çözüldü ve pH: 7.0'ye ayarlanarak son hacim deiyonize suyla 1 L'ye tamamlandı.

2. TEAM, MPA ve 2-vinilpiridin çözeltileri plazma GSH ve GSSG seviyelerinin belirlenmesi başlığında anlatıldığı gibi hazırlandı.

Deneyin yapılışı:

1. 100 mg doku 1mL'lik homojenizasyon tamponuna aktarıldı. Dokular 30 s süreyle buz küveti içerisinde (soğuk ortamda) homojenizatör aracılığıyla 5000 rpm'de homojenize edildi. 4⁰C'de, 10000 g'de, 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

2. Plazma için uygulanan deproteinizasyon ve derivazitasyon işlemi yapıldı. Toplam GSH ve GSSG tayini için numuneler hazır hale getirildi.

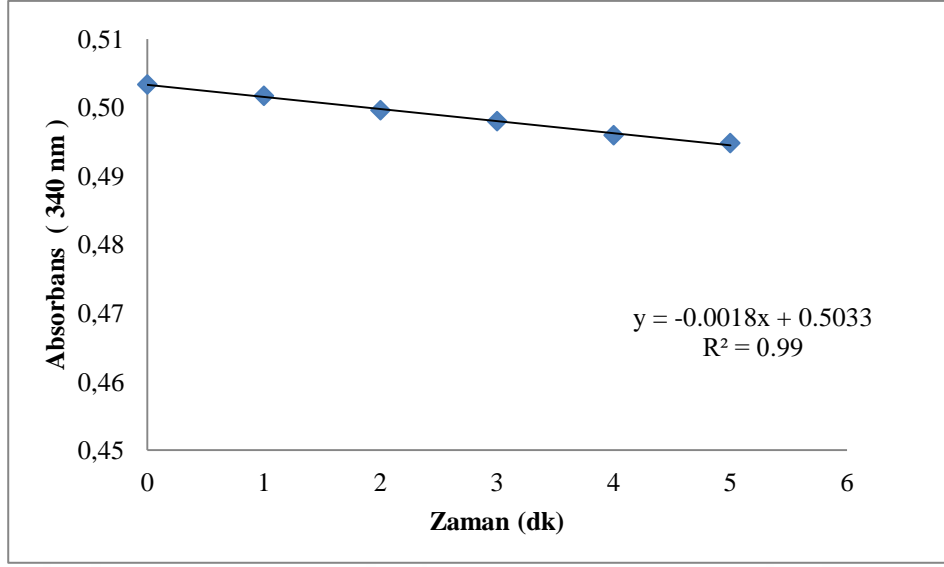
3. Kit protokolüne göre işlemler gerçekleştirildikten sonra 0. ve 30. dk.'da, 410 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı

4. Standart grafik yardımıyla toplam GSH ve GSSG seviyeleri belirlendi. Böbrek dokusu toplam GSSG değerlerinden GSH değerleri çıkarılarak GSSG ve GSH seviyeleri belirlendi.

5.2.11. Glutatyon Peroksidaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

GPx aktivitesi tayini ticari olarak alınan GPx kiti (Cayman, item no:703102, Michigan, ABD) kullanılarak belirlendi. Plazma ve doku homojenatında numune hazırlama ve uygulama yöntemi ticari kitle belirtilen şekilde yapıldı.

Doku ve plazma GPx aktivite ölçümünde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği (Şekil 20) çizilerek, GPx aktivite düzeyleri belirlendi. Ayrıca çalışmada % CV 7.4 (n=8) olarak belirlendi.



Şekil 20. GPx aktivite tayininde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği

5.2.11.1. Plazma GPx Aktivite Tayini

Deneyin Yapılışı:

1. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri +4 °C'de, 1000 g'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra plazma numuneleri pipet vasıtasıyla alınarak -80 °C'de deneylerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi.

2. Deney günü GPx ölçümü için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 340 nm'de mikropalaka okuyucusunda 5 dk. boyunca dakika başı absorbansları okundu.

3. Sonuçlar plazma için nmol/dk/ml cinsinden belirlendi

5.2.11.2. Doku GPx Aktivitesi Tayini

Kullanılan Çözeltiler:

1. Homojenizasyon tamponu (1 mM EDTA içeren 50 mM MES, pH: 7.0): Bakınız; glutatyon ölçümü homojenizasyon tamponu.

Deneyin Yapılışı:

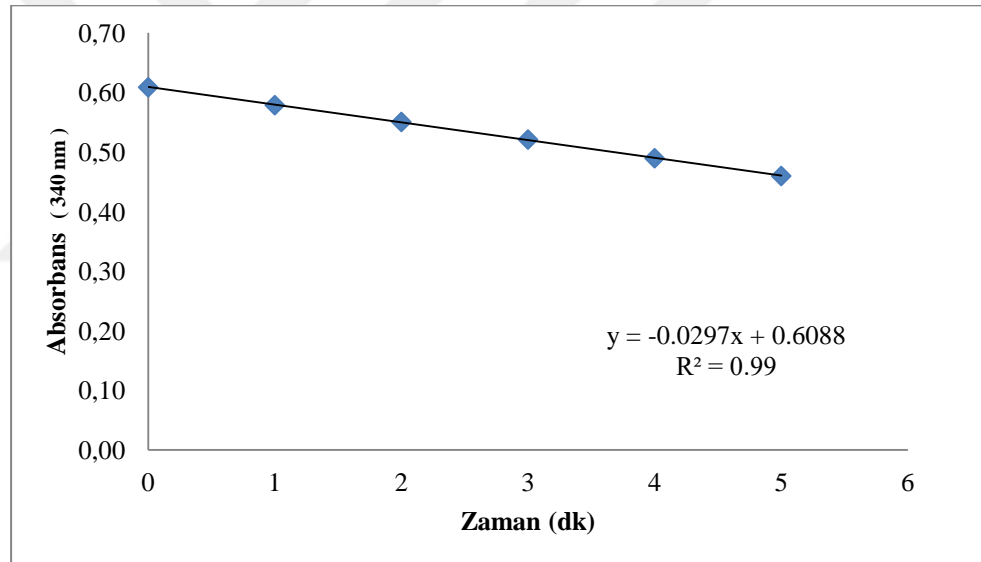
1. 100 mg doku 1 mL'lik homojenizasyon tamponuna aktarıldı. Dokular 30 s süreyle, buz küveti içerisinde (soğuk ortamda) homojenizatör aracılığıyla 5000 rpm'de homojenize edildi. 10000 g'de, +4 °C'de, 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

2. GPx ölçümü için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 340 nm'de mikropalaka okuyucusunda 5 dk. boyunca dakika başı absorbansları okundu.

3. Sonuçlar böbrek dokusunda nmol/dk/mg protein cinsinden verildi.

5.2.12. Glutasyon Redüktaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

GR aktivitesi ticari olarak alınan GR kiti (Cayman, item no: 703202, Michigan, ABD) kullanılarak belirlendi. Plazma ve doku homojenatında numune hazırlama ve uygulama yöntemi ticari kitte belirtilen şekilde yapıldı. Doku ve plazma GR aktivite tayininde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği (Şekil 21) çizilerek, GR aktivite düzeyleri belirlendi. Ayrıca çalışmada % CV 2.67 (n=8) olarak belirlendi.



Şekil 21. GR aktivite tayininde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği

5.2.12.1. Plazma GR Aktivitesi Tayini

Deneyin Yapılışı:

1. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri +4 °C'de, 1.000 g'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra plazma numuneleri pipet vasıtasıyla alınarak -80 °C'de deneylerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi.

2. GR ölçümü için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikroplakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 340 nm'de mikrolaka okuyucusunda 5 dk. boyunca dakika başı absorbansları okundu.

3. Sonuçlar plazma için nmol/dk/mL cinsinden belirlendi

5.2.12.2. Doku GR Aktivitesi Tayini

Kullanılan Çözeltiler:

1. Homojenizasyon tamponu (1 mM EDTA içeren 50 mM MES, pH: 7.0):
Bakınız: Glutasyon ölçümü homojenizasyon tamponu.

Deneyin Yapılışı:

1. 100 mg doku 1mL'lik homojenizasyon tamponuna aktarıldı. Dokular 30 s süreyle, buz küveti içerisinde, soğuk ortamda, homojenizatör aracılığıyla 5000 rpm'de homojenize edildi. 10000 g'de, +4 °C'de, 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

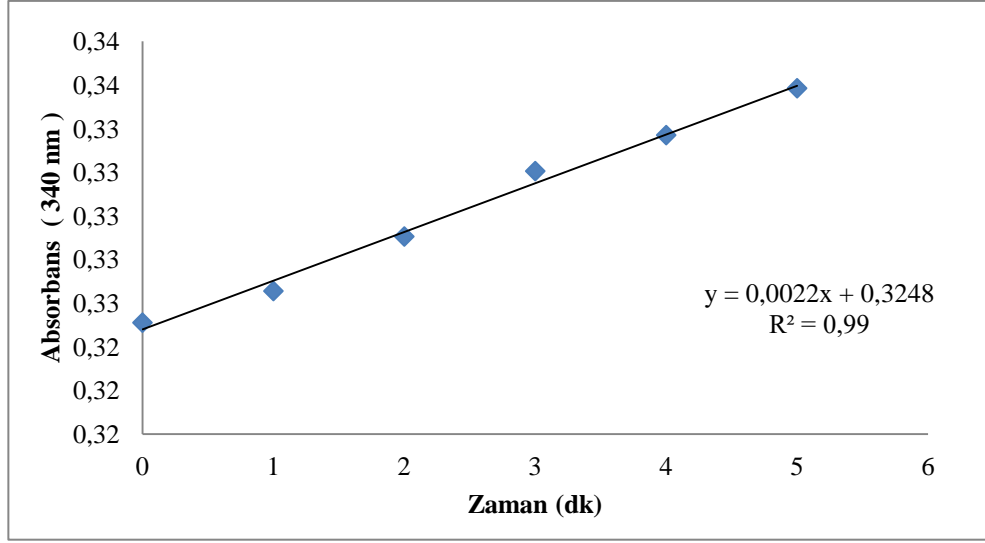
2. GR ölçümü için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikroplakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 340 nm'de mikrolaka okuyucusunda 5 dk. boyunca dakika başı absorbansları okundu.

3. Sonuçlar böbrek dokusunda nmol/dk/mg protein cinsinden verildi.

5.2.13. Glutasyon S-Transferaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

GST aktivitesi ticari olarak alınan GST kiti (Cayman, item no: 703302, Michigan, ABD) kullanılarak belirlendi. Plazma ve doku homojenatında numune hazırlama ve uygulama yöntemi ticari kitte belirtilen şekilde yapıldı.

Doku ve plazma GST aktivite ölçümünde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği (Şekil 22) çizilerek, GST aktivite düzeyleri belirlendi. Ayrıca çalışmada % CV 4.97 (n=8) olarak belirlendi.



Şekil 22. GST aktivite tayininde kullanılan pozitif kontrolün zamana karşı grafiği

5.2.13.1. Plazma GST Aktivite Tayini

Kullanılan Çözeltiler:

1. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri +4 °C'de, 1000 g'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra plazma numuneleri pipet vasıtasıyla alınarak -80 °C'de deneylerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi.

2. GST ölçümü için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 340 nm'de mikropalaka okuyucusunda 5 dk. boyunca dakika başı absorbansları okundu.

3. Sonuçlar plazma için nmol/dk/ml cinsinden belirlendi.

5.2.13.2. Doku GST Aktivite Tayini

Kullanılan Çözeltiler:

1. Homojenizasyon tamponu: 1 mM EDTA içeren 50 mM MES, pH: 7.0 (Bakınız: Glutasyon ölçümü homojenizasyon tamponu).

Deneyin Yapılışı:

1. 100 mg doku 1 mL lik homojenizasyon tamponuna aktarıldı. Dokular 30 s süreyle, buz küveti içerisinde (soğuk ortamda) homojenizatör aracılığıyla 5000 rpm'de homojenize edildi. 10000 g'de, +4 °C'de, 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

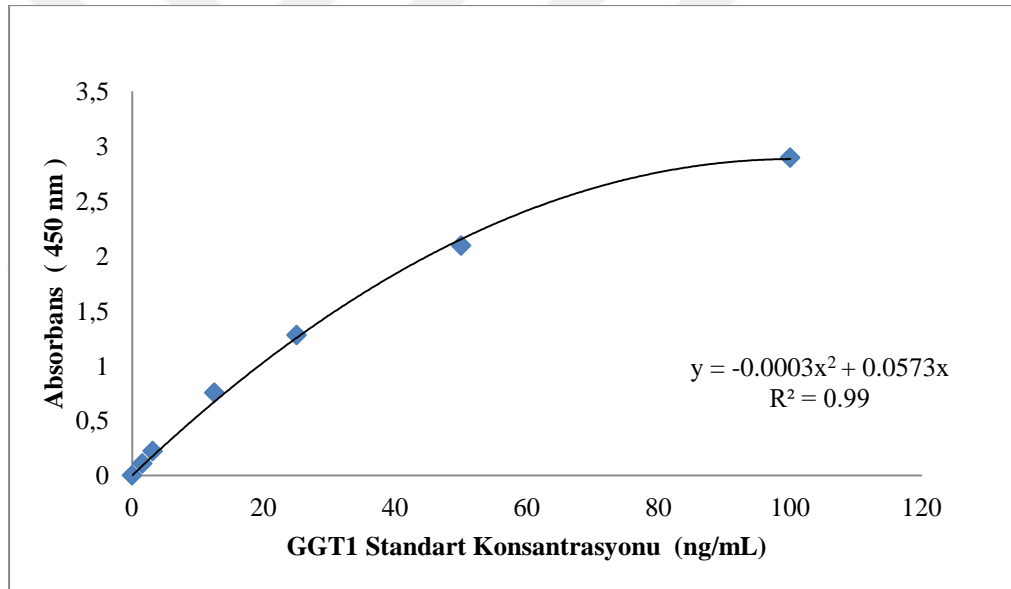
2. GST ölçümü için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 340 nm'de mikropalaka okuyucusunda 5 dk. boyunca dakika başı absorbansları okundu.

3. Sonuçlar böbrek dokusunda nmol/dk/mg protein cinsinden verildi.

5.2.14. Gama Glutamil Transpeptitaz 1 Seviyelerinin Belirlenmesi

GGT1 aktivitesi ticari olarak alınan GGT1 ELİSA kiti (Elabscience, Ürün no: E-EL-R0404, Teksas, ABD) kullanılarak belirlendi. Plazma ve doku homojenatında numune hazırlama ve uygulama yöntemi ticari kitte belirtilen şekilde yapıldı.

Plazma ve doku GGT1 seviyelerinin belirlenmesinde Şekil 23'de gösterilen standart grafik kullanıldı. Ayrıca çalışmada % CV 5.47 (n=8) olarak belirlendi.



Şekil 23. GGT1 seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

5.2.14.1. Plazma GGT1 Seviyelerinin Belirlenmesi

Deneyin Yapılışı:

1. Sıçanlardan alınan kan örnekleri EDTA lı tüplere aktarıldı. Sonra 1000 g'de +4 °C'de 15 dk. santrifüj edilerek -80 °C'de çalışma gününe kadar protokole uygun şekilde muhafaza edildi.

2. Plazma GGT1 tayini için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 450 nm'de mikropalaka okuyucusunda absorbanları okundu.

3. Sonuçlar plazma için ng/mL plazma cinsinden belirlendi.

5.2.14.2. Doku GGT1 Seviyelerinin Belirlenmesi

Kullanılan Çözeltiler:

1. Homojenizasyon tamponu: 1 mM EDTA içeren 50 mM MES, pH: 7.0 (Bakınız: Glutasyon ölçümünde kullanılan homojenizasyon tamponu.).

Deneyin Yapılışı:

1. 100 mg doku 1 mL'lik homojenizasyon tamponuna aktarıldı. Dokular 30 s süreyle, buz küveti içerisinde, soğuk ortamda, homojenizatör aracılığıyla 5000 rpm'de homojenize edildi.

2. Homojenizat 5 dk. 50.000 g'de +4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı. -80 °C'de deneylerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi.

3. GGT1 ölçümü için hazırlanan numuneler kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak mikropalakalara kit protokolüne göre sırasıyla uygulandı ve 450 nm'de mikropalaka okuyucusunda absorbanları okundu.

4. Sonuçlar böbrek dokusunda protein miktarları baz alınarak ngGGT1/mg protein birimi ile verildi.

5.2.15. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Veriler bilgisayara aktarıldı ve SPSS (IBM SPSS 24) programında istatistiksel olarak değerlendirildi. Çalışmanın sonuçlarının normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla değişkenin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi ve ikili değişken için Mann-Whitney U testi uygulandı. Normal dağılıma uymayan değişkenlerden elde edilen değerler medyan-çeyrekler arası aralık (IQR) ve % 95 güven aralığı (CI) olarak ifade edildi, p<0.05 istatistiksel anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Serum BUN ve Kreatinin Düzeyleri

Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan serum BUN ve kreatinin düzeyleri açısından theanin ve kontrol grupları arasında fark bulunamadı. DOX grubu kontrol grubuna göre yüksek düzeylere sahipti. DOX+Theanin grubunda ise DOX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük düzeyler kaydedildi ($p < 0.05$). BUN/Kreatinin oranları açısından theanin ve kontrol grupları arasında fark yokken en yüksek oranlara sahip DOX grubu kontrol grubuna göre $p = 0.001$ düzeyinde anlamlı farklılık gösterdi. DOX+Theanin grubu ise DOX grubuna göre $p = 0.002$ düzeyinde istatistiksel anlamlı farklılık gösterdi (Tablo 7). Bu sonuçlara göre DOX uygulaması sonucu yükselmiş BUN ve Kreatinin seviyeleri ile BUN/Kreatinin oranlarının oluştuğu, theanin uygulamasının bu düzeylerdeki artışlara engel olduğu yönünde bulgular elde edildi.

