

**SİSPLATİN VERİLMİŞ SIÇANLARIN
BÖBREK HÜCRELERİNDE cAMP'İNİN
RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ENZİM
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hilal ALTINKAYNAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSPLATİN VERİLMİŞ SIÇANLARIN BÖBREK HÜCRELERİNDE cAMP'İN
RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

HİLAL ALTINKAYNAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN

PROF. DR. ZAFER EREN

SAMSUN-2009

T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma, jürimiz tarafından 04/02/2009 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Zafer EREN

Üye: Prof. Dr. Belma DURUPINAR

Üye: Yrd. Doç. Dr. Emine DIRAMAN

ONAY:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2009

Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

SİSPLATİN VERİLMİŞ SIÇANLARIN BÖBREK HÜCRELERİNDE cAMP'İN RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada sisplatin ve cAMP uygulanan sıçanların böbrek hücrelerinde cAMP'nin radikal süpürücü bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve malondialdehit (MDA) düzeyine etkileri araştırıldı.

Çalışma için 100 adet *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Kontrol, sisplatin, cAMP ve sisplatin+cAMP olarak dört ana grup oluşturuldu. Her gruptan 5 hayvan olacak şekilde toplam 20 sıçan rastgele seçildi ve 4, 8, 12, 24 ve 48 saatleri için gruplara sisplatin ve cAMP uygulamaları yapıldı.

Çalışmamızda sisplatin verilen grupların, 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlere göre, kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırılmaları sonucunda SOD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Sadece 8. saatte anlamlı olmasa da sisplatin grubunun SOD değerinin kontrol grubuna göre azaldığı, sisplatin+cAMP grubunda ise sisplatin grubuna göre SOD değerinin arttığı görülmüştür.

Sisplatin grubunun MDA düzeylerinin 4. ve 24. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. 8. ve 12. saatte sisplatin gruplarının MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış gösterdiği ve bu artışın sisplatin ve cAMP'nin birlikte uygulanmasıyla biraz azaldığı gözlenmiştir. Sisplatin grubu MDA değeri 8. saatte cAMP grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. 4. ve 8. saatlerde sisplatin+cAMP grupları MDA değerleri cAMP grubuna göre anlamlı olarak fazlaydı.

Sisplatin uygulanmış sıçanların böbrek hücrelerinde cAMP'nin SOD ve MDA seviyeleri üzerine etkilerini kesin olarak ifade edebilmek için daha ayrıntılı araştırmalara gerek olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: cAMP, MDA, SOD, Sisplatin

INVESTIGATION OF cAMP EFFECTS ON RADICAL SCAVENGING ENZYME ACTIVITIES IN KIDNEY CELLS OF CISPLATIN TREATED RATS

ABSTRACT

In this study, the effects of cAMP were investigated on SOD activity and MDA level in the kidney cells of cisplatin and cAMP treated rats.

100 *Wistar albino* rats were used. Four main groups were formed as control, cisplatin, cAMP and cisplatin+cAMP. Totally 20 rats were selected randomly that each groups have consist of 5 animals. Cisplatin and cAMP were treated to groups for 4th, 8th, 12th, 24th and 48th hours.

In our study, according to comparison cisplatin treated groups with control group, SOD values at 4th, 8th, 12th, 24th and 48th hours were no statistically differences. Whereas, cisplatin groups' SOD values were decreased not significantly according to control groups at 8th although cisplatin+cAMP groups' SOD values were increased according to cisplatin groups.

MDA levels of cisplatin group in 4th and 24th hours were decreased significantly according to control groups. MDA levels of cisplatin groups in 8th ve 12th hours were increased according to control groups and observed a little decreased in cis+cAMP group but results not significant. MDA value of cisplatin group in 8th hours were increased significantly according to cAMP groups. MDA values of cisplatin+cAMP groups in 4th and 8th hours were increased significantly according to cAMP groups.

We concluded that more detailed investigations are needed to certain express of cAMP on SOD and MDA levels.

Key words: cAMP, MDA, SOD, cisplatin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi ve tecrübesi ile yol gösteren, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zafer EREN'e,

Katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Emine DIRAMAN ve Yrd. Doç. Dr. Banu EREN'e,

Yardımları ve destekleri için Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri Araş. Gör. Gönül AKBAL, Araş. Gör. Gülhan ATAGÜN, Araş. Gör. Günnur DEMİRCAN, Araş. Gör. İrem GÜRKANLI, Araş. Gör. Yeliz MİROĞLU ve Araş. Gör. Sevcan MERCAN'a,

Her zaman yanımda olan arkadaşım Araş. Gör. Dr. Arzu GÜRSOY ve Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım Bio. Sevin ŞEN ŞEKERLİ'ye,

İstatistiksel analizlerimde büyük yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. N. Alp ERİLLİ'ye;

Biyoloji bölümündeki hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Benden desteğini esirgemeyen aileme,

Sonsuz teşekkürler....

SİMGELER VE KISALTMALAR

- cAMP : Siklik adenzin monofosfat
SOD : Süperoksit dismutaz
MDA : Malondialdehit
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
O₂⁻ : Süperoksit
OH : Hidroksil
DNA : Deoksiribonükleik asit
RNA : Ribonükleik asit
ROS : Reaktif oksijen türleri
TNF-alfa : Tümör nekroz faktör-alfa
MnSOD : Mangan süperoksit dismutaz
CuZnSOD : Bakır çinko süperoksit dismutaz
GSH : Glutasyon
ATP : Adenzin trifosfat
AMP : Adenzin monofosfat
PKA : Proteinkinaz A
NADH : Nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen
PMN : Polimorfonükleer lökosit
ER : Endoplazmik Retikulum
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfohidrojen
Cu : Bakır
Fe : Demir
GSH-Px : Glutasyon peroksidaz
Mn: Mangan
NOS : Nitrik oksit sentaz
NO : Nitrik oksit
ONOO : Peroksinitrit
HOCl : Hipokloröz asit
FDA : Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
NAC : N-asetilsistein
MAPK : Mitojen aktive eden protein kinaz

ANP : Atrial natriüretik peptit

CREB : Döngüsel AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein

EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Serbest Radikaller	5
2.1.1. Serbest Radikal Tanımı	5
2.1.2. Serbest Radikal Kaynakları	6
2.1.2.1. Serbest Radikaller Oluşturan Eksojen (Dış) Kaynaklı Etmenler	7
2.1.2.2. Serbest Radikaller Oluşturan Endojen (İçsel) Kaynaklı Etmenler	7
2.2. Oksijen ve Oksijen Radikalleri	9
2.2.1. Süperoksit Radikali (O ₂)	11
2.2.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	12
2.2.3. Hidroksil Radikali (OH [•])	13
2.2.4. Nitrik Oksit (NO) ve Peroksinitrit (ONOO)	14
2.2.4. Lipit Peroksil Radikali (LOO)	14
2.2.5. Hipokloröz Asit (HOCl)	15
2.2.6. Singlet Oksijen	15
2.2.7. Oksidatif Stres	16
2.4. Antioksidanlar-Serbest Radikal Hasarına Karşı Hücrel Savunma (Radikal Süpürücüler)	17
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar (Serbest Radikal Süpürücüler)	17
2.4.1.1. SOD (Superoxide oxidoreductase, EC 1.15.1.1)	18
2.4.1.2. Katalaz (EC 1.11.1.6)	19
2.4.1.3. Glutasyon redüktaz ve Glutasyon peroksidaz	19
2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar (Serbest Radikal Süpürücüler)	20
2.4.2.1. E vitamini (alfa-tokoferol)	21
2.4.2.2. Karatenoidler	21
2.4.2.3. Askorbat (Cvitamini)	21
2.4.2.4. Ürik asit (Ürat)	21
2.4.2.5. Melatonin	21

2.5. Serbest Radikaller ve Hücresel Hasar	22
2.5.1. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkisi	22
2.5.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi	23
2.5.3. Membran Lipitlerine Etkisi	24
2.5.4. Lipit Peroksidasyonu	25
2.6. Kanser ve Serbest Radikaller	27
2.7. Böbrek Dokusu ve Serbest Radikaller	28
2.8. Sisplatin	30
2.8.1. Sisplatin ve Böbrek Hasarı	31
2.9. cAMP (Siklik AMP)	34
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Kullanılan Aletler	39
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.3. Araştırma Gruplarının Oluşturulması	39
3.4. Doku Örneklerinin Alınması	40
3.4.1. Doku Örneklerinde Aktivite Öncesi Uygulanan İşlemler	40
3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	41
3.5.1. SOD Aktivite Tayini	41
3.5.2. MDA Analizi	42
3.6. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. SOD Aktivitesi Sonuçları	44
4.2. MDA Konsantrasyon Sonuçları	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
6. KAYNAKLAR	54
7. ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
2.1 Serbest radikal reaksiyonu	5
2.2 Oksijenin dört elektron alarak suya indirgenme basamakları	10
2.3 Haber – Weiss Tepkimesi ve Fenton Tepkimesi	14
2.4 Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasar	16
2.5 SOD'un katalizlediği tepkime	18
2.6 Enzimatik antioksidanlar	20
2.7 Serbest radikal aracılı hücrel hasar	22
2.8 DNA hasarı oluşturan serbest radikal kaynakları	24
2.9 Lipit peroksidasyonu basamakları	26
2.10 Sisplatinin yapısı	30
2.11 Sisplatine bağlı böbrekte gözlenen hasarlar	32
2.12 ATP'den cAMP ve cAMP'den AMP oluşumu	34
2.13 ATP'den cAMP sentezlenmesi	35
2.14 Siklik AMP (cAMP) tarafından proteinkinaz A'nın (PKA) aktive edilmesi	36

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
2.1 Fizyolojik ve fizyolojik olmayan nedenlerin oluşturduğu reaktif oksijen/nitrojen türleri	11
2.2 Bazı antikanser ilaçların böbrekte etkileri	29
3.1 Deney gruplarının rastgele oluşturulması	40
4.1 Deney grupları ve kontrol grubunda zamana bağlı SOD aktivitesi (IU/mg protein) değişimi değerlerinin istatistiksel sonuçları	44
4.2 Deney grupları ve kontrol grubunda zamana bağlı MDA (nmol/g doku) düzeyi istatistiksel sonuçları	46

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa No
4.1 Grupların zamana bağlı SOD aktivite değişimi	45
4.2 .Grupların zamana bağlı MDA (nmol/g doku) düzeyi değişimi	47

1. GİRİŞ

Organizmada hücrel metabolizma sonucunda veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan serbest radikaller son yıllarda en çok üzerinde durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması, bugün bilinmeyen pek çok hastalığa açıklık getirecektir (Erden, 1992).

Serbest radikallerin organizma için fagositoz gibi yararlı işlevleri de olmakla birlikte, aşırı miktarda bulunmaları başta lipitler ve glikoproteinler olmak üzere nükleik asitler, aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar gibi önemli yapısal ve fonksiyonel molekülleri etkileyerek toksik etki yapmaktadır (Delibaş ve Özcankaya, 1995; Derin ve ark., 2001).

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli bir düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar (Çavdar ve ark., 1997).

Oksidatif hasara karşı hücreyi koruyucu enzimatik ve enzimatik olmayan sayısız mekanizma vardır. Oksijen ürünlerine bağlı hasarın düzeltilmesi antioksidan enzimler tarafından katalizlenir ve bu enzimler serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasardan hücrenin korunmasında başlıca rolü oynarlar (Dülger ve ark., 2002). Radikal süpürücü yeteneği olduğu bilinen SOD (süperoksit dismutaz), katalaz ve peroksidaz gibi enzimler, askorbik asit, E vitamini (alfa-tokoferol), sistein, indirgenmiş glutatyon gibi antioksidan maddeler süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest hidroksil radikali (OH) ve bunların etkisiyle oluşan lipit peroksitleri ve diğer benzer türevlere karşı hücrelerde bulunan savunma sistemlerinden bazılarıdır (Ak ve Oto, 1988).

Oksijenin suya indirgenmesinde ilk önce süperoksit radikali ortaya çıkar. Bu radikal hücrelerde yaygın olarak bulunan radikal süpürücü enzim SOD (süperoksit dismutaz) tarafından hidrojen peroksite çevrilir. Organizmada oksidan stresin arttığı durumlarda SOD enzim sistemi, aktivitesini arttırarak koruyucu etkinliğini sürdürmeye

çalışır. Özellikle diğer radikal süpürücülerin aktivitelerinde azalma söz konusu olduğunda SOD aktivitesinin arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Katalaz ve peroksidaz gibi diğer radikal süpürücü enzimler hidrojen peroksiti suya dönüştürürler. Serbest radikallerin yapımının arttığı ve doğal savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumda süperoksit ve hidrojen peroksit birbirleriyle reaksiyona girerek hidroksil radikalini üretirler. Bu son derece toksik radikale karşı herhangi bir savunma sistemi yoktur. Hidroksil radikali süperoksit radikalinden daha reaksiyoner olup biomembranlarda bulunan doymamış yağ asitlerini perokside ederek doku hasarı oluşturur (Ak ve Oto, 1988; Erden, 1992).

Çeşitli organlarda gelişerek her yaştaki bireyi etkileyen kanser, kardiovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedenidir. Deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar, kanser gelişiminin patogeneğinde serbest oksijen radikallerinin rol aldığını göstermiştir. Serbest oksijen radikalleri tümörün ilerlemesini ve hücre çoğalmasını arttırabilmektedir (Yılmaz ve Ozan, 2003).

Lipit peroksidasyonu hücrelerde antioksidan enzimatik sistemi etkileyen serbest radikal metabolitlerinin aracılık ettiği hücresel hasarlarda gerçekleşen önemli bir olaydır. Hücresel oksidasyonlar ve lipit peroksidasyonu kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişimine yol açan patolojik olaylarda etkin oksijen grupları, organik peroksitler ve diğer radikallerin düzeylerinde artış şeklinde kendini gösterir. Lipit hidroperoksitler doğrudan DNA zincirini kırabilir ve lipit peroksil ve alkoksil radikalleri DNA'da oksidasyona neden olabilir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (Yılmaz ve Ozan, 2003; Karahan ve Yılmaz, 2006).

Lipit peroksidasyonu birçok yolla kantitatif olarak belirlenebilir. Lipit peroksidasyonunu kantitatif olarak değerlendirmek için en sık kullanılan yöntem lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyinin tiyobarbitirik asit testi ile ölçümüne dayanmaktadır (Bolaman ve ark., 2000). MDA konsantrasyonu enzimatik olmayan oksidatif lipit peroksit parçalanması sonucu oluşmaktadır. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitler veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkilerini gösterir. Oksidatif stresin arttığı durumlarda plazma MDA düzeyi de artmaktadır (Öztürk ve ark., 2001; Özkan ve ark., 2003).

Böbrek dokusu oksidasyon işleminin en yoğun olduğu organlardan biri olması nedeniyle oksidatif hasara karşı da son derece duyarlı bir organdır (Koç ve ark., 2006). Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında reaktif oksijen türlerinin böbrek hastalıklarında patofizyolojik önemleri saptanmıştır. Böbrek dokusu veya idrarda oksidan hasar ürünlerinin saptanması yanında reaktif oksijen inhibitörleriyle koruyucu etkinin gösterilmesi bunu kanıtlamıştır (Çavdar ve ark., 1997).

Çeşitli glomerüler hastalıklar, sisplatin, gentamisin, kontrast ilaçlar, miyoglobininüri, hemoglobininüri gibi post-iskemik ve toksik sebeplerle oluşan akut böbrek yetmezliği ve pyelonefrit, patogeneğinde reaktif oksijen türlerinin rol oynadığı düşünülen böbrek hastalıklarındandır (Çavdar ve ark., 1997).

Sisplatin birçok kanser türünde yaygın olarak kullanılan bir anti-kanser ajandır. Cis durumunda klor ve amin grupları ile çevrilmiş platin atomunun inorganik kompleksi olan sisplatinin birçok tümöre karşı güçlü etkisi vardır. Sisplatinin etkisi doza bağlıdır, fakat antineoplastik etkilerini arttıran yüksek doz kullanımı çoğunlukla nefrotoksisite denilen böbrek hasarı riski yaratır. Sisplatine bağlı böbrek hasarı serbest radikallerin oluşumu ve oksidatif stresle ilişkilidir (Hanigan ve Devarajan, 2003; Francescato ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar sisplatine bağlı nefrotoksisitenin renal lipit peroksidasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Nakano ve Gemba, 1989; Fukishi ve Gemba, 1989; Zhong ve ark., 1990; Sadzuka ve ark., 1992; Saad ve ark., 2004).

Sisplatin ve gentamisin uygulamaları sonucu oluşan lipit peroksidasyonuna bağlı olarak dokularda MDA ve glutatyon (GSH) düzeylerinde ve bazı koruyucu enzimlerin aktiviteleri ile antioksidan maddelerin düzeylerinde değişikliklere neden oldukları gösterilmiştir (Karahana, 2006). Sisplatin lipit peroksidasyonunu artırır, MnSOD aktivitesini artırırken CuZnSOD'u azaltır ve hücrel tümör nekroz faktör (TNF-alfa) miktarını artırır (Mishima ve ark., 2006).

cAMP (siklik AMP), hücre membranında yerleşmiş bulunan adenilil siklaz enziminin katalitik etkisiyle adenozin trifosfat (ATP)'tan sentezlenen ve fosfodiesteraz enziminin etkisiyle 5' -Adenozin mono fosfat'a (5'-AMP) dönüşerek inaktif hale gelen çok önemli bir hücre içi nükleotittir. Kanser hücrelerindeki kontrolsüz çoğalmanın hücre içi siklik AMP seviyesindeki azalmanın bir sonucu olduğu gösterilmiştir (Akkuş ve ark., 1989; Nelson ve Cox, 2005).