Tablo 7. Deney gruplarında BUN ve kreatinin seviyeleri (n=8)

	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
BUN (mg/dL)	[18.5 (4)] (16 - 20)	[17.5 (3)] (15 - 20)	[44.1 (39) ^{a,b}] (35 - 68)	[22.5 (19) ^c] (15 - 36)
Kreatinin (mg/dL)	[0.24 (0.05)] (0.23 - 0.27)	[0.25 (0.02)] (0.22 - 0.28)	[0.60 (0.34) ^{a,b}] (0.41 - 0.75)	[0.30 (0.19) ^c] (0.22 - 0.42)
BUN / Kreatinin	[72 (17)] (62 - 83)	[74 (20)] (61 - 79)	[126 (25) ^{a,b}] (105 - 141)	[87 (19) ^{a,b,c}] (75 - 94)

Sonuçlar: [Medyan (IQR)]; (% 95 CI) şeklinde verildi.

^a:Kontrol; ^b:Theanin; ^c:DOX grubuna göre Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$)

6.2. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik skorumla, semi kantitatif olarak alanında uzman patalog ve histolog tarafından farklı nefrotoksisite parametreleri değerlendirilerek iki ayrı şekilde

gerçekleştirildi. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlara göre Kontrol ve theanin grubunda bir sıçanda hafif hasar olmasına rağmen diğerlerinde herhangi bir hasar tespit edilemedi. DOX+Theanin grubunda orta ve hafif şiddetli hasar görülürken DOX grubunda şiddetli hasar bulguları gözlemlenmiştir.

Uzman patalog tarafından yapılan incelemeler nefrotoksisite bulgularının renal korteksteki yaygınlık derecesine göre yapıldı. Buna göre; tübül epitel hücrelerinde deskuamasyon, tek hücre nekrozu, tübüler atrofi, tübüler nekroz ve glomerüler nekroz bulguları değerlendirilmiştir (96). Kontrol grubunda nefrotoksisite bulguları saptanmamıştır. Sadece kontrol grubunda bulunan 3 numaralı sıçan böbreğinde interstisyumun % 10'unu ilgilendiren kronik inflamasyon mevcuttur. Theanin verilen grupta nefrotoksisite bulguları gözlemlenmemiştir. Bu gruptaki 1 numaralı sıçan böbreğinde % 10'dan daha az bir interstisyel alanı ilgilendiren tübüler nekroz bulguları mevcuttur. En şiddetli ve yaygın nefrotoksisite bulguları DOX grubunda saptanmıştır (skor 3, >% 50). Ayrıca DOX grubunun 2 ve 8 numaralı sıçan böbreğinde renal kortikal mikrokistler dikkat çekmiştir. DOX+Theanin grubunda nefrotoksisite bulgularının yaygınlığı hafif ve orta düzeylerde, % 0< >% 50 aralığında, DOX grubuna oranla daha hafif bulgular kaydedilmiştir.

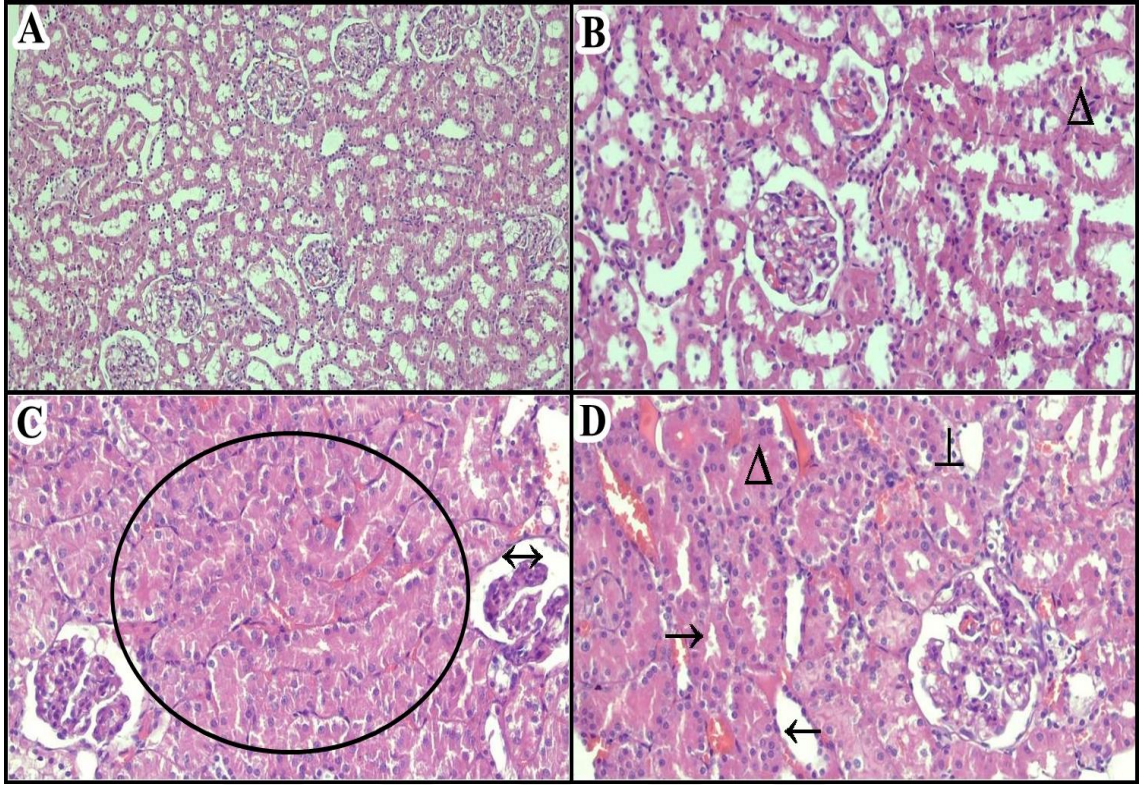
Grupların uzman patalog tarafından yapılan histopatolojik skorlanması Tablo 8'de, bu skorlamanın yapıldığı böbrek dokularına ait fotomikrograflar Resim 4'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Gruplardaki nefrotoksisite bulgularının skorlanması

No	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
1	0	1	3	2
2	0	0	3*	2
3	1	0	3	1
4	0	0	3	2
5	0	0	3	2
6	0	0	3	1
7	0	0	3	2
8	0	0	3*	2

Skorlama; Yok:0, hafif:1 (<% 25), orta:2 (% 25 - % 50), şiddetli:3 (>% 50)

*: Kortikal mikrokist bulguları



Resim 4. Grupların böbrek dokularına ait fotomikrograf görüntüleri ve patolojik değerlendirmeler (H&E, 400X)

A:Kontrol grubuna ait Skor 0 olan bir böbrek dokusuna ait fotomikrograf; Patolojik bulgu içermeyen renal kortikal alan. İnterstisyumda tübüller sırtısırta duruyor, lümenleri açık, epitelleri intakt.

B:Theanin grubuna ait skor 1 olan bir böbrek dokusuna ait fotomikrograf; Δ =İnterstisyumda sağ tarafında hafif deskuamasyon bulgusu.

C:DOX grubuna ait skor 3 olan (% 50<) bir böbrek dokusuna ait fotomikrograf; Kortikal alanda çok yaygın akut tübüller hasar bulguları. \circ = Tübül epitellerinde deskuamasyon, tek hücre nekrozları, tübüller atrofiler, dökülme. \leftrightarrow =Glomerüler nekroz bulguları.

D: DOX+Theanin grubuna ait skor 2 olan (% 25<) bir böbrek dokusuna ait fotomikrograf; Δ = Kortikal alanın yarısına yakın alanda interstisyumda tübüller epitellerinde deskuamasyon. \perp = Tübüler atrofi, \rightarrow = Sağlıklı proksimal tübül, \leftarrow = Sağlıklı distal tübül.

Ayrıca gruplarda uzman histolog tarafından yapılan Bowman boşluğunda dilatasyon, tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon, dejenereasyon, intratübüler hiyalin birikimi ve vazokonjesyon parametreleri mikroskopik olarak incelenmiş ve skorlanmıştır (97).

Gruplara ait böbrek preparatlarının değerlendirildiğinde kontrol grubunda normal böbrek tubul ve glomerul yapısı izlenmiştir. Nadiren 1-2 tubul epitel hücrelerinde hafif derecede vakuolizasyon gözlenmiştir (Resim 5). Theanin grubunda, normal böbrek histolojik yapısı izlendi. Fakat bir böbrek dokusunda hafif şiddette, yer

yer tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon, dejenerasyon ve intertübuler vazokonjesyon gözlemlendi (Resim 6). DOX grubunda, orta ve şiddetli derecede tüm gruplarda Bowman boşluğunda dilatasyon, tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon, tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve intertübüler vazokonjesyon izlendi. Ayrıca intertübuler alanda orta ve şiddetli derecede hiyalin birikimi izlendi (Resim 7). DOX+Theanin grubunda intertübüler hiyalin birikimi ve vazokonjesyon DOX grubuna nispeten belirgin olarak daha hafif ve yer yer orta şiddette tespit edilmiştir. Ayrıca tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve dejenerasyon daha hafif olarak kaydedilmiştir (Resim 8).

Grupların böbrek dokularındaki morfolojik değişim skorları Tablo 9’da, ayrıntılı olarak Tablo 10-14’lerde verilmiştir. Bu skorlamanın yapıldığı böbrek dokularına ait hematoksilen & eozin boyalı fotomikrograflar ayrıntılı olarak Resim 5-8’lerde gösterilmiştir.

Tablo 9. Grupların böbrek dokularındaki morfolojik değişim skorları (n=8)

Morfolojik Değişiklik	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
Bowman boşluğunda dilatasyon	1	1	2	2
Tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon	1	1	3	2
Tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon	1	1	3	2
İnatübüler hiyalin birikimi	0	0	3	1
Vazokonjesyon	0	0	3	1

Skor= 0: Yok, 1: minimal (<% 25), 2: hafif (% 25 - % 50), 3: orta (% 50-% 75), 4: şiddetli (>% 75)

Tablo 10. Sıçan numarasına göre bowman boşluğunda dilatasyon skorları

No	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
1	0	1	3	1
2	1	1	2	2
3	2	1	2	2
4	1	1	2	2
5	1	1	2	1
6	0	1	1	2
7	1	2	1	2
8	1	0	2	2

Skor= 0: Yok, 1: minimal (<% 25), 2: hafif (% 25 - % 50), 3: orta (% 50-% 75), 4: şiddetli (>% 75)

Tablo 11. Sıçan numarasına göre tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon skorları

No	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
1	1	2	4	2
2	1	2	2	2
3	3	1	2	2
4	1	1	3	2
5	1	1	2	2
6	0	1	2	2
7	2	2	2	2
8	1	0	4	2

Skor= 0: Yok, 1: minimal (<% 25), 2: hafif (% 25 - % 50), 3: orta (% 50-% 75), 4: şiddetli (>% 75)

Tablo 12. Sıçan numarasına göre tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon skorları

No	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
1	0	2	2	2
2	1	2	4	2
3	3	1	2	2
4	1	1	2	2
5	0	1	3	2
6	0	1	2	2
7	2	2	2	1
8	1	0	4	1

Skor= 0: Yok, 1: minimal (<% 25), 2: hafif (% 25 - % 50), 3: orta (% 50-% 75), 4: şiddetli (>% 75)

Tablo 13. Sıçan numarasına göre intratübüler hiyalin birikimi skorları

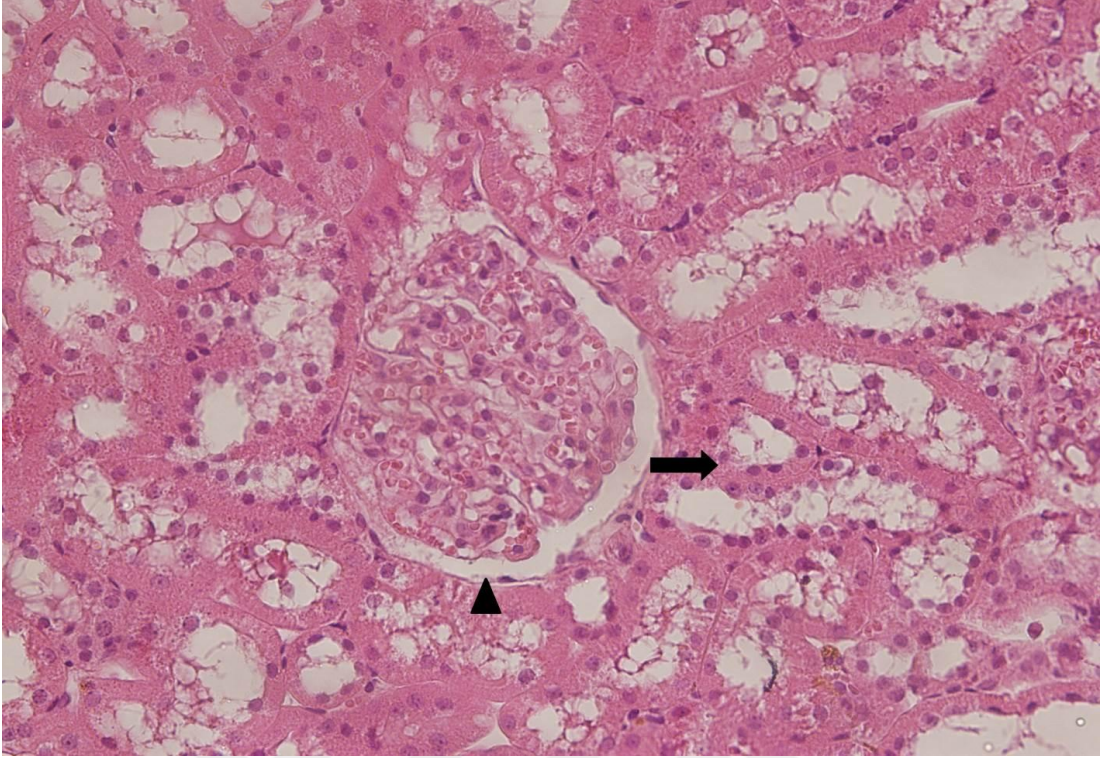
No	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
1	0	1	3	1
2	0	1	3	2
3	1	0	2	1
4	0	0	2	1
5	0	1	2	1
6	0	1	3	1
7	2	1	2	1
8	1	0	3	1

Skor= 0: Yok, 1: hafif (<% 25), 2: orta (% 25 - % 50), 3:şiddetli (% 50-% 75), 4:çok şiddetli (>% 75)

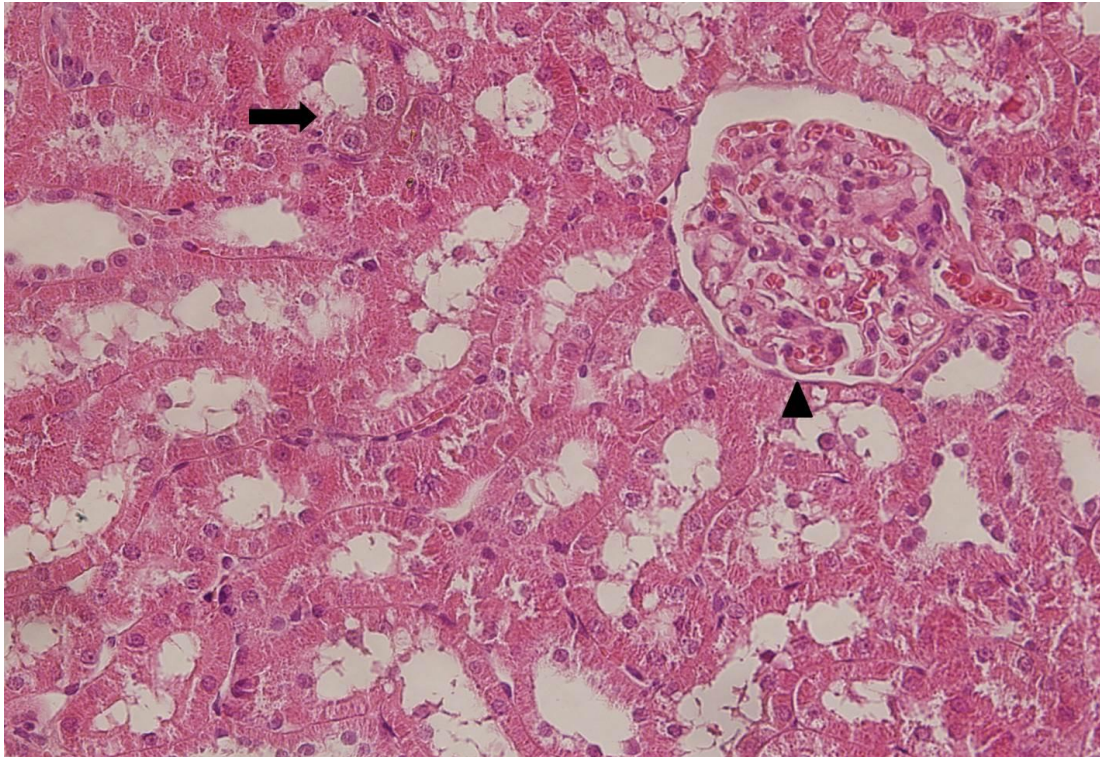
Tablo 14. Sıçan numarasına göre vazokonjesyon skorları

No	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
1	0	1	3	1
2	0	1	2	1
3	1	1	2	2
4	1	0	2	1
5	0	1	4	2
6	0	1	2	2
7	1	1	3	2
8	1	0	3	1