Sitoplazmada siklik AMP artışı ise bazı hücrelerin (normal B lenfosit, B hücreli kronik lenfositik lösemi hücreleri, timosit, insan meme kanseri hücreleri) ölümünü tetiklerken bazı hücrelerin (nötrofil, lökosit, hepatosit, beyincikteki nöronlar) ise ölümünü engellemektedir (Gönlügür ve Gönlügür, 2007).

Yapılan çalışmalarda siklik AMP analogları ve sisplatine bağlı renal hasara karşı tübüler hücreleri koruyan, forskolin ve prostasiklin analogları, beroplast gibi ajanların adenilil siklaz aktivitesini sitümüle ettiği ve cAMP/ PKA (proteinkinaz A) sinyalinin sisplatine bağlı nefrotoksisiteye karşı korumada önemli rolü olduğu kaydedilmiştir (Mishima ve ark, 2006).

Çalışmamızda sisplatin uygulanan sıçanların böbrek hücrelerinde SOD aktivitesi ve MDA düzeyleri incelenerek siklik AMP'nin, sisplatinin böbrek dokusunda oluşturduğu harabiyeti azaltıcı etki gösterip göstermediğinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

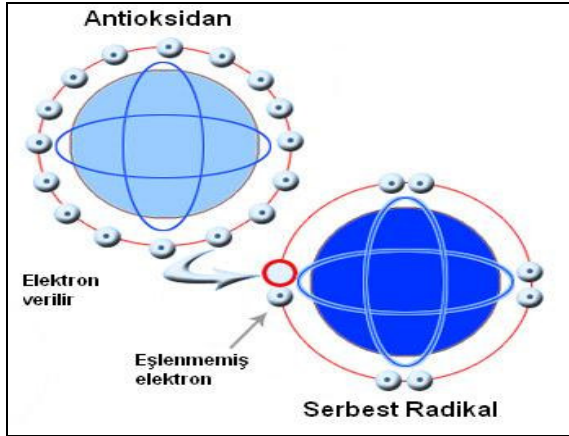
2.1. SERBEST RADİKALLER

2.1.1. Serbest Radikal Tanımı

Atomlar, proton ve nötrondan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşur. Elektronların çekirdek etrafında bulunma olasılığının en yüksek olduğu yer orbital olarak adlandırılır (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Bu basit bir atom ya da karmaşık yapılı bir organik molekül olabilir. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Bir bileşik, bir elektron kaybederek veya bir ilave elektron alarak serbest radikal oluşturabilir (Kılınç ve Kılınç, 2002; Delibaş ve Özçankaya,1995).

Dış yörüngesinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren herhangi bir molekül türü serbest radikal olarak tanımlanır. Serbest radikaller eşlenmemiş elektronları nedeniyle oldukça reaktiftirler. Elektronu koparılmış olan molekül, eşlenmemiş elektron içerdiğinden, serbest radikale dönüşür (Şekil 2.1) (Maxwell ve Lip, 1997; Günaydın ve Çelebi, 2003).



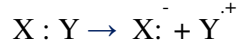
Şekil 2.1.1. Serbest radikal reaksiyonu (www.biomatrixone.com/support_anti-ox.html)

Serbest radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşurlar:

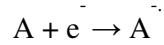
1. Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.



2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücresele antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur.



3. Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin oluşumuna neden olur. Bu mekanizma ile radikal yapımı biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleştiğinden canlılar için önemlidir (Kılınç ve Kılınç, 2002).



2.1.2. Serbest Radikal Kaynakları

Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşur, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından herhangi bir sitotoksiste ortaya çıkmaz. Bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkar (Öztürk ve ark, 2001).

İn vivo olarak hücrede normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan radikaller olduğu kadar, organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik

taşıyan ajanlara ve doğal durumda serbest radikal metabolitleri oluşturabilen yabancı kimyasal maddelere (ksenobiyotiklere) maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler (Erden, 1992).

Serbest radikaller hücrelerde endojen (içsel) ve eksojen (dış etkiler) kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar:

2.1.2.1. Serbest Radikaller Oluşturan Eksojen (Dış Etkiler) Kaynaklı Etmenler

- **Aşırı Oksijen Konsantrasyonu (Hiperoksi):** Serbest radikaller oksijen için yüksek K_M 'i olan enzim sistemlerini aktive eder ve bazıları oksijen radikalleri üretir.
- **Karbon Tetraklorür, Parasetamol Gibi İlaç Toksikasyonları:** Karbontetraklorür, sitokrom P-450 monooksijenaz sistemi tarafından triklorometil ve triklorometilperoksi radikallerine dönüştürülür. Triklorometil radikali, lipid peroksidasyonunun temel başlatıcısıdır.
- **İyonize ve Ultraviyole Işımlar:** İyonize edici ışınlar, suyu hidroksil ve hidrojen radikallerine parçalayabilmeye yetecek kadar yüksek düzeyde enerji içerir ve böylece deride ışın harabiyetine, mutasyonlara, kansere ve hücre ölümüne yol açar.
- Paraquat, alloksan gibi kimyasalların etkisinde kalma, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, çözücüler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve sisplatin gibi antineoplastik ajanlar ve alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler de serbest radikal oluşturan eksojen kaynaklı etmenler arasında sayılabilir (Mercan, 2004; Delibaş ve Özcankaya, 1995; Erden, 1992).

2.1.2.2. Serbest Radikaller Oluşturan Endojen (İçsel) Kaynaklı Etmenler

- **Mitokondrial ve Mikrozomal Elektron Transport Zinciri:** İç mitokondriyal membranda lokalize oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiğinde mitokondriyal süperoksit radikalının açığa çıkışı artar. Yapılan çalışmalarda mitokondriyal serbest radikallerin kaynağının iç mitokondriyal membranda yer alan elektron transport sistemi olduğu anlaşılmıştır. Başta

süperoksit radikali olmak üzere hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit mitokondri içinde meydana gelir. Normalde süperoksit ve hidrojen peroksit yapımı, mitokondriyal oksijen tüketiminin yaklaşık % 1-2'sini oluşturur. Mitokondri hidrojen peroksiti sitoplazmaya verebilirken süperoksit radikalini çok düşük konsantrasyonlarda tutar (Erden, 1992).

Mitokondrideki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır (Kılınç ve Kılınç, 2002). Koenzim Q'nun tek elektronlu indirgenmiş şekli zar içinde serbest haldedir ve bir elektronu ortamda çözülmüş halde bulunan oksijene kazara aktararak bu yolla süperoksit oluşturur (Smith ve ark., 2007).

- **Aktive Fagositler (Polimorfonükleer lökosit (PMN) ve Makrofajlar):** Polimorfonükleer lökosit (PMN) fagosite ettiği bakterileri öldürmek ve nekrotik dokuları temizlemek için proteazlarla birlikte oksijen radikallerini kullanır. PMN'nin aktive olmuş komplemanla aktivasyonu ile PMN'nin oksijen tüketimi 80 kat artar ve bu oksijen toksik oksijen türleri üretir (Delibaş ve Özçankaya, 1995).
- **Endoplazmik Retikulum (ER) ve Nükleer Membran Transport Proteinleri:** Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikaller, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan meydana gelirler. Nükleer membrandan açığa çıkan serbest radikaller özellikle DNA'da etkili olur. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlar aynı elementleri, örneğin P450 içerdikleri için doymamış yağ asitlerini ve ksantobiyotikleri okside edebilir ve oksijeni indirgeyebilirler. Ayrıca flavoprotein içeren sitokrom redüktazlar da otooksidasyonla süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluştururlar (Erden, 1992).
- **Peroksizomlar:** Peroksizomlar, güçlü hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu enzimler D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-a hidroksi asit oksidazdan zengin olup hidrojen peroksit açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler (Erden, 1992).
- **İskemi-Perfüzyon:** İskemi (kan akımının kesilmesi) ya da hipoksi (oksijensiz kalma) sırasında oluşan ksantin oksidaz, süperoksit radikali üretir. İskemik

hücrelerde ATP depoları hızla azalırken adenozin, inozin, hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri ortamda birikirler. Bunlar ksantin oksidaz enziminin substratlarıdır. Reperfüzyon sırasında oksijenin dokulara yeniden girişi ile ksantin oksidaz bu maddeleri kullanarak hipoksantini ve ksantinin ürik aside çevrilmesini katalizler. Bu durumda, çok yüksek miktarlarda süperoksit üretilmektedir (Ak ve Oto, 1988; Çavdar ve ark., 1997; Savaş ve ark., 2005).