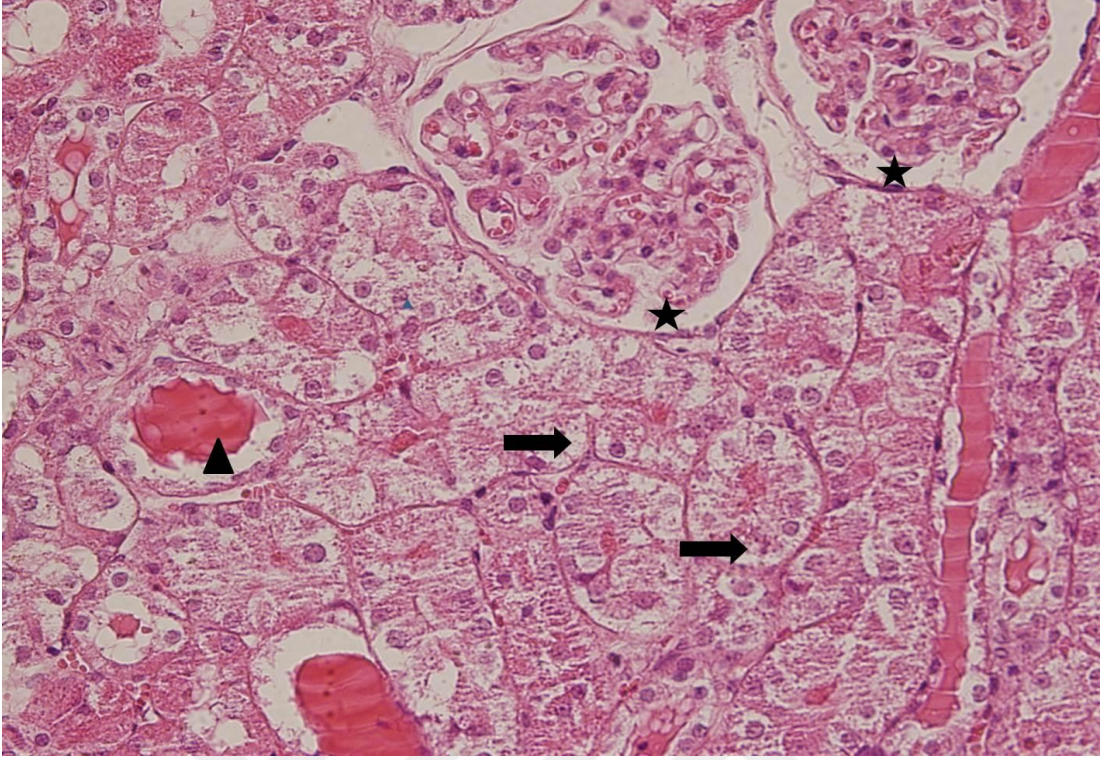
Skor= 0: Yok, 1: hafif (<% 25), 2: orta (% 25 - % 50), 3: şiddetli (% 50-% 75), 4:çok şiddetli (>% 75)



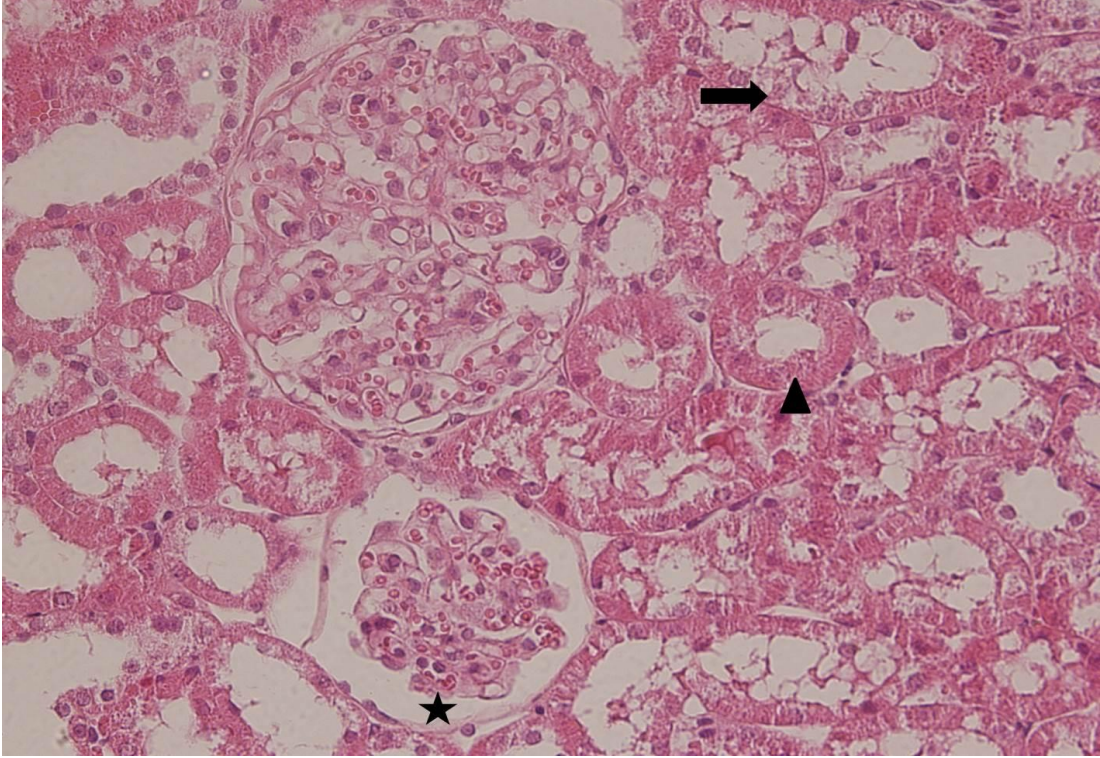
Resim 5. Kontrol grubu böbrek dokusuna ait fotomikrograf (H&E, 400X)
Normal tubul epitel hücresi (↑), normal glomerul yapısı (Δ)



Resim 6. Theanin grubu böbrek dokusuna ait fotomikrograf (H&E, 400X)
Normal tubul epitel hücresi (↑), normal glomerul yapısı (Δ)



Resim 7. DOX grubu böbrek dokusuna ait fotomikrograf (H&E, 400X)
Dejenere tubul epitel hücresi (↑), bowman boşluğunda dilatasyon (yıldız), intratubuler hiyalin birikimi (Δ)

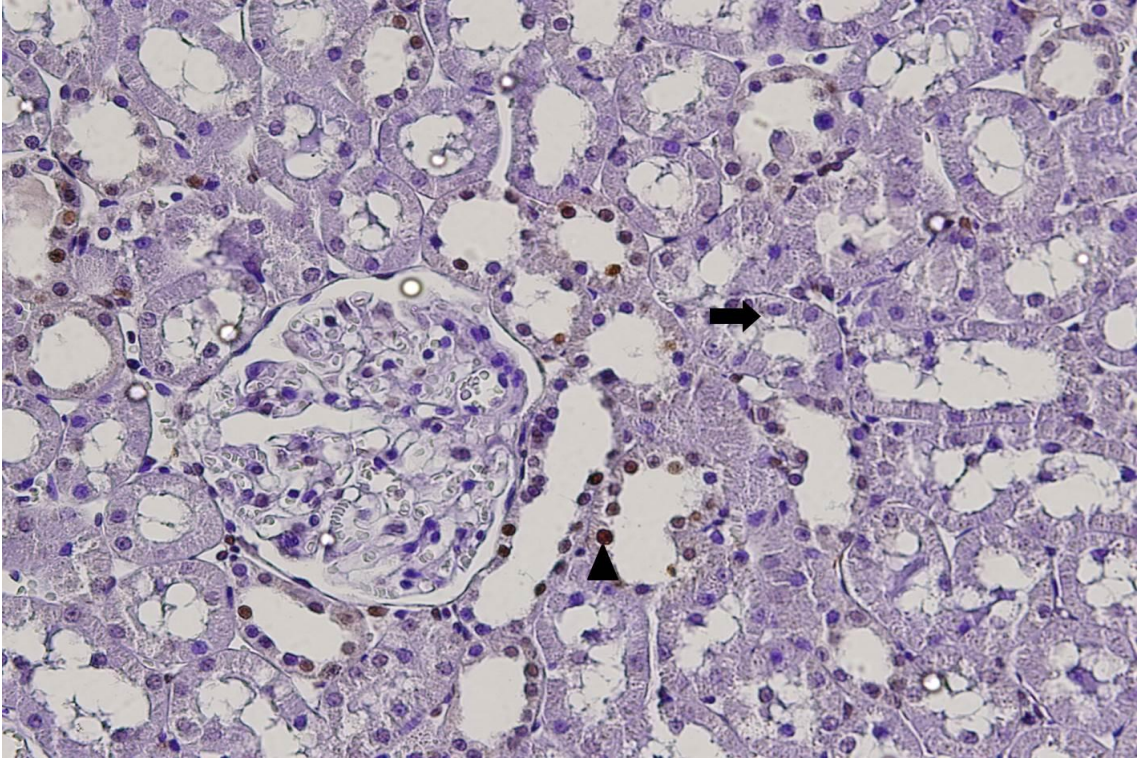


Resim 8. DOX+Theanin grubu böbrek dokusuna ait fotomikrograf (H&E 400X)
Normal tubul epitel hücresi (Δ), dejenere tubul epitel hücresi (↑), bowman boşluğunda dilatasyon (yıldız)

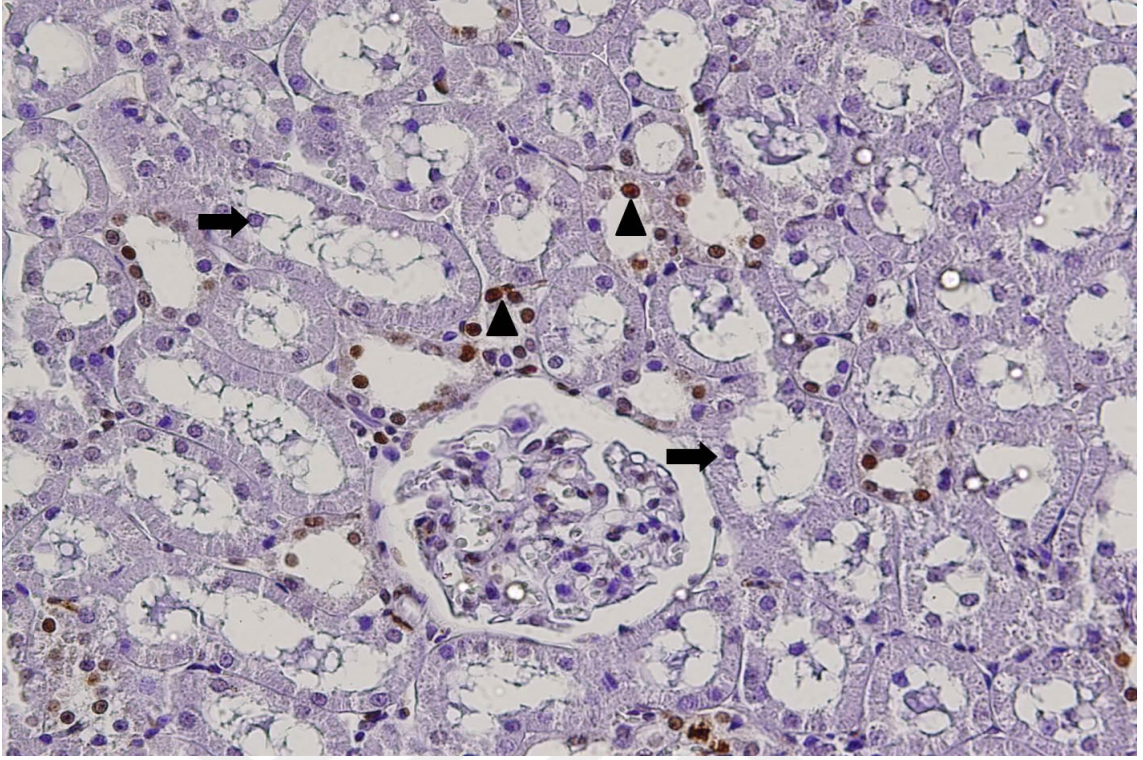
6.3. Apoptoz Bulguları

6.3.1. Apoptozun Histolojik Değerlendirilmesi

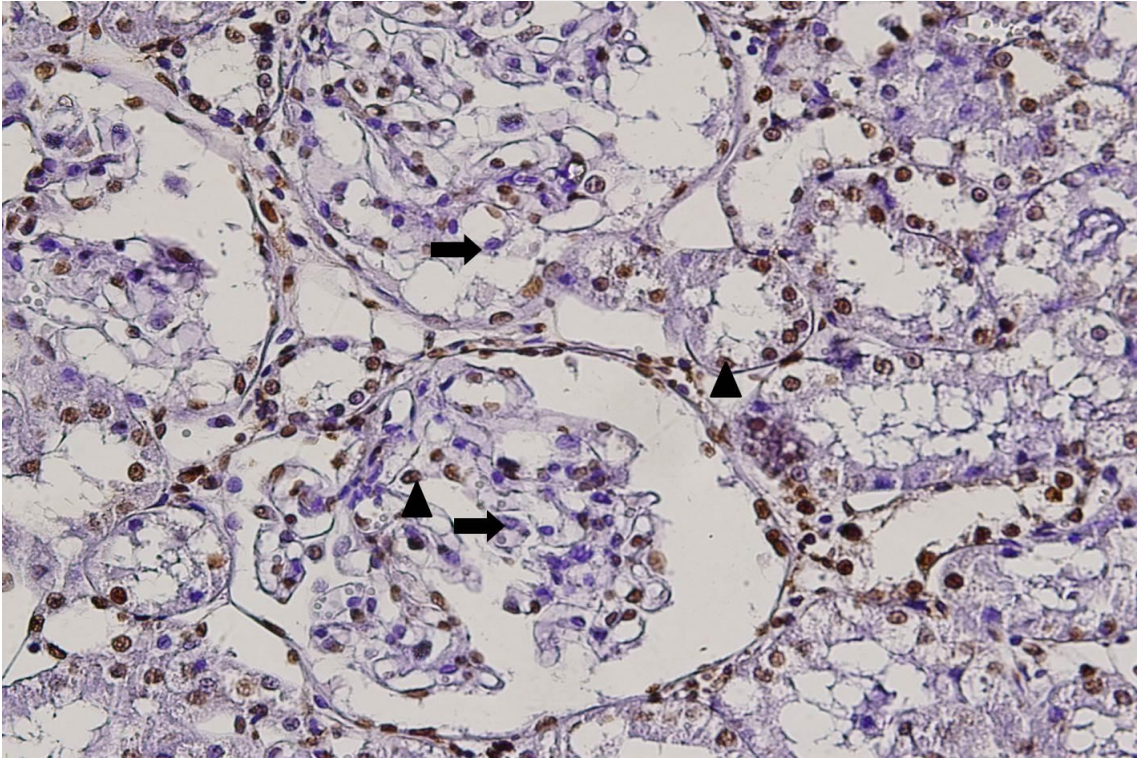
Grupların böbrek dokularındaki apoptotik hücreleri ifade eden TUNEL (+) ve sağlıklı hücreleri belirten TUNEL (-) hücrelerin fotomikrografileri çekildi (98). Kontrol ve theanin gruplarında az sayıda tübül epitel hücrelerinde apoptozis izlendi (Resim 9 ve 10). DOX grubundaki böbrek dokuları tübül epitel hücrelerinde yaygın apoptotik hücreler izlendi (Resim 11). DOX+Theanin grubunda tübül epitel hücrelerinde apoptotik hücre sayısı DOX grubuna göre daha az olarak izlendi (Resim 12).



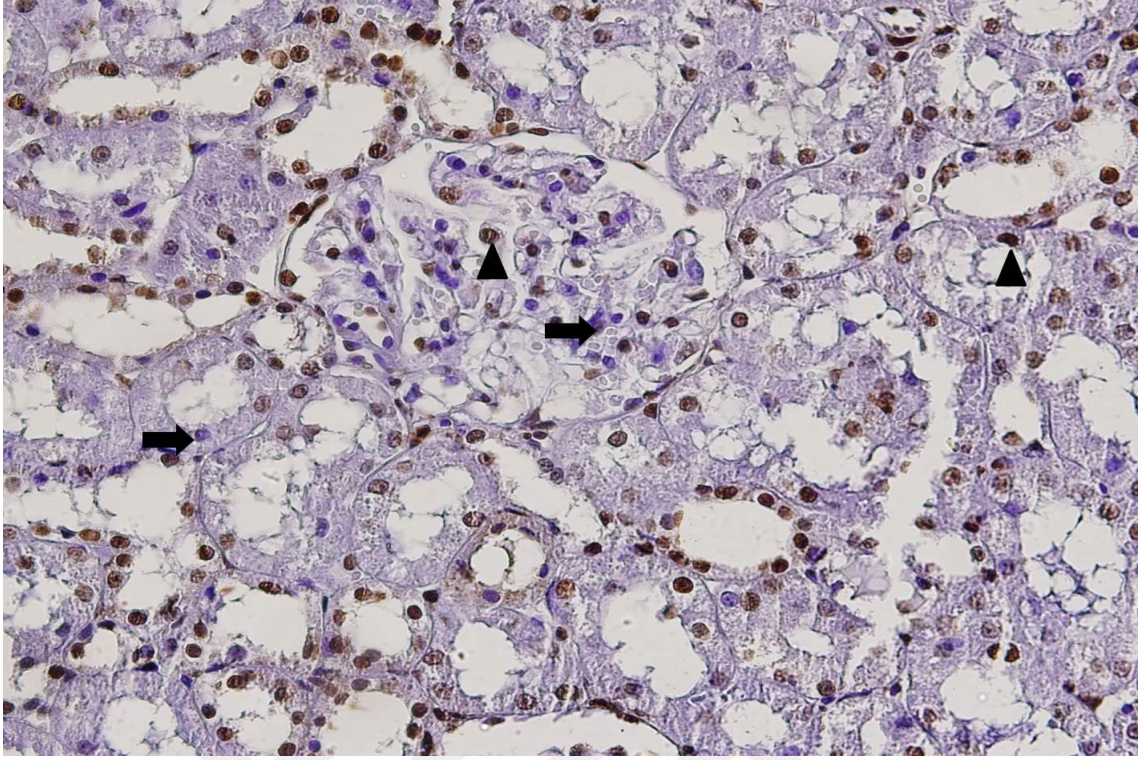
Resim 9. Kontrol grubu böbrek dokusuna ait fotomikrograf (TUNEL 400X)
TUNEL (-) hücre (↑), TUNEL (+) hücre (Δ)



Resim 10. Theanin grubu böbrek dokusuna ait fotomikrograf (TUNEL 400X)
TUNEL(-) hücre (↑), TUNEL (+) hücre (Δ)



Resim 11. DOX grubu böbrek dokusuna ait fotomikrograf (TUNEL 400X)
TUNEL (-) hücre (↑), TUNEL (+) hücre (Δ)



Resim 12. DOX+Theanin grubu böbrek dokusuna ait fotomikrograf (TUNEL 400X)
TUNEL (-) hücre (↑), TUNEL (+) hücre (Δ)

6.3.2. Apoptoz Seviyeleri

Gruplarda apoptoz seviyeleri dokularda TUNEL yönemi ile apoptoz indeksi ayrıca plazma ve doku kaspaz-3 düzeyleri belirlenerek değerlendirildi. Gruplardaki sıçan nuarasına göre böbrek dokusu apoptotik indeks yüzdeleri Tablo 15’de listelendi. Tablo 16 da gruplardaki % Aİ, plazma ve doku kaspaz-3 düzeyleri gösterildi.