- **Plazma membranları:** Plazma membranı serbest radikal reaksiyonları için kritik bir yerdir. Ekstrasellüler olarak açığa çıkan serbest radikaller hücrenin diğer kısımları ile reaksiyona girebilmek için ya önce plazma membranından geçmelidir ya da toksik reaksiyonlarını membranda başlatmalıdır. Membranda bulunan fosfolipitler, gliseridler, steroller gibi doymamış yağ asitleri ve kolay okside olabilen aminoasitleri içeren transmembran proteinleri serbest radikal hasarına açıktır (Erden, 1992).

Lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi mikrozomal ve plazma membranına bağlı enzimler de serbest radikal açığa çıkarabilirler. Bu enzimlerin substratı olan araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu ile bir karbonlu serbest radikal açığa çıkar. Hidroksil radikali ya da diğer radikal türlerinin prostaglandin sentezi sırasında açığa çıkışı siklooksijenazın feedback regülasyonuna yol açabilir, prostaglandin sentezinin hem hızını hem de miktarını düzenleyebilir (Erden, 1992).

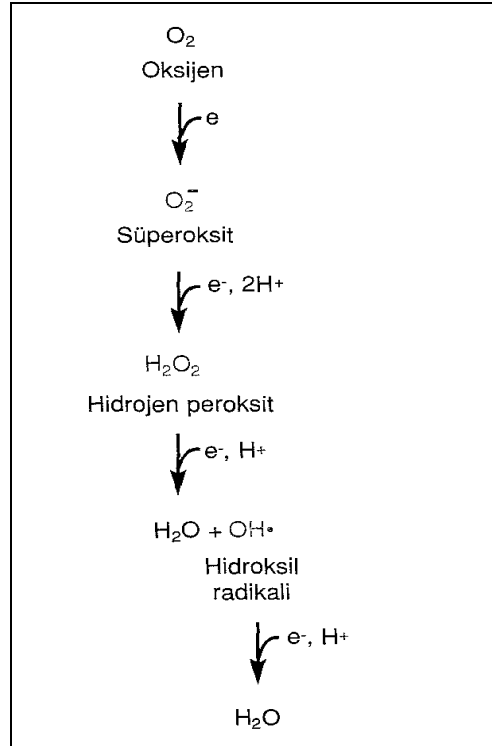
2.2. Oksijen ve Oksijen Radikalleri

Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri sayısız enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidir (Erden, 1992). ATP üretilmesi, detoksifikasyon ve biyosentez yollarındaki oksidasyon tepkimeleri için oksijene bağımlıyız. Öte yandan, oksijen tek elektron aldığı zaman hücrenin lipitleri, proteinleri ve DNA'sını tahrip eden reaktif oksijen radikallerine (ROS) dönüşmektedir (Smith ve ark., 2007).

Oksijen atomu çift radikal olup (diradikal) farklı yörüngelerde iki tane tek elektron taşır. Bu elektronlar paralel spinlere (elektronların kendi çevresinde dönmesi) sahip oldukları için aynı yörünge üzerinde yer almazlar (McCord, 2000; Smith ve ark., 2007).

Oksijen çok güçlü bir oksidan olmamasına rağmen, suya indirgenmesi sonucu çok reaktif ara ürünler oluşmasına neden olur (Günaydın ve Çelebi, 2003). Normal aerobik metabolizma koşullarında çok az miktarda meydana gelirler ve hücre içi savunma sistemleri tarafından derhal yok edilirler (Ak ve Oto, 1988).

Oksijen toplam 4 elektron alarak suya indirgenir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi süperoksit radikalini (O_2^-) oluşturur (McCord, 2000). Süperoksit, hala bir tane eşlenmemiş elektron taşımamasından dolayı bir radikaldir. Eğer iki elektron transfer edilirse, radikal olmayan, hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Son olarak son elektronun kabul edilmesi hidroksil radikalini (OH) suya indirger (Şekil 2.2) (Smith ve ark., 2007).



Şekil 2.2. Oksijenin dört elektron alarak suya indirgenme basamakları

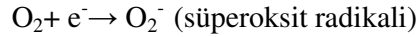
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (Tablo 2.1). Oksijen süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme–indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla hidrojen peroksit ve oksijene çevrilir (Mercan, 2004).

Tablo 2.1. Fizyolojik ve fizyolojik olmayan nedenlerin oluşturduğu reaktif oksijen/nitrojen türleri (Günaydın ve Çelebi, 2003).

Fizyolojik Ve Fizyolojik Olmayan Nedenlerin Oluşturduğu Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri	
Nedenler	Reaktif oksijen/nitrojen türleri
Radyasyon (X ve γ ışınları)	Hidroksil radikali
Ultraviyole ışını	Singlet oksijen
Endojen oksidazlar Metabolizma ve solunum zincirinde elektron transferi sırasında yetersiz otooksidasyon	Hidrojen peroksit Süperoksit radikali Hidrojen peroksit
Nötrofil/makrofajlarla katalizlenen solunum patlaması	Süperoksit radikali Hidrojen peroksit Hipokloröz asit
Hidrojen peroksite metallerle katalizlenen reaksiyonu	Hidroksil radikali
Lipit peroksidasyonu	Alkil radikaller Alkil peroksitler α,β -doymamış aldehitler Malondialdehit
Nitrik oksit sentazla arjinin katalizi	Nitrik oksit
Nitrik oksit-süperoksit reaksiyonu	Peroksinitrit
Atmosfer	Ozon/nitrojen dioksit

2.2.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi süperoksit radikalini oluşturur (McCord, 2000).



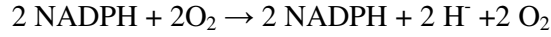
Süperoksit radikali, bir eşlenmemiş elektron içerdiğinden ne çok fazla reaktif, ne de güçlü bir oksidandır (Günaydın ve Çelebi, 2003). Süperoksit toksik olmayan hidrojen peroksit oluşumuna yol açabilir (Pryor, 2006).

Bu radikal hücrelerde yaygın olarak bulunan SOD tarafından hidrojen peroksite çevrilir. Katalaz ve peroksidaz gibi diğer enzimler hidrojen peroksiti suya dönüştürür (Ak ve Oto, 1988).

SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artması durumunda, süperoksite özgül tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı oldukları proteinlerden salınımına neden olur, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar, metal iyonlarını katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, süperoksit indirgenmiş nükleotitleri, bazı aminoasitleri ve antioksidan bileşikleri (glutasyon, askorbik asit, tokoferol) oksitler (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Zar fosfolipitleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup hücre zarlarında lipit peroksidasyonunu başlatabilir ve zarsal antioksidanları (tokoferol) oksitleyebilir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

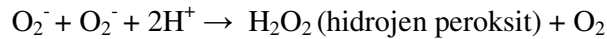
NADPH oksidazın etkinliği sonucu NADPH'dan bir elektronun O_2 'ye aktarılmasıyla da süperoksit üretilmektedir. Süperoksit fagolizozomun zar içi mesafesine salınır ve burada genellikle bakterilere ve fungus proteinlerine etkili olan hidrojen peroksit ve diğer radikallere çevrilir (Smith ve ark., 2007).



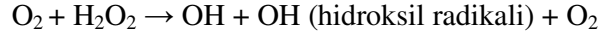
Süperoksit anyonu hem okside hem de redükte ajan olarak iş görür. Epinefrin ve dopamini oksitlerken, nitro blue tetrazolium veya stokrom c'yi indirger. Süperoksit radikalleri SOD tarafından inhibisyonla, stokrom c'nin redüksiyonu ile belirlenebilir (Cohen, 1974).

2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksit radikaline bir elektron eklenmesiyle oluşur (Kılınç ve Kılınç, 2002; Günaydın ve Çelebi, 2003).



Aslında hidrojen peroksit gerçek bir serbest radikal olmamasına rağmen, Cu, Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranması nedeniyle önemli bir oksidandır (Delibaş ve Özçankaya, 1995; Kılınç ve Kılınç, 2002).

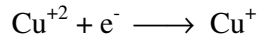
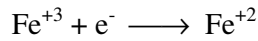
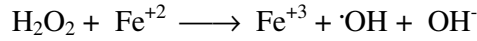


Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan hidrojen peroksit, dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Hidrojen peroksit membran lipitlerinde lipit peroksidasyonuna, süperoksit dismutazın inaktivasyonuna, DNA hasarına neden olmaktadır (Mercan, 2004).

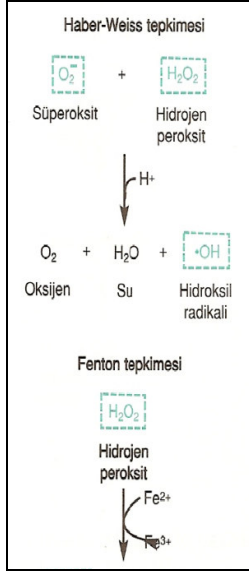
2.2.3. Hidroksil Radikali (OH[·])

Süperoksit radikalinin yer aldığı bir dizi reaksiyon sonucu, özellikle mitokondri içinde hidroksil radikali (OH[·]) oluşur (Erden, 1992).

Hidroksil radikali biyomembranlarda bulunan doymamış yağ asitlerini peroksidederek doku hasarı oluşturur (Ak ve Oto, 1988). Süperoksit radikallerinin serbest geçiş metalleri (Fe, Cu, Mn) varlığında, Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonları tarafından, hidrojen peroksit bilinen en reaktif oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturabilir (Delibaş ve Özcankaya, 1995; Günaydın ve Çelebi, 2003; Sakac ve Sakac, 2000).



Bir elektronun alınması ve verilmesi durumlarında bu serbest metal iyonları radikal reaksiyonunu hızlandırır. Metal iyonları lipid peroksidasyonu esnasında rol oynarlar. Oluşmuş lipid hidroperoksitlerin parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu katalize eder (Şekil 2.3). Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler (Memişoğulları, 2005).



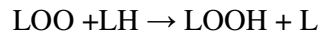
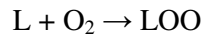
Şekil 2.3. Haber – Weiss Tepkimesi ve Fenton Tepkimesi (Smith ve ark., 2007)

2.1.3.4. Nitrik Oksit (NO) ve Peroksinitrit (ONOO)

Nitrik oksit (NO) radikal toplayıcısıdır ve süperoksit varlığında toksin olabilir (Delibaş ve Özcankaya, 1995). Aktive lökositlerde, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile NO oluşurken, makrofajlarda NO ile süperoksit radikali oluşur. Süperoksitin NO ile reaksiyonu sonucunda ise hidrojen peroksitten bile daha güçlü özellikte olan peroksinitrit oluşabilir. Peroksinitrit direkt doku hasarına neden olabileceği gibi hidroksil radikali ve nitrojen dioksit oluşturabilir (Günaydın ve Çelebi, 2003).

2.2.4. Lipit Peroksil Radikali (LOO)

Reaktif serbest radikaller ve metabolitler membrandan bir hidrojen uzaklaştırılmasıyla lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Oluşan lipit radikal (L) oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini oluşturur (Günaydın ve Çelebi, 2003).

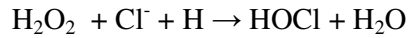


Lipit peroksil radikali başka bir lipitten hidrojen atomunu uzaklaştırır ve lipit hidroperoksit ile başka bir lipit radikali oluşturur. Bu zincir reaksiyonunun NO'nun lipit peroksil radikali ile etkileşerek inhibe edildiği gösterilmiştir (Günaydın ve Çelebi, 2003).



2.2.5. Hipokloröz Asit (HOCl)

Oksijenin nötrofillerdeki bir başka metabolizması da nötrofillerdeki miyeloperoksidaz enzimiyle hidrojen peroksiti klorlayarak hipokloröz asiti oluşturmaktadır. Nötrofillerden ve monositlerden salıverilen miyeloperoksidaz enziminin hidrojen peroksit üzerine etkisiyle oluşup ekstrasellüler aralığa salıverildiği gibi miyeloperoksidaz inhibitörüyle de bu oluşum engellenebilir (Günaydın ve Çelebi, 2003).



Nötrofiller aktive olduklarında oksijenin süperoksit radikaline dönüşümü 20 kat artar ki, buna oksijen tüketiminin artmasını ifade ettiği için solunum patlaması denir. Artmış metabolizma sonucu hidrojen peroksinin yaklaşık % 40'ı hipokloröz asit, geri kalanı ise hidroksil radikaline dönüşür (Günaydın ve Çelebi, 2003).

2.2.6. Singlet Oksijen

Singlet oksijen, serbest radikal olmasına karşın kuvvetli oksidan bir ajandır ve birçok moleküle etkileşir. Membran lipitlerine etki ederek peroksitleri oluşturur (Günaydın ve Çelebi, 2003).

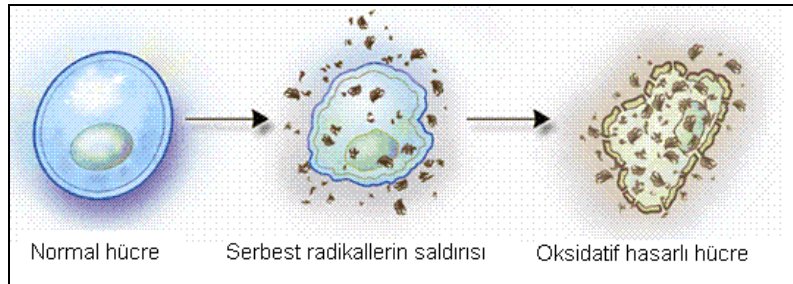
Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarının fosfolipit, glikolipit, gliserit ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipit peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Lipit peroksitler, indirgenmiş glutatyona (GSH) bağımlı selenyumlu bir enzim olan GS-peroksidaz tarafından lipit alkollere çevrilerek inaktive edilirse de gerek süperoksit gruplarıyla fazla miktarda lipit peroksitlerinin şekillendirilmesi, gerek ortamda GSH'nin tükenmesine neden olan maddelerin bulunması, hidroperoksitlerinden serbest lipit gruplarının oluşmasına yol açar. Serbest lipit grupları da doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da başlangıçtaki etki alanlarında diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak sekonder bozuklukların göstergesi olabilirler (Mercan, 2004).

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon - karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bu moleküllerin başında tokoferoller, fenoller, bilirubin, DNA, karotenler, kolesterol, NADPH, triptofan, methionin, sistein ve histidin gibi bileşikler gelir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve HO kadar etkin bir şekilde lipit peroksidasyonunu başlatabilir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

2.2.7. Oksidatif Stres

Sağlıklı bireylerde oluşan serbest oksijen radikalleri ile antioksidan savunma sistemi dengededir. Serbest radikallerin ve diğer oksidanların üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu durumda ya antioksidan savunma sistemi zayıflamıştır ya da serbest oksijen radikallerinin üretimi artmıştır ya da her iki etki bir arada görülür (Erbay ve ark., 2003; Mercan,2004).

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında reaktif oksijen türleri oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidan lehine kayması sonucu gelişen oksidatif stress çeşitli proteinler, lipitler, karbohidratlar ve nükleik asitler gibi biomoleküllere hasar vermektedir (Şekil 2.4) (Burçak ve Andican, 2004; Pryor, 2006).



Şekil 2.4. Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasar (www.nature.com/.../v73/n9/fig_tab/5002786f1.html)

2.4. Antioksidanlar-Serbest Radikal Hasarına Karşı Hücrel Savunma (Serbest Radikal Süpürücüler)

Antioksidanlar, oksidanları inaktif hale getiren maddelerdir. Sağlıklı kişilerde serbest radikaller/antioksidanlar denge halindedir (Memişoğulları, 2005). Oksijen türevlerine karşı savunma sağlayan küçük moleküller ve enzim sistemleri serbest radikallerin durağan (steady-state) konsantrasyonlarında kalmalarını sağlar. Bu savunma mekanizmaları aerobik hücrelerin canlılığını sürdürmede son derece kritik bir öneme sahiptir (Erden, 1992).

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. **Süpürücü (scavenging) Etki:** Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. **Baskılayıcı (quencher) Etki:** Oksidantlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. **Onarıcı (repair) Etki:** Oksidatif hasar görmüş biyomoleküllü onarılır.
4. **Zincir koparıcı (chain breaking) Etki:** Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (Memişoğulları, 2005; Gökpinar ve ark., 2006).

Organizmanın serbest oksijen radikallerinden korunmasında enzimatik (SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi) ve enzimatik olmayan (E vitamini, C vitamini, glutatyon, ürik asit gibi) sistemler aktivite gösterir (Sakac ve Sakac, 2000).