Kontrol ve theanin gruplarında sırasıyla % 5.75 ve % 6.62 düzeylerinde, DOX grubundaki sıçanların böbrek dokularında ortalama % 42 düzeyinde apoptoz belirlendi. DOX+Theanin grubunda bu indeks % 29, olarak belirlendi. Kontrol ve Theanin grupları arasında anlamlı farklılık gözlemlenmedi. DOX+Theanin grubu, DOX grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha düşük, kontrol ve theanin gruplarına göre daha yüksek indeks oranlarına sahipti ($p=0.001$). Yüksek apoptotik indekse sahip DOX grubu diğer tüm gruplardan $p=0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi.

Plazma kaspaz-3 düzeyleri açısından kontrol ve theanin grupları arasında fark yoktu. DOX grubu kontrol grubuna göre $p=0.003$, DOX+Theanin grubu DOX grubuna

göre p=0.006 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Doku kaspaz-3 düzeyleri değerlendirildiğinde theanin ve kontrol grupları arasında fark bulunamazken yine DOX grubu kontrol grubuna göre p=0.002, DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre p=0.003 düzeyinde farklılık gösterdi. Ayrıca DOX grubu theanin grubuna göre p=0.003 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Yine kontrol ve theanin grupları ile daha yüksek kaspaz-3 seviyeleri kaydedilen DOX+Theanin grubu arasında da anlamlı farklılık bulguları elde edildi (p=0.007, p=0.025).

Tablo 15. Sıçan numarasına göre böbrek dokusu apoptotik indeks yüzdeleri (% Aİ)

No	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
1	4	9	39	29
2	6	9	45	31
3	10	5	40	32
4	6	4	39	25
5	3	5	47	34
6	4	6	40	29
7	7	11	41	31
8	6	4	45	21

Tablo 16. Deney gruplarında apoptoz parametrelerinin seviyeleri (n=8)

	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
% Aİ	[6.1 (2.8)] (3.9 - 7.6)	[5.5 (4.7)] (4.4– 8.8)	[40.5 (5.8) ^{a,b}] (40 – 45)	[30 (5.8) ^{a,b,c}] (25 – 33)
Plazma Kaspaz-3 (ng/mL)	[5.5 (2.7)] (3.5 – 6.5)	[5.3 (1.2)] (4.3 – 6.2)	[8.5 (1.9) ^{a,b}] (7.6 – 9.6)	[4.7 (2.5) ^c] (3.4 – 6.6)
Doku Kaspaz-3 (ng/mgprotein)	[5.6 (1.1)] (4.6 – 5.9)	[4.9 (1.7)] (4.2 – 5.9)	[7.7 (4.8) ^{a,b}] (7.5 – 7.9)	[6.1 (0.9) ^{a,b,c}] (5.7– 6.8)

Sonuçlar: [Medyan (IQR)]; (% 95 CI) şeklinde verildi.

^a:Kontrol; ^b:Theanin; ^c:DOX grubuna göre Mann Whitney U testine ile istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

6.4. İnflamasyon Seviyeleri

İnflamasyonu değerlendirmek üzere NF-κB p65 seviyeleri incelendiğinde theanin ve kontrol grupları arasında fark bulguları yoktu. Yüksek değerlerin kaydedildiği DOX grubu plazmada kontrol ve theanin grubuna göre farklılık gösterdi (p=0.007). Ayrıca DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre p=0.008 düzeyinde farklılık gösterirdi. Dokuda da benzer şekilde theanin ve kontrol grupları arasında fark bulguları yoktu. Yüksek değerlerin kaydedildiği DOX grubu kontrol grubuna göre p=0.002 ve theanin grubuna göre p=0.003 düzeylerinde farklılık gösterdi. Ayrıca DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre p=0.001 düzeyinde farklılık gösterdiği yönünde bulgular elde edilmiştir.

Ayrıca, doku NF-κB p65 düzeyleri açısından Dox+Theanin grubu kontrol grubuna göre p=0.002, theanin grubuna göre p=0.003 düzeyinde anlamlı farklılık göstermiştir (Tablo 17).

Tablo 17. Deney gruplarında inflamasyon parametrelerinin seviyeleri (n=8)

	Kontrol	Theanin	DOX	DOX +Theanin
Plazma NF-κB p65 (ng/mL)	[1635 (585)] (974 – 2202)	[1590 (558)] (1298 – 2036)	[3064 (1134) ^{a,b}] (2329 – 3361)	[1857 (565) ^c] (1644 – 2157)
Doku NF-κB p65 (ng/mg protein)	[180 (62)] (140 – 201)	[176 (66)] (142 – 209)	[337 (66) ^{a,b}] (309 – 380)	[247 (28) ^{a,b,c}] (228 – 257)

Sonuçlar: [Medyan (IQR)]; (% 95 CI) şeklinde verildi

^a:Kontrol; ^b:Theanin; ^c:DOX grubuna göre Mann Whitney U testine ile istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

6.5. Oksidan-Antioksidan Sistem Parametrelerinin Seviyeleri

Gruplardaki oksidan-antioksidan durumu değerlendirmek üzere doku ve plazma MDA, GSSG/GSH seviyeleri ile GPx ve GR aktiviteleri belirlendi. Elde edilen bulgular plazma için Tablo 18’de doku için ise Tablo 19’da gösterildi.

Tablo 18. Deney gruplarında plazma oksidan-antioksidan sistem parametrelerinin seviyeleri (n=8)

	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
MDA (nmol/mL)	[2.41 (0.70)] (2.07 – 2.76)	[2.47 (0.48)] (2.29 – 2.74)	[4.07 (1.89) ^{a,b}] (3.54 – 5.39)	[2.70 (1.23) ^c] (2.39 – 3.46)
GSH (μ M)	[6.08 (0.33)] (5.87 – 6.39)	[6.71 (1.59)] (6.06 – (7.40)	[3.89 (0.93) ^{a,b}] (3.34 – 4.46)	[5.25 (1.02) ^{a,b,c}] (4.73 – 5.69)
GSSG (μ M)	[3.88 (0.22)] (3.24 - 4.18)	[3.02 (1.97)] (2.37– 4.03)	[3.46 (0.92)] (2.82 – 4.21)	[2.89 (1.17) ^{a,b,c}] (1.94 – 3.24)
GPx (mU/mL)	[92.8 (20.6)] (80 – 101)	[115 (27.8) ^a] (95 – 135)	[137 (52.9) ^a] (116 – 164)	[182.6 (59.4) ^{a,b,c}] (158 – 225)
GR (mU/mL)	[29.4 (18.8)] (20 – 42)	[36.7 (22.7)] (26 – 51)	[23.9 (15.8) ^{a,b}] (11 – 32)	[32.9 (6.6) ^c] (30 - 36)
GST (mU/mL)	[47.5 (15.5)] (45 – 59)	[41.9 (8.4)] (37 – 48)	[25.2 (3.5) ^{a,b}] (18 – 29)	[29.9 (12.2) ^{a,b,c}] (25 – 40)
GGT1 (ng/mL)	[15.1 (3.5)] (13 – 16)	[14 (6.1)] (11 – 18)	[30.5 (7.1) ^{a,b}] (26 – 33)	[22.3 (3.23) ^{a,b,c}] (20 – 25)

Sonuçlar: [Medyan (IQR)]; (% 95 CI) şeklinde verildi

^a:Kontrol; ^b:Theanin; ^c:DOX grubuna göre Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak anlamlı (p <0.05).

Tablo 19. Deney gruplarında doku oksidan-antioksidan sistem parametrelerinin seviyeleri (n=8)

	Kontrol	Theanin	DOX	DOX+Theanin
MDA (nmol/mg)	[106 (19)] (91 – 112)	[104 (16)] (95 – 110)	[119 (19) ^{a,b}] (109 – 133)	[106 (16) ^c] (96 – 116)
GSH (μ mol)	[58.3 (5.6)] (56- 61)	[61.1 (4.2)] (59– 64)	[35.9 (8.5) ^{a,b}] (29– 38)	[42.3 (9.1) ^{a,b,c}] (40 – 48)
GSSG (μ mol)	[44.7 (5.73)] (41 - 48)	[44.9 (4.88)] (41– 47)	[64.1 (12.2) ^{a,b}] (62 – 73)	[54.8 (11.1) ^{a,b,c}] (51 – 61)
GPx (mU/mg)	[64.5 (34.4)] (41 – 77)	[59 (30.6)] (55 – 86)	[66.2 (38.3)] (37– 76)	[110.5 (20.7) ^{a,b,c}] (99 – 127)
GR (mU/mg)	[682 (114)] (601 – 712)	[684 (150)] (647 – 777)	[547 (107) ^{a,b}] (483 – 609)	[836 (91) ^{a,b,c}] (774– 875)
GST (mU/mg)	[239 (40)] (228– 275)	[236 (27)] (223 – 267)	[219 (13) ^{a,b}] (211 – 227)	[268 (48) ^c] (247 – 290)
GGT1 (ng/mg)	[4.10 (0.47)] (3.75 – 4.43)	[4.53 (0.73)] (3.83 – 5.01)	[5.66 (2.65) ^{a,b}] (4.90 – 7.32)	[4.44 (0.43) ^{a,c}] (4.23 – 4.62)

Sonuçlar: [Medyan (IQR)]; (% 95 CI) şeklinde verildi

^a:Kontrol; ^b:Theanin; ^c:DOX grubuna göre Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak anlamlı (p <0.05)

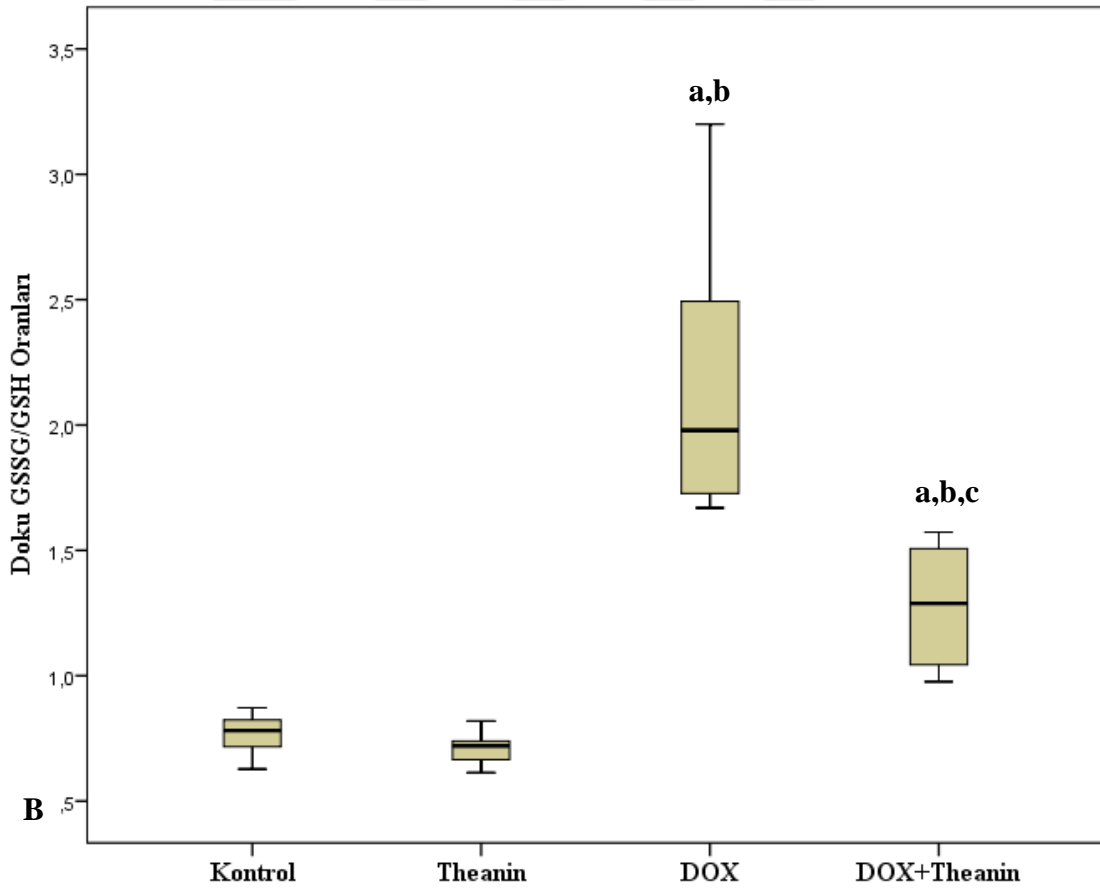
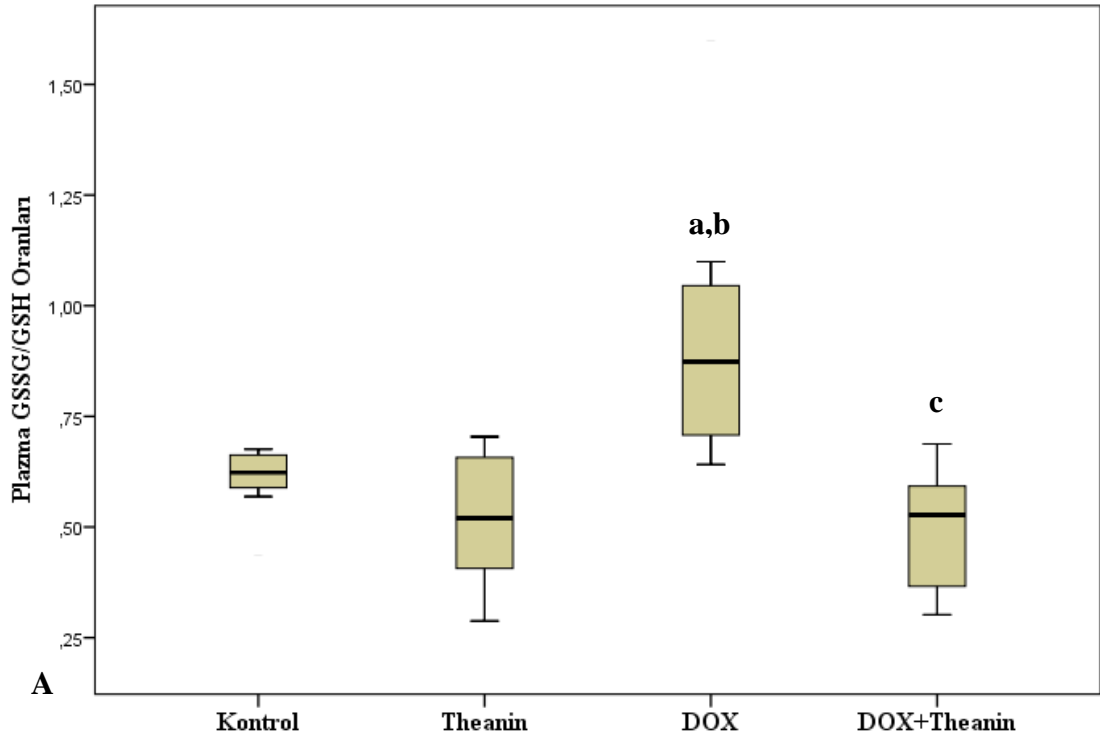
Plazma ve doku MDA seviyeleri açısından theanin ve kontrol grupları arasında fark bulunmazken DOX grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek değerler belirlendi (p<0.05). Bu anlamlılıklar plazmada, DOX+Theanin grubuna göre p=0.013 düzeyinde ayrıca kontrol grubuna göre p=0.002, theanin grubuna göre p=0.001 düzeylerinde, dokuda ise DOX+Theanin grubuna göre

p=0.025 ayrıca kontrol grubuna göre p=0.015, theanin grubuna göre p=0.018 ve düzeylerindedi. Bu bulgular DOX uygulamasının MDA düzeylerinde artışlara yol açtığı ve theanin uygulamasının bu artışı engellediği yönünde bulgulardır.

Plazma GSH seviyeleri theanin ve kontrol grupları arasında farklılık göstermezken DOX grubunda kontrol grubundan düşük seviyelerdeydi (p=0.001). DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre anlamlı düşük (p=0.005), ayrıca kontrol grubuna göre p=0.004 ve theanin grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlı düşük seviyedeydi. Doku GSH düzeyleri, plazma bulgularında olduğu gibi theanin ve kontrol grupları arasında fark bulunamazken DOX grubu kontrol ve theanin gruplarından p=0.001 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düşük seviyeler kaydedildi. DOX+Theanin grubu DOX grubundan p=0.002 düzeylerinde anlamlı düşük bulundu. Yine DOX+Theanin grubunda da kontrol ve theanin grubuna göre anlamlı düşük seviye bulguları elde edildi (p=0.001).

Plazma GSSG seviyeleri açısından theanin grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu. DOX grubu kontrol ve theanin gruplarına göre anlamlı farklılık göstermedi (p>0.05). DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre anlamlı yüksek düzeylerdeydi (p=0.025). Dokuda ise yine kontrol grubu ile theanin grubu arasında fark yokken, DOX grubunda diğer gruplara göre anlamlı yüksek seviyede idi (DOX+Theanin grubuna göre p=0.006, kontrol grubuna göre p=0.002, theanin grubuna göre p=0.003 düzeylerinde). Diğer taraftan DOX+Theanin grubu kontrol ve theanin grubuna göre anlamlı yüksek doku GSSG düzeyleri gösterdi (sırasıyla p=0.002, p=0.003).

Plazma GSSG/GSH oranları açısından theanin grubu ile kontrol grubu arasındaysa fark yoktu. DOX grubu kontrol grubuna p=0.002, theanin grubuna göre p=0.004 düzeylerinde anlamlı farklılık gösterdi. DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre p=0.001 düzeyinde anlamlılıkla düşük seviyeler kaydedildi (Şekil 24A). Dokuda ise yine DOX grubu kontrol ve theanin gruplarına göre p=0.001 düzeylerinde anlamlı yüksekti. DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre anlamlı düşük düzeylerdeydi p=0.001. Ayrıca DOX+Theanin grubu kontrol ve theanin gruplarına göre p=0.001 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı yüksek oranlardaydı (Şekil 24B).