2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar (Serbest Radikal Süpürücüler)

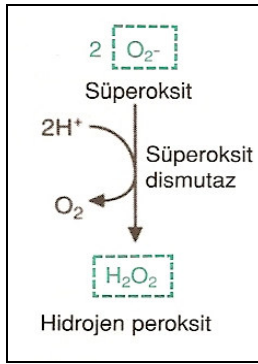
Süperoksit radikallerini elemine eden SOD, hidrojen peroksidin eliminasyonunu yapan katalaz, glutatyon peroksidaz ve organik peroksidazlar, hücre içinde mitokondri ve sitosolde bulunan ve oksidanların redüksiyonunu katalizleyen doğal antioksidan enzim sistemleridir (Şekil 2.6) (McCord, 2000; Günaydın ve Çelebi, 2003).

Hidroperoksitlerin degradasyonu katalaz, glutatyon peroksidaz ya da askorbat peroksidaz tarafından sağlanırken süperoksitlerin degradasyonu SOD tarafından sağlanır. SOD ve katalaz dismutazdır ve bu yüzden kofaktörleri tüketmezler. Böylece

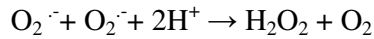
primer reaksiyonlar bu enzimler tarafından enerji harcanmadan katalizlenir. Tersine glutatyon peroksidaz ve askorbat peroksidaz, metabolik yollarda üretilen NAD(P)H eküvalantları ile yeniden kullanılan, koenzimleri kullanan redükthanlardır (Chaudiere ve Ferrari-Iluou, 1999).

2.4.1.1. SOD (Superoxide oxidoreductase, EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz (SOD), bovine eritrositinden elde edilen bir enzimdir. Süperoksit radikalinin dismutasyonunu katalizler (McCord ve Fridovich, 1969). Süperoksit redüksiyon ya da dismutasyonla hidrojen peroksite çevrilir (Pryor, 2006). Bu durum çoğu kez oksidatif strese karşı birinci savunma hattı olarak adlandırılır (Şekil 2.5) (Smith ve ark., 2007).



Şekil 2.5. SOD'un katalizlediği tepkime

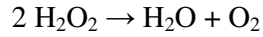


SOD'un subzellüler dağılımı hücre tipine, organa ve memeli türüne göre farklılık gösterebilir. Plazmada düşük aktiviteli SOD olduğu ileri sürülmüştür. Genel olarak SOD sistemi organizmayı serbest radikal hasarına karşı koruyucu bir sistemdir. Organizmada oksidan stresin arttığı bazı klinik durumlarda bu enzim sistemi aktivitesini artırarak koruyucu etkinliğini sürdürmeye çalışır. Özellikle diğer radikal süpürücülerin aktivitelerindeki azalmanın söz konusu olduğu klinik durumlarda SOD aktivitesinin arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Erden, 1992).

Ökaryotlarda SOD'un üç tipi tanımlanmıştır. En sık bulunan şekli sitoplazmada bulunan Cu-ZnSOD ve mitokondride bulunan MnSOD'dur. Daha az yaygın olan şekli, çoğunlukla hücre dışı sıvılarda bulunan, ekstrasellüler SOD'dur (Bolann, 1991).

2.4.1.2. Katalaz (EC 1.11.1.6)

Katalaz hidrojen peroksitin oksijen ve suya dismutasyonunu katalizleyerek toksik hidrojen peroksiti hücrelerden uzaklaştırmada önemli bir rol oynar. Porfirin içeren yüksek molekül ağırlıklı bir enzim olan katalaz, yüksek konsantrasyonlu hidrojen peroksitin iki elektron dismutasyonu ile oksijen ve suya ayrılmasını katalizler (Çimen ve ark., 2005; Pryor, 2006).



Hidrojen peroksit oluştuğunda bunun Fenton tepkimesi ya da Haber-Weiss tepkimelerinde hidroksil radikalının oluşumunu önlemek için suya indirgenmesi zorunludur. Hidrojen peroksiti indirgeyebilen enzimlerden birisi de katalazdır. En yüksek aktivite yüksek peroksizomal içeriğe sahip dokularda (böbrek ve karaciğer) görülür (Smith ve ark., 2007).

Katalaz H_2O_2 'ye spesifiktir, diğer organik peroksitlere etki etmez. Aerobik hücrelerin çoğunda bulunur. Hem bulunduran bir enzimdir. Bir molekül H_2O_2 elektron verici, bir molekül H_2O_2 de oksidan veya elektron alıcı olarak kullanılabilir (Delibaş ve ark., 1995).

Katalaz, kanser, diyabet, katarakt, ateroskleroz, iskemik-perfüzyon hasarı, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok durumda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli enzimlerinden biridir (Yılmaz ve Ozan, 2003).

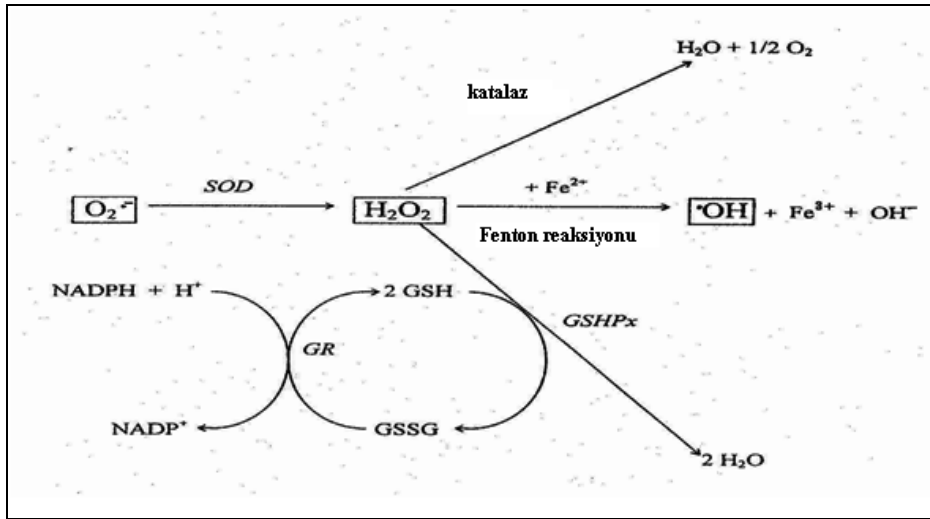
2.4.1.3. Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon (γ -glutamilsisteinilglisin) vücudun oksidatif hasara karşı korunmasında rol oynar. Glutasyonun peroksitlerle ve disülfidlerle reaksiyonundan okside glutasyon oluşur. Okside glutasyon bir flavoprotein yapısında olan glutasyon redüktaz enzimi tarafından yeniden redüklenir. Redükte glutasyon (GSH) glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup aktif bir sülfidril grubuna sahiptir (Erden, 1992; Öztürk ve ark., 2001). Glutasyon redüktaz bir FAD içerir ve elektronların NADPH'dan okside olmuş glutasyonun (GSSG) disülfid bağına aktarılmasını katalize eder (Smith ve ark., 2007).



Substrat olarak glutatyon kullanan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) serbest oksijen radikalleri, peroksitler ve kanserojenlere karşı savunmada önemli bir rol oynar (Yılmaz ve Ozan, 2003). Transplantasyon amacıyla organların korunmasında ve siklofosamid gibi sitotoksik ilaçların organ hasarını oluşturmasını engellemede yararlı katkıları vardır (Çavdar, 1997)

Ayrıca GSH-Px lipoksigenaz ve siklooksigenaz yollarını değiştirerek tümör oluşumunda anahtar bir rol oynar. Tümörlerde H_2O_2 ve diğer hidroperoksitlere karşı enzim savunmasının ilk enzimi olan GSH-Px aktivitesinde önemli artış bildirilmiştir. Glutatyon peroksidazlar enzim peroksit reaksiyonunu katalizler (Erden, 1992). Hücre içinde esas olarak sitosol ve mitokondrielerde yer alan bu enzimler selenyum kapsamları, fiziksel özellikleri ve substrat özgüllüğü bakımından hem içeren peroksidanlardan farklılık gösterirler (Erden, 1992; Smith ve ark., 2007).



Şekil 2.6. Enzimatik antioksidanlar (Armstrong, 1998)

2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar (Serbest Radikal Süpürücüler)

Enzimlerin dışında doku hasarına yol açmadan serbest radikalleri bastırmaya yönelik önemli rol oynayan birçok küçük molekül de vardır. Enzim olmayan serbest radikal süpürücülerin çoğu, radikale bir hidrojen atomu (bir elektronla birlikte) vererek serbest radikali nötralize eden bileşikler olan antioksidanlardır. Bunlar arasında E vitamini, askorbik asit, karotenoidler ve flavonoidler gibi diyetle bulunan, ürat ve

melatonin gibi içsel olarak üretilen serbest radikal süpürücüler yer alır (Delibaş ve Özçankaya, 1995; Smith ve ark., 2007).

2.4.2.1. E Vitamini (Alfa-Tokoferol)

Doğada en yaygın şekilde bulunan antioksidan olan E vitamini suda çözünür bir antioksidan olup ana işlevi süperoksit, hidroksil ve lipit peroksit radikallerini daha az toksik forma indirgeyerek zararlı lipit peroksidasyonuna karşı korumaktır (Erden, 1992; Smith ve ark., 2007).

2.4.2.2. Karatenoidler

Karatenoidler sözcüğü beta-karoten (A vitamininin öncülü) ve benzeri bileşikler için kullanılır. Bu bileşikler singlet oksijeni baskırlar ve zincir kıran antioksidanlar olarak etki gösterirler (Chaudiere ve Ferrari-Iluou, 1999; Smith ve ark., 2007).Beta karoten lipit peroksidasyonunu önler ve radikalleri ortadan kaldırır. En yüksek baskılamayı likopen yapar (Erden, 1992; Chaudiere ve Ferrari-Iluou, 1999).

2.4.2.3. Askorbat (C Vitamini)

Askorbat, kollajen sentezi ve diğer tepkimelerde işlevi bulunan bir oksidasyon-redüksiyon koenzimi olmasına karşın serbest radikal savunmasında da rol oynayabilir (Smith ve ark., 2007). Suda çözünebilir bir radikal süpürücü olup ayrıca tokoferolleri indirgenmiş aktif formda tutarlar (Erden, 1992).

2.4.2.4. Ürik asit (Ürat)

Ürik asit tiyol proteinleri ile birlikte plazmanın serbest radikal yakalama kapasitesinin büyük bir kısmından sorumludur. Hidroksil radikallerini, hemoglobin ve peroksi radikalleri arasındaki tepkime sonucu oluşan oksihem oksidanları ve peroksi radikallerinin süpürebilirler (Smith ve ark., 2007).

2.4.2.5. Melatonin

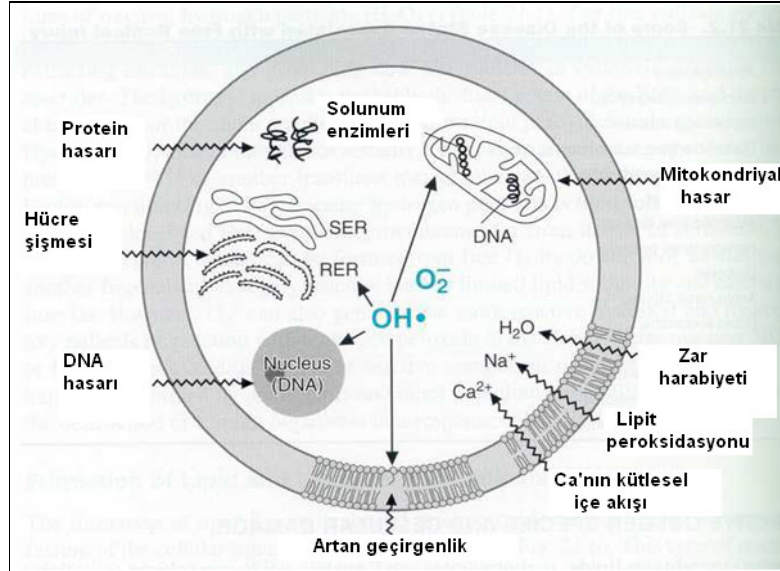
Melatonin serbest radikalleri nötralize etmek üzere bir elektron alarak serbest radikal süpürücü olarak görev yapar (Smith ve ark., 2007). Askorbat, E vitamini ve GSH gibi zincir reaksiyonlarını kırabilen diğer antioksidanlardan farklı olarak,

melatonin yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu peroksil radikalini yakalayarak sonlandırmaktadır (Yazıcı ve Köse, 2004).

Monosakkaritler, doymamış aminoasitler, sülfür içeren aminoasitler, doymamış yağ asitleri de serbest radikallerle reaksiyona girerler ve bu nedenle hücrede serbest radikalleri süpürücü olarak kabul edilirler (Erden, 1992).

2.5. Serbest Radikaller ve Hücresel Hasar

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki zararlı etkileri çeşitlidir. Oksidatif atağa meyilli olan nükleik asitler, aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler gibi bütün hücre elemanlarında hasara yol açabilirler (Şekil 2.8) (Delibaş ve Özçankaya, 1995).



Şekil 2.7. Serbest radikal aracılı hücresel hasar (Smith ve ark., 2007)

2.5.1. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkisi

Serbest radikal atağı sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu, proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalar olarak üçe ayrılabilir. (Delibaş ve Özçankaya, 1995).

Aromatik aminoasitlerde (fenilalenin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar bulunduğu için oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfürlü aminoasitler olan sistein ve sistin de serbest radikal atağına hassas aminoasitlerdendir. Radikaller membran

proteinleri ile de reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin yapısını bozarlar (Delibaş ve Özcankaya, 1995).

Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için triptofan, tirozin, fenilalenin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (Erden, 1992).

Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden ne derecede etkileneceği aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir (Erden, 1992).

Proteinlerde prolin, histidin, arginin, sistein ve metiyonin aminoasitleri hidroksil radikali saldırısı ve oksidatif harabiyete özellikle yatkındır. Oksidatif harabiyetin bir sonucu olarak protein parçalanabilir ve kalıtlar diğer kalıtlarla çapraz bağlar kurar (Smith ve ark., 2007).

Serbest radikal saldırısı ve tripeptit glutatyonun (γ -glutamil-sisteinil-glisin) sistein sülfüdril gruplarının oksidasyonu tüm hücre üzerindeki oksidatif harabiyeti artırır. Glutatyon hücrenin serbest radikal hasarına karşı kullandığı savunmanın önemli bir bileşenidir ve bunun oksidasyona uğraması koruyucu etkilerini azaltır (Smith ve ark., 2007)

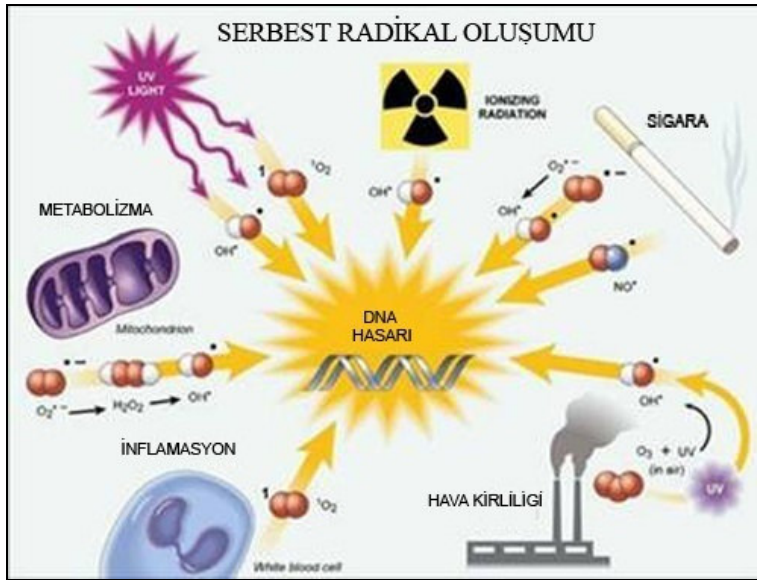
2.5.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi

DNA da lipitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti-DNA antikoru oluşmaktadır (Burçak ve Andican, 2004).

Radyasyonla hücre içinde enerji depolanması sonucu iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite, büyük oranda, ya nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine ya da DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır (Erden, 1992).

Oksijenden türeyen serbest radikaller DNA harabiyetinin de önemli bir kaynağıdır (Şekil 2.9). Fe^{2+} 'nin DNA'ya özgül olmayan şekilde bağlanması hidroksil radikalının üretimini kolaylaştırır ve bu da DNA'da baz değişikliklerine neden olabilir. Bu radikal deoksiriboz omurgasına da saldırabilir ve iplikte kopmalara neden olur. Bu DNA harabiyeti hücre tarafından bir ölçüde onarılabılır ve hücrenin apoptozu ile asgariye indirilir (Smith ve ark., 2007).

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden zarar görebilen önemli bir hedeftir (Yılmaz ve Ozan, 2003).



Şekil 2.8. DNA hasarı oluşturan serbest radikal kaynakları (www.smokersrx.com/why_skin_ages.html)

2.5.3. Membran Lipitlerine Etkisi

Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Serbest radikal etkisiyle yağ asidi zincirinden bir H atomunun uzaklaştırılması sonucu, zincir radikal niteliğini kazanmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali (L) dayanıksız diğer bir bileşiktir ve bir

dizi değişikliğe uğramaktadır. Lipit radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu oluşan lipit peroksit radikalleri, zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine (LOOH) dönüşmektedir. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek yürümektedir (Erden, 1992).