Şekil 24. Gruplara göre plazma (A) ve doku (B) GSSG/GSH düzeyleri (Medyan-IQR)
^a:Kontrol; ^b:Theanin; ^c:DOX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı(p<0.05)

Plazma GPx aktivite düzeyleri açısından theanin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek aktivite düzeyleri saptandı ($p=0.025$). DOX grubu kontrol grubuna göre $p=0.001$ düzeyinde anlamlı farklıydı. Ayrıca DOX+Theanin grubunda plazma ve doku GPx aktiviteleri DOX grubuna ($p=0.013$ ve $p=0.002$) göre anlamlı yüksek, ayrıca kontrol grubuna ($p=0.003$ ve $p=0.003$) ve theanin grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı yüksek düzeyler kaydedildi ($p=0.004$ ve $p=0.003$). Doku GPx aktiviteleri açısından DOX grubu ile kontrol grubu arasında da anlamlı farklılık bulguları elde edildi ($p=0.001$) (Tablo 18, 19).

Doku ve plazma GR aktivite düzeyleri theanin ve kontrol grupları arasında farklılık göstermedi Düşük plazma GR aktivitesine sahip DOX grubu kontrol grubuna $p=0.045$, theanin grubuna $p=0.037$ düzeylerinde anlamlı farklılık gösterdi DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre $p=0.010$ farklılık gösterdi (Tablo 18). Doku GR aktiviteleri DOX grubu doku GR aktivitesi, kontrol ve theanin gruplarına göre de (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.011$) anlamlı düşüktü. DOX+Theanin grubundaya DOX grubuna göre $p=0.002$ düzeyinde, kontrol ve theanin gruplarına göre de sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.018$ düzeylerinde istatistiksel anlamlı yüksekti (Tablo 19).

GST ve GGT1 düzeylerinde sağlıklı theanin ve kontrol grupları arasında istatistiksel farklılık bulguları elde edilmedi. Plazma GST aktivite düzeyleri açısından DOX grubu kontrol grubuna $p=0.001$, theanin grubuna $p=0.004$ düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşük seviyelere sahipti. DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre $p=0.043$ farklılık gösterdi. Ayrıca DOX+Theanin grubunda da kontrol ve theanin gruplarına göre sırasıyla $p=0.005$ ve $p=0.040$ düzeylerinde anlamlı düşük değerler kaydedildi (Tablo 18). Doku GST aktiviteleri açısından DOX grubu kontrol ve theanin gruplarına göre sırasıyla $p=0.009$, $p=0.005$ düzeylerinde anlamlı farklılık gösterdi DOX+Theanin grubu DOX grubuna göre $p=0.001$ düzeyinde istatistiksel farklılık gösterdi. (Tablo 19).

Plazma ve doku GGT1 düzeyleri açısından DOX grubu diğer gruplardan anlamlı yüksek düzeyler gösterdi (kontrol: $p=0.002$ ve $p=0.003$; theanin: $p=0.006$ ve $p=0.006$); DOX+Theanin grubunda DOX grubuna göre plazmada $p=0.004$, dokuda $p=0.001$ düzeylerinde istatistiksel olarak düşük seviyedeydi. Ayrıca plazmada kontrol ve theanin gruplarından (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.006$) anlamlı yüksek iken dokuda sadece kontrol grubundan ($p=0.049$) anlamlı yüksekti (Tablo 18, 19).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bazı analjezikler, antibiyotikler, immünsüpresif ve kemoterapötik ilaçlar ve ağır metaller ciddi bir sağlık sorunu olan nefrotoksisiteye yol açabilmektedir. Bu durum böbrek yetmezliği ve akabinde böbrek kayıpları ile sonuçlanabilmektedir (19, 21, 101). Son derece önemli bir organ olan böbreklerde özellikle ilaç kaynaklı toksik etkiler beraberinde gelişen nefrotoksisite sorununu bertaraf için arayışlar sürmektedir (21). L-theanin, özellikle *Camellia sinensis* türü çaylarda (yeşil, siyah vb. çay) bulunan bir amino asittir. Türkiye’de siyah çayın çok tüketilmesi nedeniyle theanin, günlük yaşamda vücuda düzenli olarak alınan amino asitlerden biri olmuştur. Bu nedenle gerek çay ile birlikte, gerekse destekleyici olarak L-theanin alınmasının, nefrotoksisiteye karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek çalışmamızın hedefini oluşturmuştur (1).

L-theaninin üzerine 500 kadar araştırma makalesi ve 300 kadar derleme bulunmakta ve “şahsına münhasır olan eşsiz bir aminoasit” olarak nitelendirilmektedir. Theaninin tümör hücrelerinde, DOX gibi antineoplastik ajanların biyoyararlanımını arttırdığı belirtilmektedir (102). Katabolizması sonucu etilamin açığa çıkan theaninin, önemli bir alkilamin kaynağı olduğu, bitkilerde theanin sentezi ve miktarı arttıkça polifenol sentezinin de aynı oranda arttığı belirtilmektedir (103).

Çalışmada deneysel nefrotoksisite oluşturmak üzere kanser kemoterapisinde sıklıkla kullanılan DOX uygulanmıştır. Literatür ile uyumlu olarak 20 mg/kg’lık i.p. DOX uygulanması beraberinde deneysel olarak nefrotoksisite oluşturulmuştur (Tablo 8, 9, 16, Resim 4, 7, 11). Literatürde, karaciğer dokusunda 20 mg/kg’lık DOX enjeksiyonuyla, serum AST-ALT düzeylerinde önemli ölçüde yükselmeler eşliğinde hepatotoksisite, kalp dokusunda aynı dozda DOX uygulanarak kardiyotoksisite bulguları rapor edilmektedir (67, 104, 105). DOX uygulamasının böbrek dokusunda da oksidatif stres beraberinde serbest radikallerin aşırı üretimi, yüksek oranda inflamatuvar elemanları ve sitokinlerin salınımı, ilişkili hücresel yolların aktifleşmesi ve nefrosit membranlarında lipid peroksidasyonlarına, dolayısıyla böbrek doku ve hücrelerinde fonksiyon bozukluklarına yol açtığı belirtilmektedir (30, 106). DOX’un serbest radikal üretimi, lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasar oluşturduğu, transkripsiyon ve

replikasyon sırasında topoizomeraz II aktivitesini de inhibe ederek mevcut toksik etkilere yol açtığı belirtilmektedir (28, 33).

Bu çalışmada etken madde olarak seçilen anti-oksidan, anti-proliferatif, anti-nekrotik, anti-neoplastik özellikleri bulunduğu belirtilen L-theanin, beş gün süreyle 200 mg/kg/gün dozunda i.p. olarak uygulandı. Daha önce L-theaninin böbrek dokusu üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma olmadığı için theaninle ilgili farklı çalışmalar göz önüne alınarak bu doza karar verildi. Hepatotoksisite üzerine koruyucu etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda 100 ve 150 mg/kg i.p. uygulama çalışmaları mevcuttur. Theaninin koruyucu etkinlik gösterdiği dozu özellikle 200 mg olarak ifade edilmiştir (89, 104, 105). 400 mg/kg gastrik perfüzyonla L-theanin uygulanan sıçanların organlarında veya dokularında herhangi bir toksik etki göstermediği rapor edilmemiştir (107). Bizim de elde ettiğimiz bulgular ışığında intraperitoneal olarak 200 mg/kg theanin uygulamasının toksisiteye karşı olumlu etkilerinin olabileceği yönünde veriler elde edilmiş ve bu dozun herhangi bir toksik etkiye yol açtığına dair bir bulguya rastlanmamıştır.

Mevcut çalışmamızda böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan BUN, kreatinin ve BUN/Kreatinin seviyeleri değerlendirilmiştir. Üre ve kreatin özellikle protein metabolizmasının son ürünü olan nitrojenlerdir. Üre sentezinin tamamına yakını karaciğer dokusunda gerçekleşerek vücut sıvılarına dağılır. Böbrekler tarafından glomerüler filtrasyona uğrayarak reabsorpsiyonu ve atılımı gerçekleşir. Proteinden yüksek diyet, çeşitli ilaç uygulamaları, kas, karaciğer ve böbrek gibi çeşitli dokulardaki harabiyet beraberinde BUN ve kreatinin plazma ve idrar düzeyleri artar. Kreatinin böbrek dokusunda özellikle anormal glomerüler filtrasyonun ve doku harabiyetlerinin bir belirteci olarak değerlendirilmektedir (108, 109). BUN ve kreatinin'in her ikisinde böbrek glomeruluslarından elimine edilerek idrarla atılmaktadır. Kreatininden farklı olarak BUN'nin % 40 kadarı böbrek proksimal tübüllerinden su ve inorganik maddeler beraberinde reabsorbe edilmektedir. Bununla birlikte, dehidratasyon sonucu su ve inorganik madde kayıpları durumunda BUN'un geri emilerek idrarla atılımının zorlaştığı, dolayısıyla BUN/Kreatinin düzeylerinin yükselebileceği belirtilmektedir (109).

Bu çalışmada BUN, Kreatinin ve BUN/Kreatinin oran seviyeleri theanin grubu ile kontrol grubunda farklılık göstermezken, nefrotoksik sıçanlarda yani DOX grubunda kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p < 0.05$, Tablo 15). Bu parametrelerin yüksek olması DOX'un, sıçanların böbrek fonksiyonlarında bozulmalara yol açtığını göstermektedir. Literatürde DOX uygulamasının dehidratasyona yol açtığı ve dehidratasyonun BUN/Kreatinin düzeylerinin yükselmesine neden olabileceği belirtilmektedir (109, 110). Bu parametrelerin seviyelerinin DOX+Theanin grubunda DOX grubuna göre düşük olması, theaninin DOX ile uyarılan toksisiteyi engelleyici yönde etki ederek böbrek fonksiyonlarını koruyabildiğini göstermektedir. DOX+Theanin grubunda, kontrol ve theanin grubuna göre nispeten yüksek seviyelerde BUN ve Kreatinin düzeyleri gözlemlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamaması ($p > 0.05$), ayrıca istatistiksel anlamlı yükseklikte ($p < 0.05$) BUN/Kreatinin oranlarının tespit edilmesi, theaninin DOX ile uyarılmış nefrotoksistide dehidratasyonu da engelleyerek koruyucu yönde etki gösteriyor olabileceğini düşündürmektedir.

Nagai ve ark. (8), theaninin DOX ile uyarılmış nefrotoksistide kreatinin klerensini normalize ettiğini rapor etmişlerdir. Theanin BUN ve kreatinin seviyelerine etkisini inceleyen herhangi bir çalışma mevcut değildir. Theanine benzer yapıdaki glutaminin sisplatin indüklü nefrotoksistide kısmı olarak koruyucu etki gösterdiği fakat bu etkinin akut renal yetmezliği engellemede yetersiz olduğu belirtilmiştir (108, 109). Bu kapsamda Nagai ve ark. (8) ve bizim BUN-kreatinin bulgularımız göz önüne alındığında, nefrotoksistide theaninin glutaminden farklı etkilerinin olabileceği fikrini uyandırmıştır.

Theaninin karaciğer dokusunda ve hepatositlerde deneysel olarak indüklenen toksistide hücreleri koruyucu yönde etkisi serum AST ve ALT düzeylerinin toksik gruba göre düşük olarak raporlanmasıyla belirtilmiştir. Aynı çalışmalarda antioksidatif etkileri vurgulanan theaninin, inflamasyonu, apoptozisi ve doku ve hücrelerdeki histopatolojik hasarları engellediği yönünde bulgular elde edilmiştir (89, 112).

Çalışmamız kapsamında uzman patolog tarafından yapılan incelemelerde, theanin ve kontrol gruplarında hasar bulguları gözlenmezken deneysel olarak toksisite oluşturulan DOX grubunda şiddetli ve yaygın nefrotoksistide bulguları (skor 3, $> 50\%$) tespit edildi. Ayrıca bu sıçanların iki tanesinde böbrek dokularında renal kortikal

mikrokistler gözlemlendi. Theanin verilen DOX+Theanin grubunda ise nefrotoksisite bulgularının yaygınlığı; hafif ve orta düzeylerde, % 0 < > % 50 aralığında, nefrotoksik DOX grubuna kıyasla daha hafif bulgular olarak raporlandı (Tablo 8). Yine yapılan mikroskopik incelemede DOX grubunda, DOX+Theanin grubuna göre; kortikal alanda yaygın (>% 50) akut tübül hasar görüntüleri (tübül epitellerinde deskuamasyon, tek hücre nekrozları, dökülme) kaydedildi (Resim 4).

Ayrıca uzman histolog tarafından yapılan ek histopatolojik değerlendirmede; Bowman boşluğunda dilatasyon, tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon, tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon, intratübül hiyalin birikimi ve vazokonjeksiyon parametrelerinin düzeyleri değerlendirildi. Histopatolojik skorlama, nefrotoksisite bulgularının renal korteksteki yaygınlık derecesine göre gerçekleştirildi (98). Yapılan mikroskopik inceleme ve skorlama sonucunda yine DOX grubuna ait deney hayvanlarının böbreklerinde % 50 nin üzerinde, şiddetli yaygınlıkta nefrotoksisite bulguları belirlendi. Theanin verilen DOX+Theanin grubundaki nefrotoksisite bulguları daha hafif şiddetli olarak, ortalama % 25 düzeylerinde saptandı (Tablo 9). Ayrıca DOX grubunda orta ve şiddetli derecede tüm mikroskopik alanlarda Bowman boşluğunda dilatasyon, tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon, tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve intertübül vazokonjeksiyon izlendi. Buna ilaveten intratübül alanda orta ve şiddetli derecede hiyalin birikimi gözlemlendi. Buna karşın DOX+Theanin grubunda intratübül hiyalin birikimi ve vazokonjeksiyon hafif ve yer yer orta şiddette, tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve dejenerasyon daha hafif düzeylerde tespit edildi (Tablo 9, Resim 8, 9). Kaydedilen bu bulgular, theaninin DOX indüklü nefrotoksisitede böbrek fonksiyonlarını gerçekleştiren yapısal elemanların bütünlüğünü koruyucu yönde etkinlik gösterebildiği ve biyokimyasal bulgularımızı desteklediği yönündedir.

Nagai ve ark. (105) DOX indüklü hepatotoksisite üzerine theaninin koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında yaptıkları histopatolojik değerlendirmelerde olumlu sonuçlar elde etmiş ve theaninin karaciğer hücre harabiyeti ve hücre dilatasyonunu engellediğini ifade etmişlerdir. Yine Pérez-Vargas ve ark. (89) 2016 yılında, CCL₄ indüklü hepatotoksisite çalışmalarında theaninin hepatositlerin yapısal özelliklerini koruyucu yönde etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, TUNEL yöntemiyle böbrek dokusundaki % Aİ değerlendirildiğinde kontrol % 5.75, theanin grubunda % 6.62, DOX grubunda ortalama % 42 ve DOX+Theanin grubunda % 29, olarak belirlendi. Kontrol ve theanin grupları arasında farklılık bulunamazken yüksek % Aİ değerlerine sahip DOX grubu diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak $p=0.001$ düzeyinde anlamlı farklılık gösterdi (Tablo 16). Kontrol ve theanin gruplarında az sayıda tubul epitel hücrelerinde, DOX grubunda ise tubul epitel hücrelerinde yaygın apoptoz izlendi (Resim 10). DOX+Theanin grubu tubul epitel hücrelerinde apoptotik hücre sayısı DOX grubuna göre daha az seviyede saptandı (Resim 13-14). Elde ettiğimiz TUNEL+ hücre bulguları ve yüzde apoptotik indeks verileri ışığında theaninin, DOX ile uyarılmış apoptozu baskıladığını söylemek mümkündür. Çalışmamızda elde ettiğimiz plazma ve doku kaspaz-3 seviyeleri de bu teoriyi desteklemektedir. Bu çalışmada doku ve plazma kaspaz-3 düzeyleri açısından theanin grubu ile kontrol grubu arasında farklılık bulguları elde edilmemiştir. Hem plazma hem de dokuda yüksek kaspaz-3 düzeylerine sahip olan DOX grubu, diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. DOX+Theanin grubuysa kontrol ve theanin gruplarından daha yüksek doku kaspaz-3 düzeylerine sahipti ($p<0.05$, Tablo 16). Yapılan bazı çalışmalarda DOX uygulaması ile böbrek ve karaciğer gibi dokularda oluşturulan toksisitede kaspaz-3 ekspresyonunda artışların olduğu, kaspaz-3 aktivitesi üzerinden apoptozisin indüklendiği veriler kaydedilmiştir (33, 111). Özellikle antikanser ilaçların etkileri ve keşifleriyle ilgili çalışmalarda kaspaz-3 ve ilişkili yolaklar önemli olarak ele alınmakta, yüksek kaspaz-3 düzeylerinin hücre harabiyetlerinin önemli bir belirteci olduğu vurgulanmaktadır (58).

Bu çalışmada DOX+Theanin grubunda DOX grubuna göre daha düşük kaspaz-3 seviyesinin tespit edilmesi (theaninin böbrek dokusu kaspaz-3 düzeylerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanamamasına rağmen) karaciğer hücre ve dokusunda indüklenen toksisitede theaninin uygulaması ile daha düşük kaspaz-3 düzeyleri rapor eden çalışmalarla desteklenmektedir. Literatürde theaninin 10 mg/kg dozu 5 gün boyunca uygulanan farelerin karaciğer hücrelerinde, kaspaz-3 ve diğer apoptotik yolaklar üzerinden apoptozisi inhibe ettiği ileri sürülmüştür (105). Literatürde theaninin hepatositlerdeki etanol indüklü toksisitede, sitokrom c salınımını ve mitokondriyal membran potansiyelini düzenleyici etki göstererek, mitokondriyal

apoptozisi engellediđi belirtilmiřtir. Ayrıca Kaspaz-3 düzeylerinin theanin uygulanan grupta daha dūřuk olduđu rapor edilerek theaninin koruyucu etkinliđi vurgulanmıřtır (58, 112).

Çalıřmamızda inflamasyonun da bir göstergesi olan NF-κBp65 'in plazma ve bōbrek dokusundaki düzeyleri deđerlendirildi. Theanin ve kontrol grupları arasında farklılık bulguları saptanmazken yüksek plazma ve doku NF-κBp65 düzeylerine sahip DOX grubu diđer tūm gruplara gōre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gōstermiřtir. NF-κBp65 düzeyleri DOX+Theanin grubunda DOX grubuna gōre dūřuk seviyelerde kaydedildi (Tablo 15). Bu bulgular ıřıđında DOX indūklū nefrotoksisitede inflamasyon artmıř, theanin uygulamasının inflamasyonu baskılayıcı yōnde etkisi olabileceđi elde ettiđimiz bulgular ıřıđında dūřūnūlmūřtur.

Theaninin hūcrelere alınmasıyla glutamin ve glutamat gibi hūcre içi serbest azot, sitrat ve alfa ketoglutarat (α -KG) düzeyleri de artmaktadır. Bu dūzeylere etkisi beraberinde theanin, amino asit katabolizmasını, oksidatif metabolik yolakları stimūle edip glikoliz hızını inhibe ediyor olabilir (113). Dūřuk hızda glikoliz ve theaninin alınmasıyla dūzeyinin yūkselebileceđini literatūr çerçevesinde dūřūndūđūmūz α -KG'ın prolin hidrosilazları aktive ederek hipoksiyi, inflamasyonu, NFκB dūzeylerini azalttıđı ve apoptozisi inhibe ettiđi belirtilmektedir. Theaninin bu dūzey ve yolaklar ūzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir.(113-115).

Perez ve ark. (89) CCL₄ indūklū hepatotoksisiteye karřı theaninin koruyucu etkilerini arařtırdıkları çalıřmalarında theaninin, NF-κB'yi inhibe ederek ve aktif makriks metaloproteinaz-13 (MMP-13) aktivitelerini yūkselterek, karaciđer fibrozisini engellediđini ileri sūrmūřlerdir. Bununla birlikte theaninin, deney hayvanları lenfositlerinde mevalonat biyosentetik yolaklarında gōrev alan Ras iliřkili protein A1 (Rap1A) ve hidroksi metil glutaril koenzim A redūktaz (HMGCR) ekspresyonlarını arttırarak sitokinlerin salınımını dūzenleyici etkilerinin olduđu belirtilmektedir. Mevalonat yolađı hūcre būyūme, farklılařma ve proliferasyonunda ūnemlidir. Theaninin bu yolakla iliřkili olarak interferon- γ , interlōkinler (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12) ve tūmōr nekrozu faktōrū α (TNF α) ekspresyonlarını inhibe ederek anti-inflamatuar etkinlik gōsterdiđi ileri sūrūlmūřtur (116). Bizim de çalıřmamızda elde

ettiğimiz bulgular, theaninin DOX indüklü nefrotoksisiteye karşı koruyucu yönde anti-inflamatuar etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda theaninin, DOX ile uyarılmış nefrotoksisitede, plazma ve böbrek dokusu homojenatlarında, oksidatif stres parametrelerinden lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyeleri üzerine etkileri değerlendirildi. Theanin ve kontrol grupları arasında farklılık bulunmazken DOX grubunda yükselmiş MDA seviyeleri diğer tüm gruplardan anlamlı farklılık gösterdi. Theanin uygulanan DOX+Theanin grubunda MDA seviyeleri DOX grubuna göre daha düşük bulundu ($p<0.05$, Tablo 18, 19). Deney hayvanlarında DOX ve benzeri toksik ajanlarla oluşturulan nefrotoksisitede MDA seviyelerinin yükselerek toksik etkilerin oluştuğu belirtilmiştir (117-119). DOX uygulaması reaktif oksijen türlerini arttırdığı gibi TCA ve oksidatif solunum yollarını inhibe ederek metabolik strese de yol açabilmektedir. DOX tarafından indüklenen hipoksi ve oksidatif stres beraberinde inflamasyon ve NF- κ Bp65 düzeyleri yükselbilmektedir (115, 120). Theanin uygulanan DOX+Theanin grubunda DOX grubuna göre daha düşük MDA seviyelerinin tespit edilmesi, theaninin lipid peroksidasyonunu azaltarak nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkinlik gösterebilen bir molekül olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde Jiang ve ark. (88) karaciğer hücrelerinde theaninin antioksidan özellikleriyle oksidatif strese karşı MDA düzeylerindeki artışı engelleyerek koruyucu yönde etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Nagai ve ark. (8) DOX ile uyarılmış nefrotoksisitede artan MDA düzeylerini, theaninin antioksidan etkileriyle inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmalardan başka theaninin doku veya plazma MDA düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Theaninin glutatyon metabolizmasını etkilediği belirtilmiştir (5, 69, 71, 112). Bu nedenle böbrek dokusu üzerinde glutatyon ve ilişkili enzimler, ilk defa bu çalışma kapsamında, daha ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

Bu çalışmada sağlıklı theanin ve kontrol grupları arasında GR ve GST aktiviteleri, GGT1, GSH, GSSG, GSSG/GSH seviyeleri arasında farklılık bulguları belirlenemezken GPx aktivitelerinin theanin grubunda kontrol grubuna göre yükseldiği yönünde veriler elde edilmiştir.

Çalışmamızda DOX grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük GSH seviyeleri, GR ve GST aktivitelerine; yüksek GSSG ve GGT1 seviyelerine sahipti ($p<0.05$, Tablo 18-19). DOX, Fe^{+3} ile oluşturduğu kompleks beraberinde meydana gelen oksijen radikallerinin hücre içi taşınım sistemini engellediği, hücredeki GSH düzeylerini, GST ve GR gibi glutatyonla ilişkili enzimleri dolayısıyla hayati önemi olan antioksidan savunma sistemlerini baskıladığı ve oksidatif strese neden olduğu belirtilmektedir (30, 32, 34). GSSG ve GSSG/GSH düzeyinin yükselmesi oksidatif stresin bir göstergesidir (121). Böbrek hasarının bir belirteci olarak değerlendirilen GGT, ekstrasellüler GSH'ları hidroliz ederek sisteinil glisin ve γ -glutamil ürünlerine dönüştürür ve GSH homeostazisinde önemlidir (45). Bu amino asitler spesifik aminoasit taşıyıcıları tarafından hücre içine alındığı gibi GGT aracılığıyla da γ -glutamil ve γ -glutamilsistin alınarak hücre içi GSH sentezinde kullanılır. Bu sentezin ilk basamağında rol alan γ -glutamilsistein ligaz (GCL) enziminin katalitik alt ünitesi olan GCLC'nin, DOX uygulamasıyla inhibe olduğu, hücre içi GSH düzeylerinde azalma olduğu gibi GGT ekspresyonunun arttığı belirtilmektedir (122, 123). Bu nedenle her ne kadar GGT düzeyleri artmış olsada GSH sentezi DOX uygulaması beraberinde inhibe olabilmektedir. Yamamoto ve ark. (124) iskemi indüklü böbrek hasarında doku GGT düzeylerinin arttığı yönünde bulgular elde etmişlerdir. Diğer bir araştırmada deney hayvanlarında bir antibiyotik olan kolitsin indüklü nefrotoksisite de yüksek GGT düzeyleri rapor edilmiştir (125).

DOX uygulamasının böbrek dokusu üzerinde GST aktivitelerini azalttığı yönünde veriler mevcuttur (126, 127). DOX uygulamasının GST'leri inhibe ettiği, toksik metabolitlerin ve oksidatif stresin artması sonucu doku hasarına yol açtığı vurgulanmıştır (128). Literatürde GST- α formunun, nefrotoksisitede, akut böbrek hasarını belirlemede erken bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (45). Faz II detoksifikasyon enzim ailesinden olan GST'ler, inhibitör NF-kB'nin fosforilasyonunu sağlayarak kısmi olarak NFkB sinyal yolağını aktive ettiği, indüklenebilir NO sentaz ve NO' nun düzenlenmesine etki ettiği ve *in vitro* ortamda oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin de olduğu ileri sürülmektedir (48).

DOX+Theanin grubu DOX grubu ile karşılaştırıldığında plazma ve dokuda benzer yönlerde düşük GSSG/GSH oranına ve GGT1 seviyesine, yüksek GR, GPx ve GST aktivitelerine sahipti ($p<0.05$) (Şekil 24, Tablo 18, 19).

GSH, hücrelerde ve plazmada en önemli antioksidan bileşenlerden birisidir. GSSG ve GSSG/GSH düzeyinin yükselmesi hem hücre içi oksidatif stresin bir belirteci hem de redoks dengesinin ve beraberinde hücre içi sistemlerin doğal fonksiyonlarındaki bozulmaların önemli bir göstergesi olarak nitelendirilmektedir (129). Theaninin, anti-tümör ajanların etkinliklerinin artmasına yol açtığı, hücrelerde GSH seviyelerini artırıcı etkilerinin olduğu ve toksik ajanların zararlı etkilerinden hücreleri koruyucu yönde etki ettiği belirtilmektedir (6, 89). Mevcut çalışmamızda da doku ve plazma GSSG ve GSH düzeyleri değerlendirilerek literatür ile paralel yönde veriler elde edilmiştir. Nagai ve ark. (8) theanin uygulamasının DOX indüklü renal toksisitede GSH düzeylerini yükselttiği ve koruyucu etkinliğini bu sayede gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Li ve ark. (112) 200 mg/kg theanin uygulamasının, etanol indüklü hepatotoksistide GSH düzeylerini artırarak koruyucu yönde etki gösterebildiğini ileri sürmüşlerdir. Deng ve ark. (130) theanin uygulamasının hepatotoksiste üzerinde GSH düzeylerini önemli ölçüde artırarak koruyucu etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Yine karaciğer dokusunda theaninin CCL₄ toksisitesi üzerinde koruyucu etkinliğinin incelendiği bir çalışma yapılmıştır. Vargas ve ark. (89) 2016 yılında yayınlanan çalışmalarında, theaninin GSH ve GSH/GSSG düzeylerini yükselterek koruyucu etkinlik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Sentellas ve ark. (131) ilaç indüklü hepatotoksistide GSSG/GSH düzeylerinin bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Theaninin, tam mekanizması bilinmemekle beraber, böbreklerde glutamine benzer şekilde hidrolizasyonunun, hücre içi GSH düzeylerinin yükselmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (69). Oksidatif stres altında, hasara bir cevap olarak hücre içi GSH düzeylerini ve diğer bazı antioksidan enzimleri yükseltici yönde mekanizmalar devreye girebilmektedir (örneğin GCL, GR, GPx) ve bu sebeple GSH prokürsörleri önemlidir (132). Mora ve ark. (132) sisplatin indüklü nefrotoksistide glutamin verilen grupların doku GSH düzeylerini kontrol grubuna göre önemli ölçüde yükselmiş olarak rapor etmişlerdir. Glutaminin, DOX ile indüklenen kardiyotoksistide, plazma ve kalp dokusunda GSH düzeylerini artırıcı, lipid peroksidasyonunu inhibe edici yönde etkileri rapor edilmiştir. Ayrıca glutaminin, sisplatin indüklü nefrotoksistide hücre içi GSH seviyelerini yükselterek koruyucu yönde etkinlik gösterdiği ileri sürülmüştür (133). Glutamin hücrelerde heksozamin,

nükleotid ve asparagin biyosentezinde esansiyeldir. Theanin gibi glutamin benzeri bileşiklerin başta GSH sentezi olmak üzere, sitrik asit döngüsüne (TCA) anaplerotik yakıt desteği, poliaminlerin biyosentezi ve prolin, serin, glisin gibi esansiyel olmayan aminoasitlerin sentezlenmesi açısından gereklidir. Öte yandan DOX uygulamasının özellikle mitokondriyal enerji metabolizmasında görev alan TCA ve elektron taşınım zincirinde (ETS) rol oynayan enzim ve proteinleri okside ettiği belirtilmektedir (134). Kanser kemoterapisinde hayati önem taşıyan metabolik yollar glikoliz, TCA ve ETS'dir. Bu yollar, DOX gibi kemoterapide uygulanan ajanların önemli bir hedefi olarak değerlendirilmektedir. Özellikle artan oksidatif stres ve tümör hücrelerinin hipoksi şartlarında, özellikle glikolizle ATP sentezi gerçekleştirdiği ve bu nedenle de TCA döngüsünün devamlılığının önem taşıdığı belirtilmektedir (135). Ayrıca DOX uygulamasının mitokondriyal kompleks I i inhibe ettiği belirtilmektedir (124). Theanin uygulamasının bu toksisite üzerine hem GSH düzeylerini yükselterek bu metabolik yollardaki enzim ve proteinleri koruyucu yönde etkinlik gösterebildiği hem de hücre içi glutamat düzeylerinin artışına ve dolayısıyla α -KG'a da dönüşerek TCA döngüsünün devamlılığını sağlayabileceği ve enerji metabolizmasını koruyucu yönde etkinlik gösteriyor olabileceği düşünülmüştür (112, 113, 136). Theaninin tümör hücrelerindeki glutamat taşıyıcılarını % 15 oranında inhibe ederek hücre dışı alanda glutamat seviyesinde artışa yol açtığı ve DOX gibi antitümör özellikteki ajanların etkinliğinin uzun sürmesini bu sayede sağladığı düşünülmektedir. Theaninin tümör hücrelerinde glutamat transportunu inhibe etmek suretiyle hücre içi GSH seviyelerinde azalmalara yol açtığı, normal hücrelerdeyse glutamat reseptörlerine bağlanmasıyla antikanser ilaçların akışkanlığını artırarak koruyucu etkinlik gösterdiği ileri sürülmüştür (76). Kanser hücrelerinin aksine sağlıklı hücreleri, theaninin antioksidan etkileriyle kemoterapötik ajanların zararlarından koruduğunu, bu etkisini ise yine hücre içi GSH seviyesini artırarak gerçekleştirdiği öne sürülmüştür (5-7).

Nitekim theaninin mitokondriyal membran potansiyelinin toksik etkilere karşı düzenlediği ve mitokondriyal hasarı ve apoptozisi engellediği, bu etkilerinin temelinde de GSH düzeylerini artırıcı ve çeşitli metabolik katkıların yattığı belirtilmektedir (58, 112, 113).

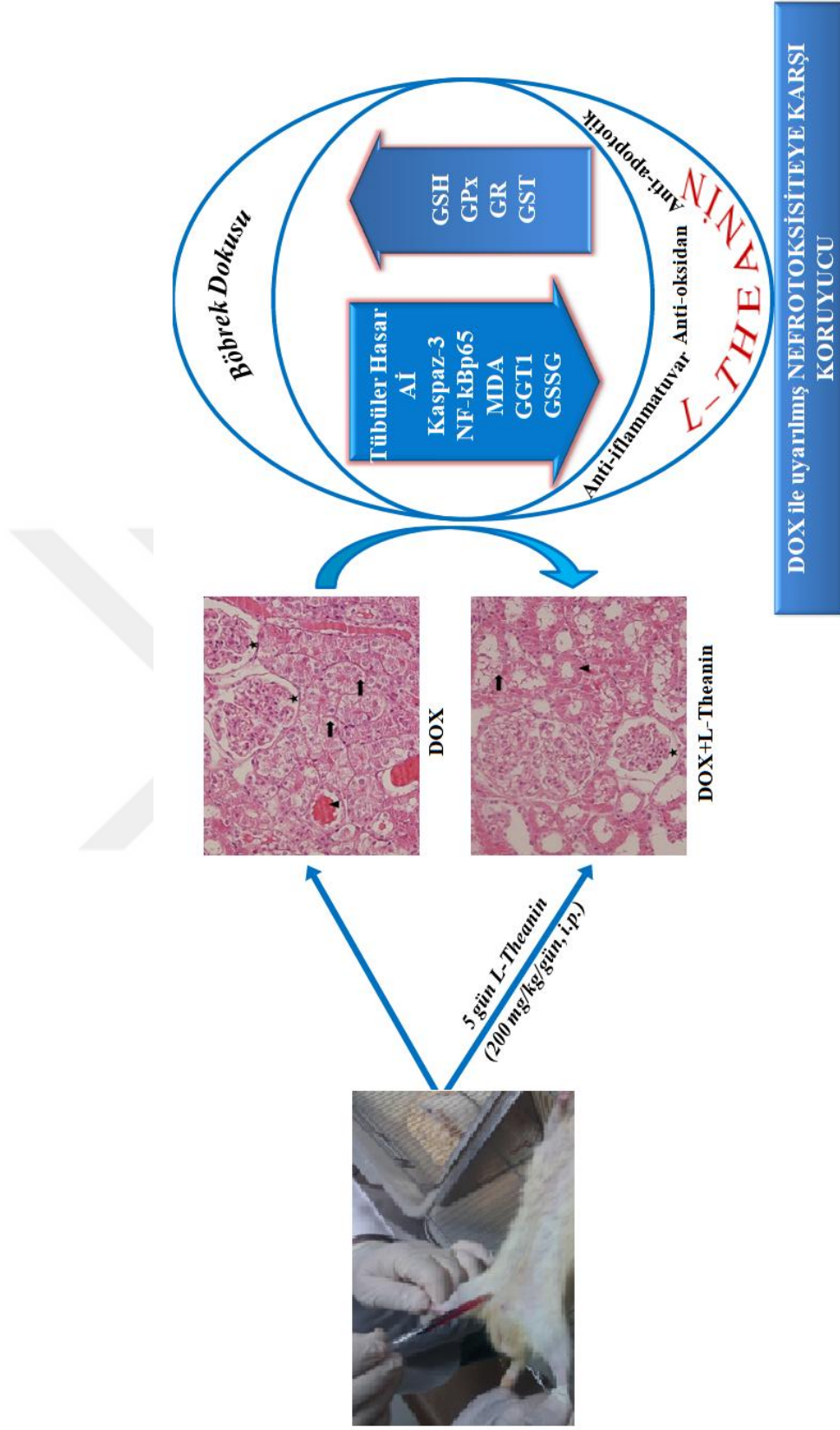
Theanin, DOX ile uyarılmış nefrotoksisitede, GPx aktivitesini artırıcı yönde etkinlik göstermiştir. Bu da theanin uygulamasının akut nefrotoksisitede hasara bir cevap olarak aktivite artışlarına yol açabileceğini düşündürmektedir. Ancak theaninin metabolitlerinden biri olan etilamin de GPx artışına neden olmuş olabilir. Etilamin mevolonat yolunu inhibe ederek izopentenil pirofosfat birikimine neden olmaktadır (116). İzopentenil pirofosfat ise selonoproteinlerin sentezini arttırmaktadır. GPx'in de selonoproteinlerden biri olduğu düşünüldüğünde, theaninin etilamin vasıtasıyla GPx enzim aktivitelerindeki artışlara katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmüştür (116).

Li ve ark. (112) alkol indüklü karaciğer toksisitesinde theaninin koruyucu etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, bizim bulgularımızla paralel olarak, GPx aktivite düzeylerinde, kontrol grubuyla toksik etkiye maruz kalan grup arasında anlamlı farklılık bulamamışlardır. Theanin uygulamasının karaciğer dokusunda önemli bir koruyucu etki oluşturduğu ve GPx aktivite düzeylerinde de artışa yol açtığı belirtilmektedir (137). Çilek özünün etkinliğinin incelendiği bir çalışmada DOX indüklü toksisitede yüksek GPx elde edilmiştir (138). Cui ve ark. (139) polifenollerce zengin ve theanin de içeren çayın, CCl₄ indüklü hepatotoksisitede GPx aktivitesinin artarak koruyucu yönde etkilerinin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Li ve ark. (112) theaninin, alkol kaynaklı hepatosit hasarını engellemede katalaz, süperoksit dismutaz, GSH ve GR düzeylerini artırıcı yönde etki ederek koruyucu etkinlik gösterdiği yönünde bulgular elde etmişlerdir. Bu çalışmalar kapsamında, hepatositlerdeki GR ve GPx düzeyleri bizim de çalışmamızla paralel bir şekilde diğer tüm gruplardan yüksek seviyelerde rapor edilmiştir. Yine Deng ve ark. (130) deney hayvanları karaciğerinde Escherichia coli indüklü oksidatif hasarı değerlendirdiklerinde, 100-300 mg/kg theanin uygulamasının GPx1 ekspresyonu ve aktivitelerinde, bulgularımızla benzer yönde, önemli yükselmeler olduğunu rapor etmişlerdir. Sumathi ve ark. (140, 141) toksik etkilere maruz kalan beyin dokusu hücrelerinde theaninin GPx, GR aktiviteleri ve GSH düzeylerini artırarak koruyucu etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Yeşil çay özünün sisplatin indüklü nefrotoksisite üzerine etkinliğinin incelendiği bir çalışmada Ahn ve ark. (142) BUN ve GGT düzeylerinin toksik ajan verilen gruplarda yüksek olduğunu, yeşil çay özünün verildiği gruplarda ise daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Ancak yeşil çayın bu etkisinin çay polifenolleri sayesinde olduğu vurgulanarak theaninle ilgili bir ifade kullanılmamıştır.

Theanin GSH seviyesini arttırarak ve/veya GST aktivitelerini yükselterek DOX'un zararlı etkisini bertaraf etmiş olabilir. Çünkü GSH artışı ile birlikte GST enzimi aracılığıyla GSH-DOX kompleksi oluşabilmektedir Böylece DOX'un detoksifikasyonu sağlanarak doku ve hücrelere zarar vermesi engellenebilmektedir (143).

Çalışmamızda kontrol grubu ile theanin grubu arasında incelediğimiz parametreler açısından önemli farklılıklar belirlenmemiştir. Bu noktada sağlıklı kişilerde theaninin; glutatyon ve ilişkili enzimlerin metabolizmalarına önemli ölçüde etkilerinin olmadığı düşünülebilir. Theaninin glutatyon metabolizmasını hangi yollar üzerinden düzenlediğini ve hangi mekanizmalarla nefrotoksisiteye karşı etkinlik gösterdiğini belirleyebilmek için bu kapsamda geliştirilmiş araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak L-theaninin; DOX ile nefrotoksisitenin uyarıldığı sıçanlarda, histopatolojik bulgular ile desteklenen anti-nekrotik, anti-iflamatuar ve anti-apoptoitk özellikler sergilediği, dehidratasyona karşı koruyucu etkileri olabileceği, oksidatif stresi azaltarak ve antioksidan mekanizmaları aktifleştirerek oksidan antioksidan dengesi antioksidanlar lehine kaydırıldığını söylemek mümkündür (Şekil 25). Öte yandan L-theaninin, böbrek dokusunda GST aktivitelerini arttırarak DOX'un hücrelerden uzaklaştırılması beraberinde detoksifikasyona katkı sağlayabildiği fikrini uyandırmıştır. Ayrıca theaninin böbrek dokusu üzerine koruyucu etkisini tam olarak hangi yolları düzenleyerek gösterdiğine dair ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.



Şekil 25. L-theaninin doksorubisin uygulanan sıçanlarda nefrotoksisite üzerine etkileri

8. ÖNERİLER

1. Bu çalışmada L-theaninin nefrotoksisitede, ağırlıklı olarak glutasyon metabolizması üzerinden koruyucu etkileri incelenmeye çalışıldı. Tam olarak hangi metabolik yollar ve/veya hormonlar üzerinden koruyucu etkinlikler gösterebildiğine yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilir.
2. Theaninin hücre içerisine taşınım mekanizması ve membranda bulunan sekonder habercilerle ve bağlantılı sinyal yollarıyla ilişkileri üzerine kapsamlı araştırmalar yapılabilir.
3. Theaninin enerji metabolizması üzerine özellikle Glikoliz, TCA ve ETS yollarıyla ilişkisi araştırılabilir.
4. Theanin, doğrudan çay veya diğer çay bileşenleri ya da özellikle antioksidan koruyucu etkileri olan diğer fonksiyonel gıdalarla birlikte verildiğinde gösterebileceği sinerjik etkiler araştırılabilir.
5. Theaninin nefrotoksisite üzerinde koruyucu etkilerinin olduğunu düşündüğümüz mevcut çalışmamızın klinik insan çalışmalarıyla desteklenmesine ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

9. KAYNAKLAR

1. Anderson RJ, Barry DW (2004). Clinical and laboratory diagnosis of acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18(1): 1-20.
2. Sakato Y (1949). The chemical constituents of tea: III. A new amide theanine. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 23: 262-267.
3. Vuong QV, Bowyer MC, Roach PD (2011). L-Theanine: properties, synthesis and isolation from tea. *J Sci Food Agric* 91(11): 1931-1939.
4. Yokogoshi H, Kato Y, Sagesaka YM, Takihara-Matsuura T, Kakuda T, Takeuchi N (1995). Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 59(4): 615-618.
5. Sugiyama T, Sadzuka Y, Nagasawa K, Ohnishi N, Yokoyama T, Sonobe T (1999). Membrane transport and antitumor activity of pirarubicin, and comparison with those of doxorubicin. *Jpn J Cancer Res* 90(7): 775-780.
6. Sugiyama T, Sadzuka Y (2003). Theanine and glutamate transporter inhibitors enhance the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents. *Biochim Biophys Acta* 1653(2): 47-59.
7. Sugiyama T, Sadzuka Y (2004). Theanine, a specific glutamate derivative in green tea, reduces the adverse reactions of doxorubicin by changing the glutathione level. *Cancer Lett* 212(2): 177-184.
8. Nagai K, Fukuno S, Otani K, Nagamine Y, Omotani S, Hatsuda Y, Myotoku M, Konishi H (2018). Prevention of doxorubicin-induced renal toxicity by theanine in rats. *Pharmacology* 101(3-4): 219-224.
9. Eralp MO (2013). Deneysel olarak oluşturulan böbrek iskemi reperfüzyon sonrası oluşan böbrek hasarına karşı Carnosol'un koruyucu etkisinin incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne.
10. Junqueira L, Carneiro J, Kelley R (1992). *Urinary System: Basic Histology*. Yedinci baskı. Appleton&Lange, Lebanon: 371-393.
11. Rosenfield AT, Taylor KJ, Crade M, DeGraaf CS (1978). Anatomy and pathology of the kidney by gray scale ultrasound. *Radiology* 128(3): 737-744.
12. David J, Newman M (2005). *Tietz basic prenciples in clinical chemistry*. Çev Ed Aslan D, Klinik kimyada temel ilkeler. Türkiye Palme Yayıncılık: 308-722.

13. Nyengaard JR (1999). Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol* 10(5): 1100-1123.
14. Longnecker DE. Available from: http://accessanesthesiology.mhmedical.com/data/books/long2/long2_c014f001.png. [Erişim Tarihi: 16.02.2018].
15. Alpern RJ, Moe OW, Preisig PA (1995). Chronic regulation of the proximal tubular Na/H antiporter: From HCO₃ to SRC. *Kidney Int* 48(5): 1386-1396.
16. Donnelly S (2001). Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a critmeter. *Am J Kidney Dis* 38(2): 415-425.
17. Erek E, Süleymanlar G, Serdengeçti K (2002). Nephrology, dialysis and transplantation in Turkey. *Nephrol Dial Transplant* 17(12): 2087-2093.
18. Pfaller W, Gstraunthaler G (1998). Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect* 106(Suppl 2): 559.
19. Chew D, DiBartola S (1989). Diagnosis and pathophysiology of renal disease. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 3rd ed Saunders Philadelphia: 1893-1961.
20. Parlakpınar H, Örum MH, Acet A (2013). İlaça bağlı nefrotoksisitede serbest oksijen radikalleri. *FÜ Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi* 27: 51-56
21. Lameire NH, Flombaum CD, Moreau D, Ronco C (2005). Acute renal failure in cancer patients. *Ann Med* 37(1): 13-25.
22. Van Vleet TR, Schnellmann RG (2003). Toxic nephropathy: environmental chemicals. *Semin Nephrol* 500-508.
23. Erkurt MA, Kuku İ, Kaya E, Aydoğdu İ, Bilim İÜTFH (2009). Cancer Chemotherapy and Kidney. *İnönü Üniv Tıp Fak Dergisi* 16(1): 63-68.
24. Parlakpınar H, Örum MH, Acet A (2012). Kafeik asit fenetil ester (KAFE) ve miyokardiyal iskemi reperfüzyon (MİR) hasarı. *İnönü Üniv Sağlık Bilimleri Dergisi* 1: 10-15.
25. Elsherbiny NM, El-Sherbiny M (2014). Thymoquinone attenuates Doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: Role of Nrf2 and NOX4. *Chem Biol Interact* 223: 102-108.
26. Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR (2005). The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB life* 57(2): 73-81.

27. Zhang Z, Yu X, Wang Z, Wu P, Huang J (2015). Anthracyclines potentiate anti-tumor immunity: A new opportunity for chemoimmunotherapy. *Cancer Lett* 369(2): 331-335.
28. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 16(25): 3267-3285.
29. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 65(2): 157-170.
30. Wallace KB (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 93(3): 105-115.
31. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56(2): 185-229.
32. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, Civelli M, Lamantia G, Colombo N, Curigliano G (2015). Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* 114:013777.
33. Su Z, Ye J, Qin Z, Ding X (2015). Protective effects of madecassoside against Doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. *Sci Rep* 5: 18314.
34. Ricevuto E, Cocciolone V, Mancini M, Cannita K, Romano S, Bruera G, Pelliccione M, Adinolfi MI, Ciccozzi A, Bafile A (2015). Dose-dense nonpegylated liposomal Doxorubicin and docetaxel combination in breast cancer: dose-finding study. *Oncologist* 20(2): 109-110.
35. Galant A, Preuss ML, Cameron J, Jez JM (2011). Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products. *Front Plant Sci* 2: 45.
36. Keen JH, Habig WH, Jakoby WB.(1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 251(20): 6183-6188.
37. Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H (1977). Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 107(1): 51-60.
38. Flohé L (2013). The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3139-3142

39. Kinnula VL, Pääkkö P, Soini Y (2004). Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS letters* 569(1-3): 1-6.
40. Bender, D. A. (2012). Amino acids synthesized from glutamate: glutamine, proline, ornithine, citrulline and arginine. *Amino Acid Metabolism*, Third Edition, Wiley-Blackwell, Indianapolis 157-223.
41. Carlberg I, Mannervik B (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113: 484-490.
42. Krofič Žel M, Tozon N, Nemeč Svete A (2014). Plasma and erythrocyte glutathione peroxidase activity, serum selenium concentration, and plasma total antioxidant capacity in cats with IRIS stages I–IV chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 28(1): 130-136.
43. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta General Sub.* 839(1): 62-70.
44. Engel LS, Taioli E, Pfeiffer R, Garcia-Closas M, Marcus PM, Lan Q, Boffetta P, Vineis P, Autrup H, Bell DA (2002). Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 156(2): 95-109.
45. Waring WS, Moonie A (2011). Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. *Clin Toxicol* 49(8): 720-728.
46. Boyland E, Chasseaud L (1969). The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32: 173-219.
47. Tozkoparan B, Aytaç SP (2007). Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon s-transferazlar. *Hacettepe Üniv Ecz Fak Dergisi* 27(2): 139-164.
48. Nakajima T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Hayashi T, Abe T, Kato J, Sakon K, Naniwa Y, Tanabe H (2003). Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase- π -specific inhibitor O1-hexadecyl- γ -glutamyl-S-benzylcysteinyl-d-phenylglycine ethylester. *J Pharmacol Exp Ther* 306(3): 861-869.

49. Emdin M, Pompella A, Paolicchi A. (2005). Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Circulation* 112:2078-2080
50. Forman HJ, Zhang H, Rinna A (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30(1): 1-12.
51. Şener A, Çevik Ö (2013). Gama-glutamil transferazın oksidatif stres ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi. *Cumhuriyet Med J* 35(2): 291-301.
52. Yıldız OG, Soyuer S, Soyuer I, Kadir U, Gündoğ M, Kaplan B, Özkan M (2007). Gastrektomi sonrası adjuvan kemoradyoterapi uygulanan mide karsinomlu olgularda NF- κ B'nin prognostik önemi. *Türk Onkoloji Dergisi* 22(2): 69-73.
53. Schröder NW, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zähringer U, Göbel UB, Schumann RR (2000). Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*. *J Immunol* 165(5): 2683-2693.
54. Nithipongvanitch R, Ittarat W, Cole MP, Tangpong J, Clair DK. S, Oberley TD (2007). Mitochondrial and nuclear p53 localization in cardiomyocytes: redox modulation by doxorubicin (Adriamycin). *Antioxid Redox Signal* 9(7): 1001-1008.
55. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B (1998). Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273(40): 25573-25580.
56. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *PNAS Science* 92(16): 7162-7166.
57. Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science AAAS* 281(5381): 1309-1311.
58. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22(4): 526.

59. Juneja LR, Chu D-C, Okubo T, Nagato Y, Yokogoshi H (1999). L-theanine—a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans. *EFFoST* 10(6): 199-204.
60. Barros L, Ferreira IC (2017). Phytochemicals and their effects on human health. *Curr Pharm Des* 873-4286. 23:19.
61. Alasalvar C, Pelvan E, Özdemir KbS, Kocadağlı T, Mogol BeA, Paslı AaA, Özcan N, Özçelik B, Gökmen V (2013). Compositional, nutritional, and functional characteristics of instant teas produced from low-and high-quality black teas. *J Agric Food Chem* 61(31): 7529-7536.
62. Chatterjee S, Chatterjee A, Bandyopadhyay SK. L-Theanine: A Prospective Natural Medicine. *Int. J. Pharm Sci Rev Res* 41(2): 95-103
63. Narukawa M, Toda Y, Nakagita T, Hayashi Y, Misaka T (2014). L-Theanine elicits umami taste via the T1R1+ T1R3 umami taste receptor. *Amino Acids* 46(6): 1583.
64. Li P, Wan X-C, Zhang Z-Z, Li J, Shen Z-J (2005). A novel assay method for theanine synthetase activity by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 819(1): 81-84.
65. Türközü D, Şanlıer N (2017). L-theanine, unique amino acid of tea, and its metabolism, health effects, and safety. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57(8): 1681-1687.
66. Ruan J, Ma L, Yang Y (2012). Magnesium nutrition on accumulation and transport of amino acids in tea plants. *J Sci Food Agric* 92(7): 1375-1383.
67. Wang Q, Min C, Zhu F, Xin Y, Zhang S, Luo L, Yin Z (2011). Production of bioactive γ -glutamyl transpeptidase in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner and application of the recombinant enzyme to L-theanine synthesis. *Curr Microbiol* 62(5): 1535-1541.
68. Unno T, Suzuki Y, Kakuda T, Hayakawa T, Tsuge H (1999). Metabolism of theanine, γ -glutamylethylamide, in rats. *J Sci Food Agric* 47(4): 1593-1596.
69. Tsuge H, Sano S, Hayakawa T, Kakuda T, Unno T (2003). Theanine, γ -glutamylethylamide, is metabolized by renal phosphate-independent glutaminase. *Biochim Biophys Acta* 1620(1): 47-53.
70. Van der Pijl P, Chen L, Mulder T (2010). Human disposition of L-theanine in tea or aqueous solution. *J Funct Foods* 2(4): 239-244.

71. Kakuda T, Hinoi E, Abe A, Nozawa A, Ogura M, Yoneda Y (2008). Theanine, an ingredient of green tea, inhibits [3H] glutamine transport in neurons and astroglia in rat brain. *J Neurosci Res* 86(8): 1846-1856.
72. Rao TP, Ozeki M, Juneja LR (2015). In search of a safe natural sleep aid. *J Am Coll Nutr* 34(5): 436-447.
73. Fisunoğlu M (2007). Theanine amino asidinin plazma serbest amino asit ve antioksidan kapasite düzeyine etkisi üzerine bir çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
74. Lee JE, Lee BJ, Chung JO, Kim HN, Kim EH, Jung S, Lee H, Lee SJ, Hong Y-S (2015). Metabolomic unveiling of a diverse range of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites dependent on geography. *Food Chem* 174: 452-459.
75. Cho HS, Kim S, Lee SY, Park JA, Kim SJ, Chun HS (2008). Protective effect of the green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death. *Neurotoxicology* 29(4): 656-662.
76. Friedman M (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res* 51(1): 116-134.
77. Zheng G, Sayama K, Okubo T, Juneja LR, Oguni I (2004). Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In Vivo* 18(1): 55-62.
78. Barrett JR, Tracy DK. , Giaroli G (2013). To sleep or not to sleep: a systematic review of the literature of pharmacological treatments of insomnia in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 23(10): 640-647.
79. Kakuda T, Nozawa A, UNNo T, OKAMURA N, OKAI O (2000). Inhibiting effects of theanine on caffeine stimulation evaluated by EEG in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(2): 287-293.
80. Jang H-S, Jung JY, Jang I-S, Jang K-H, Kim S-H, Ha J-H, Suk K, Lee M-G (2012). L-theanine partially counteracts caffeine-induced sleep disturbances in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 101(2): 217-221.
81. Nobre AC, Rao A, Owen GN (2008). L-theanine, a natural constituent in tea, and its effect on mental state. *Asia Pac J Clin Nutr* 17 Suppl 1: 167-168.

82. Nathan PJ, Lu K, Gray M, Oliver C (2006). The neuropharmacology of L-theanine (N-ethyl-L-glutamine) a possible neuroprotective and cognitive enhancing agent. *J Herb Pharmacother* 6(2): 21-30.
83. Egashira N, Hayakawa K, Osajima M, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M (2007). Involvement of GABAA receptors in the neuroprotective effect of theanine on focal cerebral ischemia in mice. *J Pharmacol Sci* 105(2): 211-214.
84. Mu W, Zhang T, Jiang B (2015). An overview of biological production of L-theanine. *Biotechnol Adv* 33(3): 335-342.
85. Egashira N, Kurauchi K, Iwasaki K, Mishima K, Orito K, Oishi R, Fujiwara M (2008). Schizandrin reverses memory impairment in rats. *Phytother Res* 22(1): 49-52.
86. Miodownik C, Maayan R, Ratner Y, Lerner V, Pintov L, Mar M, Weizman A, Ritsner MS (2011). Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and cortisol to sulfate of dehydroepiandrosterone molar ratio associated with clinical response to L-theanine as augmentation of antipsychotic therapy in schizophrenia and schizoaffective disorder patients. *Clin Neuropharmacol* 34(4): 155-160.
87. Nakamura K, Nemani VM, Azarbal F, Skibinski G, Levy JM, Egami K, Munishkina L, Zhang J, Gardner B, Wakabayashi J (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein. *J Biol Chem* 286(23): 20710-20726.
88. Jiang W, Gao M, Sun S, Bi A, Xin Y, Han X, Wang L, Yin Z, Luo L (2012). Protective effect of L-theanine on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 422(2): 344-350.
89. Pérez-Vargas J, Zarco N, Vergara P, Shibayama M, Segovia J, Tsutsumi V, Muriel P (2016). L-Theanine prevents carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of nuclear factor κ B and down-regulation of transforming growth factor β and connective tissue growth factor. *Hum Exp Toxicol* 35(2): 135-146.
90. Kurihara S, Shibahara S, Arisaka H, Akiyama Y (2007). Enhancement of antigen-specific immunoglobulin G production in mice by co-administration of L-cystine and L-theanine. *J Vet Med Sci* 69(12): 1263-1270.

91. Takagi Y, Kurihara S, Higashi N, Morikawa S, Kase T, Maeda A, Arisaka H, Shibahara S, Akiyama Y (2010). Combined administration of L-cystine and L-theanine enhances immune functions and protects against influenza virus infection in aged mice. *J Vet Med Sci* 72(2): 157-165.
92. Zhang G, Miura Y, Yagasaki K (2001). Inhibitory effects of theanine and sera from theanine-fed rats on receptor-mediated cancer cell invasion beneath mesothelial-cell monolayers. *Cytotechnology* 36(1): 195-200.
93. Yoto A, Motoki M, Murao S, Yokogoshi H (2012). Effects of L-theanine or caffeine intake on changes in blood pressure under physical and psychological stresses. *J Physiol Anthropol* 31(1): 28.
94. Shen H, Shen X, Wang R, Wu M (2011). Effects of theanine on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Wei Sheng Yan Jiu=J Hygiene Res* 40(6): 684-687.
95. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1-2): 248-254.
96. Gülmen Ş, Doğuç DK. , Ceylan BG, Çetin NK, Meteöglu İ, Okutan H, Öcal A (2011). The effect of beta-glucan on kidney injury in experimental aortic ischemia-reperfusion. *Turk Gogus Kalp Dama* 19(2): 234-241.
97. Sancak EB, Akbas A, Silan C, Cakir DU, Turkon H, Ozkanli SS (2016). Protective effect of syringic acid on kidney ischemia-reperfusion injury. *Ren Fail* 38(4): 629-635.
98. Ulusoy S, Ozkan G, Mungan S, Orem A, Yulug E, Alkanat M, Yucesan FB (2014). GSPE is superior to NAC in the prevention of contrast-induced nephropathy: Might this superiority be related to caspase 1 and calpain 1. *Life Sci* 103(2): 101-110.
99. Yagi K (1984). Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 105: 328-331.
100. Uchiyama M, Mihara M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86(1): 271-278.

101. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1(6): 529-539.
102. Sharma E, Joshi, R, Gulati A (2018). L-Theanine: An astounding sui generis integrant in tea. *Food Chem* 242: 601-610.
103. Walters J, Bukowski JF (2014). U.S. Patent App No. 13/921,123.
104. Nagai K, Konishi H (2013). Protection of theanine against doxorubicin-induced acute cardiac toxicity. *Biomed Preventive Nutr* (2): 197-199.
105. Nagai K, Oda A, Konishi H (2015). Theanine prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity by reducing intrinsic apoptotic response. *Food Chem Toxicol* 78: 147-152.
106. Zhao YL, Zhou GD, Yang HB, Wang JB, Shan LM, Li RS, Xiao XH (2011). Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Food Chem Toxicol* 49(8): 1705-1710.
107. Li C, Tong H, Yan Q, Tang S, Han X, Xiao W, Tan Z (2016). L-theanine improves immunity by altering TH2/TH1 cytokine balance, brain neurotransmitters, and expression of phospholipase C in rat hearts. *Med Sci Monit* 22: 662.
108. Oliveira ML, Antunes LMG, Francescato HC, Bianchi MP (2003). The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 47(6): 517-522.
109. Robinson BE, Weber H (2002). Dehydration despite drinking: beyond the BUN/creatinine ratio. *J Am Med Dir Assoc* 3(6): 386-389.
110. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Matsubara BB (2015). Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cell Physiol Biochem* 35(5): 1924-1933.
111. Tulubas F, Gurel A, Oran M, Topcu B, Caglar V, Uygur E (2015). The protective effects of ω -3 fatty acids on doxorubicin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicol Ind Health* 31(7): 638-644.

112. Li G, Ye Y, Kang J, Yao X, Zhang Y, Jiang W, Gao M, Dai Y, Xin Y, Wang Q (2012). L-Theanine prevents alcoholic liver injury through enhancing the antioxidant capability of hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 50(2): 363-372.
113. Zhang Q, Liu M, Ruan J (2017). Integrated transcriptome and metabolic analyses reveals novel Insights into free amino acid metabolism in huangjinya tea cultivar. *Front Plant Sci* 8: 291.
114. Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer CJ, Végran F, Verrax J, Kennedy KM, Moon EJ, Dhup S, Danhier P, Frérart F (2012). Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PloS one* 7(3): e33418.
115. Verdegem D, Moens S, Stapor P, Carmeliet P (2014). Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism. *Cancer Metab* 2(1): 19.
116. Li C, Yan Q, Tang S, Xiao W, Tan Z (2018). Alteration of Mevalonate Pathway in Rat Splenic Lymphocytes: Possible Role in Cytokines Secretion Regulated by L-Theanine. *BioMed Res Int* 2018:1497097.
117. Ijaz A, Javed I, Aslam B, Khan JA, Khaliq T, Khan MZ, Iqbal Z, Naeem MA, Ashraf MM (2016). Nephroprotective and Antioxidant Effects of Moringa Oleifera (Sohanjna) in Paracetamol Induced Nephrotoxic Albino Rabbits. *Pak Vet J* 36(3): 292-296.
118. Safari T, Nematbakhsh M, Miri S, Ghofran O, Fereidooni F, Niazi A, Bagheri H (2017). Gender differences in response to vitamin E and C in gentamicin induced nephrotoxicity in Wistar rats. *J Nephropathol* 6(4): 338-345.
119. Ugur S, Ulu R, Dogukan A, Gurel A, Yigit IP, Gozel N, Aygen B, Ilhan N (2015). The renoprotective effect of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Ren Fail* 37(2): 332-336.
120. Frederiksen LJ, Siemens DR, Heaton JP, Maxwell LR, Adams MA, Graham CH (2003). Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate. *J Urol* 170(3): 1003-1007.
121. Jones DP (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Methods Enzymol* 348: 93-112.

122. Hanigan MH, Ricketts WA (1993). Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express γ -glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 32(24): 6302-6306.
123. Chinta SJ, Kumar JM, Zhang H, Forman HJ, Andersen JK (2006). Up-regulation of γ -glutamyl transpeptidase activity following glutathione depletion has a compensatory rather than an inhibitory effect on mitochondrial complex I activity: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 40(9): 1557-1563.
124. Yamamoto S, Watanabe B, Hiratake J, Tanaka R, Ohkita M, Matsumura Y (2011). Preventive effect of GGsTop, a novel and selective γ -glutamyl transpeptidase inhibitor, on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 339(3): 945-951.
125. Ozaki T, Ishiguro S-i, Itoh H, Furuhashi K, Nakazawa M, Yamashita T (2013). Cisplatin binding and inactivation of mitochondrial glutamate oxaloacetate transaminase in cisplatin-induced rat nephrotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem* 77(8): 1645-1649.
126. Mahajan S, Atkins W (2005). The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cell Mol Life Sci* 62(11): 1221-1233.
127. Hassan HA, Edrees GM, Gamel EM, Sayed EA (2014). Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by grape seed extract and fish oil is mediated by lowering oxidative stress and DNA damage. *Cytotechnology* 66(3): 419-429.
128. Omobowale TO, Oyagbemi AA, Ajufo UE, Adejumobi OA, Ola-Davies OE, Adedapo AA, Yakubu MA (2017). Ameliorative effect of gallic acid in doxorubicin-induced hepatotoxicity in wistar rats through antioxidant defense system. *J Diet Suppl:* 1-14.
129. Jones DP (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Methods Enzymol* 348: 93-112.
130. Deng Y, Xiao W, Chen L, Liu Q, Liu Z, Gong Z (2016). In vivo antioxidative effects of l-theanine in the presence or absence of *Escherichia coli*-induced oxidative stress. *J Funct Foods* 24: 527-536.

131. Sentellas S, Morales-Ibanez O, Zanuy M, Albertí JJ (2014). GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 28(5): 1006-1015.
132. Cao Y, Kennedy R, Klimberg VS (1999). Glutamine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Surg Res* 85(1): 178-182.
133. Kim HJ, Park DJ, Kim JH, Jeong EY, Jung MH, Kim TH, Yang JI, Lee GW, Chung HJ, Chang S-H (2015). Glutamine protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing cisplatin accumulation. *J Pharmacol Sci* 127(1): 117-126.
134. Zhao Y, Miriyala S, Miao L, Mitov M, Schnell D, Dhar S, Cai J, Klein J, Sultana R, Butterfield D (2014). Redox proteomic identification of HNE-bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on energy metabolism after doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med* 72: 55-65.
135. Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 52(5), 507-526.
136. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P (2015). Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circ Res* 116(7): 1231-1244.
137. Wang D, Gao Q, Wang T, Qian F, Wang Y (2017). Theanine: the unique amino acid in the tea plant as an oral hepatoprotective agent. *Asia Pac J Clin Nut* 26(3): 384.
138. Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Gasparri M, Forbes-Hernandez TY, Afrin S, Bompadre S, Rubini C, Zizzi A, Astolfi P, Santos-Buelga C (2016). Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 94: 128-137.
139. Cui Y, Yang X, Lu X, Chen J, Zhao Y (2014). Protective effects of polyphenols-enriched extract from Huangshan Maofeng green tea against CCl₄-induced liver injury in mice. *Chem Biol Interact* 220: 75-83.
140. Sumathi T, Asha D, Nagarajan G, Sreenivas A, Nivedha R (2016). L-theanine alleviates the neuropathological changes induced by PCB (Aroclor 1254) via inhibiting upregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress in rat brain. *Environ Toxicol Pharmacol* 42: 99-117.

141. Sumathi T, Shobana C, Thangarajeswari M, Usha R (2015). Protective effect of L-theanine against aluminium induced neurotoxicity in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rat brain–histopathological, and biochemical approach. *Drug Chem Toxicol* 38(1): 22-31.
142. Ahn T-G, Kim H-K, Park S-W, Kim S-A, Lee B-R, Han SJ (2014). Protective effects of green tea polyphenol against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Obstet Gynecol* 57(6): 464-470.
143. Asakura T, Ohkawa K, Takahashi N, Takada K, Inoue T, Yokoyama S (1997). Glutathione-doxorubicin conjugate expresses potent cytotoxicity by suppression of glutathione S-transferase activity: comparison between doxorubicin-sensitive and-resistant rat hepatoma cells. *Br J Cancer Suppl* 76(10): 1333.

10. ETİK KURUL ONAY BELGESİ

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı : "L-Theaninin Doksorubisin Uygulanan Sıçanlarda Nefrotoksisite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi"
Çalışmacılar : Prof.Dr.Birgöl V. KURAL, Doktora Öğr.Yahya ALTINKAYNAK, Y.Doç.Dr.Buket A. AKCAN, Prof.Dr.Esin YULUĞ, Y.Doç.Dr.Sevdegül MÜNGAN, Arş.Gör.Serap ÖZER YAMAN, Vet.Hekim Sait AL, Y.Doç.Dr.Fulya BALABAN YÜCESAN, Prof.Dr.Asım ÖREM
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya

Etik Kurul Dosya No 2016/ 26	Etik Kurul Toplantı Tarihi 21/06/2016	Etik Kurul Toplantı No 2016-08	Etik Kurul Karar No 2
------------------------------------	---	--------------------------------------	-----------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Bilal KUTRUP'un başkanlığında toplanıp; "L-Theaninin Doksorubisin Uygulanan Sıçanlarda Nefrotoksisite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlığını taşıyan tez çalışmanın. Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (21.06.2016)

Prof. Dr. Bilal KUTRUP
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı Yahya ALTINKAYNAK
Doğum Tarihi/Yeri 1984 / ERZURUM
E-posta yahyaaltinkaynak@ardahan.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Fakülte/Bölüm	Üniversite	Yıl
Doktora	:SABE/Tıbbi Biyokimya AbD	KTÜ	2018
Yüksek Lisans	:SABE/Tıbbi Biyokimya AbD	KTÜ	2012
Lisans	:Fen Fak./Biyoloji	Atatürk Üniversitesi	2009

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

Öğretim Görevlisi: Ardahan Üniversitesi N.D. Göle MYO Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü (2013- Devam ediyor.)

YABANCI DİL

İngilizce (İyi) : (YÖKDİL: 2017: 76.25 ÜDS: 2009: 63.75)

YAYINLAR/BİLDİRİLER

Yüksek Lisans Tezi: Postprandial Lipemide Serum Paraoksonaz Aktivitesinin İncelenmesi (Danışman: Prof. Dr. Asım ÖREM) Trabzon 2012.

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Orem, A., Yaman, S. O., Altinkaynak, B., Kural, B. V., Yucesan, F. B., Altinkaynak, Y., Orem, C. (2018). Relationship between postprandial lipemia and atherogenic factors in healthy subjects by considering gender differences. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 480:34-40. doi: 10.1016/j.cca.2018.01.038.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1- Relationship between LDL subfractions and postprandial lipemia in healthy subjects, Örem A, Özer Yaman S, Akcan Altinkaynak B, Kural B, Balaban Yücesan F, Altinkaynak Y, Örem C, Atherosclerosis, 2017, 263, 210 211

2- Postprandial lipemide oksidan-antioksidan durumun belirlenmesi. M. Rahimi, F. Balaban Yucesan, H. Kara, A. Orem, B. Akcan Altinkaynak, B. Vanizor Kural, S. Ozer Yaman, Y. Altinkaynak, C. Orem. The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808 P-09.04.4-045

3- Beslenmenin Dolaşımdaki Endotelial Progenitor Hücre (EPC) Seviyesine Etkisi. B. Akcan Altinkaynak, Y. Altinkaynak, B. Vanizör Kural, F. Balaban Yücesan, C. Örem, A. Örem. 2014 Annual Conference & Exhibition; Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products, and Dietary Supplements 14-17 October 2014, İstanbul-Turkey

4- Investigation of Serum Paraoxonase 1 (PON1) Activity in Postprandial Lipemia. Y. Altinkaynak, B. Vanizor Kural, C. Orem, F. Balaban Yucesan, B. Akcan, A. Orem. IFCC WorldLab Istanbul 2014 – Istanbul, 22-26 June 2014 DOI 10.1515/cclm-2014-4040 Clin Chem Lab Med 2014; 52, Special Suppl, pp S1 – S1760, June 2014

KATILDIĞI BİLİMSEL TOPLANTILAR

1- IFCC WorldLab Istanbul 2014 – Istanbul, 22-26 June 2014

2- Uygulamalı Kromatografik Analiz Çalıştayı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü, Mayıs 2011 Trabzon, TÜRKİYE.

3- Uluslararası Meslek Yüksekokulları Sempozyumu, Ekim 2013, Ardahan, Türkiye

PROJE/ BURSLAR

1- L-Theaninin Doksorubisin Uygulanan Sıçanlarda Nefrotoksisite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. TÜBİTAK 3001. Proje desteklenme karar tarihi: 11/01/2017 Proje no: 216z025

2- Postprandiyal lipemide, dolaşımdaki endotelial progenitor hücre (EPC) düzeyi. KTÜ BAP Proje No: 2010 114 001.3

SERTİFİKA, KURS ve EĞİTİMLER

1. Uygulamalı Kromatografik Analiz Çalıştayı, KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 29 Nisan-1 Mayıs 2011, Trabzon.