2.5.4. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, hücre membran lipitlerinin oksidatif hasarı olarak tanımlanır. Hücre membranının lipofilik iç yapısı araşidonik asit çoklu doymamış yağ asitlerinden zengindir ve bu yağ asitlerinin düşük erime noktası hücre membranının akışkanlığından sorumludur. Oksidasyon, membran yağ asitlerinin erime noktasının yükselmesine ve böylece membranın akışkanlığının azalmasına neden olur. Sonuç olarak membran, selektif geçirgenliğini kaybederek hücrelerde ozmotik yıkıma neden olur (Günaydın ve Çelebi, 2003).

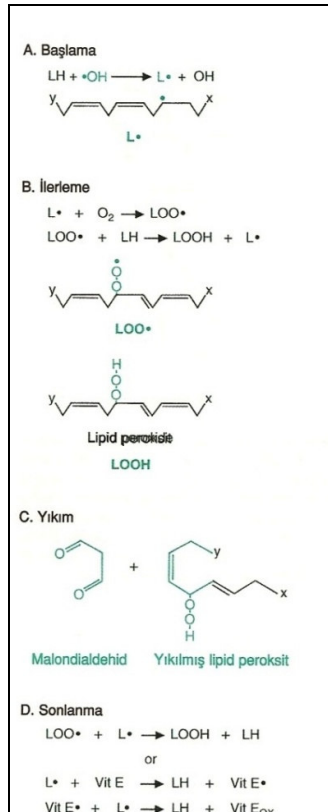
Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü MDA'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarındaki iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Mercan, 2004).

Reaksiyon zinciri çoklu doymamış yağ asitindeki karbon atomundan bir hidrojen atomu (proton ve elektron) koparan hidroksil radikali gibi güçlü bir oksidanla başlar (Şekil 2.10). Böylece oluşan karbon merkezli radikal, komşu yağ asitinden hidrojen atomu koparan oksijen merkezli peroksil radikaline dönüşür. Bu reaksiyon substrat olarak yağ asitleri tükeninceye kadar devam eder (Günaydın ve Çelebi, 2003).

Lipit moleküllerinin peroksidasyonu daima lipitin moleküler çatısını değiştirir veya harabiyete uğratar. Zar lipit peroksidasyonunun kendi kendisini yıkıcı doğasına ek olarak, oluşan aldehitler proteinlerle çapraz köprüler kurabilir (Smith ve ark., 2007). Lipit peroksidasyonunun, membranın lipit yapısındaki değişiklikler nedeniyle membran işlevinin bozulması sonucu enzimler ve hücrelerin hasarına neden olduğu düşünülmektedir (Erden, 1992).

Oksijen radikalleri çoklu doymamış yağ asitlerine etkiyerek lipit peroksidasyonuna yol açar (Sakac ve Sakac, 2000). Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilir. Lipit peroksidasyonu serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asitlerinin metilenik karbonlarından hidrojen atomu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar. Demir, lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunun başlangıcında önemli rol oynar (Delibaş ve Özçankaya, 1995).

Lipit peroksidasyonu birçok yolla kantitatif olarak belirlenebilir. Ana yıkım ürünü olan MDA tiyobarbitirik asitle oluşturduğu renkli kompleks, kalorimetrede ölçülebilir (Delibaş ve Özçankaya, 1995). MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitler veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir (Öztürk ve ark., 2001).



Şekil 2.9. Lipit peroksidasyonu basamakları (Smith ve ark., 2007).

- A. Lipit peroksidasyonu çoğul doymamış bir lipitten (LH) bir hidrojen atomu söken ve böylece bir lipit radikali (L) yapan bir hidroksil veya diğer radikalle başlatılır.

- B. Serbest radikal zincir tepkimesi O_2 ile tepkimeye girip lipit peroksi radikali (LOO) ve lipit peroksit (LOOH) üreterek ilerler.
- C. Tek elektronun yeniden düzenlenmesi lipit yıkımı ile sonuçlanır. Oluşan ürünlerden biri olan MDA suda çözünür ve kanda belirir.
- D. Zincir tepkimesi tek elektronlar bağışlayan E vitamini ve diğer lipitte çözünür antioksidanlar tarafından bitirilir. Daha sonraki iki indirgenme basamağı ile kararlı, okside olmuş bir antioksidan oluşur (Smith ve ark., 2007).

2.6. Kanser ve Serbest Radikaller

Hücrelerin anormal şekilde geliştiği ve kötücül bir tümör oluşturduğu bir grup hastalığa kanser adı verilir (Smith ve ark., 2007). Çeşitli organlarda gelişerek her yaştaki bireyi etkileyen kanser, kardiovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedenidir (Yılmaz ve Ozan, 2003).

Deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar, kanser gelişiminin patogenezinde serbest oksijen radikallerini rol aldığını göstermiştir. Serbest radikaller kanserin başlangıç, gelişme ve ilerleme safhalarında etkili olmakla beraber bu etki ilerleme safhasında daha belirgin, diğer safhalarda nispeten azdır. Özellikle metal iyonlarını varlığında serbest oksijen radikalleri hücrede protein, lipit ve DNA içeren makromoleküller ile reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olmaktadır (Yılmaz ve Ozan, 2003).

Kanserin gelişmesine katılan genler onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak bilinir. Onkogenler işlevleri hücrenin üremesi veya hayatta kalmasını teşvik olan normal genlerin (protoonkogenler) mutasyona uğramış türevleridir. Bu genler gelişme faktörlerini, gelişme faktör almaçlarını, işaret iletim proteinlerini, hücre içi kinazları ve transkripsiyon faktörlerini şifreleyebilir (Smith ve ark., 2007). Serbest radikal etkisi sonucu DNA ve kromozomlarda kırılma ve onkogenlerde aktivasyon meydana gelir. DNA hasarının artmasının karsinogeneze katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Yılmaz ve Ozan, 2003).

Süperoksit üretimi artarsa oksidatif stres oluşur. İnsanda kanser hücrelerinin çoğu tipinde MnSOD'un azaldığı görülmüştür. Çoğu durumda bu azalma defektif gen

ekspresyonuyla sonuçlanır. Yapılan bazı çalışmalarda MnSOD'un tümör baskılama görevi yaptığını ileri sürülmüştür (McCord, 2000).

Kanserli çoğu hastanın tedavisinde nefropati, tubuler interstisiyel defektler, glomerüler anormallikler, sıvı-elektrolit bozuklukları gibi engellerle karşılaşılabilir. Radyasyon, antineoplastik ilaçlar, antibiyotikler, steroid olmayan antiinflatuar ilaçlar ve kontrast madde gibi tanı ve tedavi amacıyla kullanılan ajanların tümü tümör lizis sendromu ya da direkt nefrotoksisite yolu ile böbrek yetmezliğine neden olabilirler (Yalçın ve Şahin, 2004).

Kanser tedavileri sonucu oluşan renal patolojiler şunlardır:

- 1- Renal metastatik infiltrasyon
- 2- Glomerüler hasarlar
- 3- Mikrovasküler tutulum
- 4- Sıvı ve elektrolit anormallikleri
- 5- Myelom proteinleri gibi tümörlerden üretilen maddelerin yaptığı yapısal bozukluklar
- 6- Antineoplastik tedavide renal komplikasyonlar (Yalçın ve Şahin, 2004).

2.7. Böbrek Dokusu ve Serbest Radikaller

Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında reaktif oksijen partiküllerinin böbrek hastalıklarında patofizyolojik önemleri saptanmıştır. Böbrek dokusu veya idrarda oksidan hasar ürünlerinin saptanması yanında, reaktif oksijen partikülleri inhibitörleriyle koruyucu etkinin gösterilmesi bunu kanıtlamıştır (Çavdar, 1997).

Böbrek dokusu oksidasyon işleminin en yoğun olduğu organlardan biri olması nedeniyle oksidatif hasara karşı da son derece duyarlı bir organdır (Koç ve ark., 2006). Oksidatif stresin böbrek hasarına katkıda bulunduğunu destekleyen çeşitli kanıtlar vardır (Tylicki ve ark, 2003).

Oluşumunda oksidanların rol aldığı düşünülen böbrek hastalıkları şunlardır:

1. Glomerüler hastalıklar
 - Minimal değişim hastalığı
 - Membranöz glomerülopati

- Nötrofil bağımlı hasar
2. Akut böbrek yetmezliği
 - Post-iskemi
 - Toksik (sisplatin, gentamisin, radyasyon gibi)
 3. Obstruktif (tıkanmaya yol açan) nefropati
 4. Piyelonefrit
 5. İlerleyici böbrek yetmezliği

Minimal değişim hastalığı, membranöz glomerülopati gibi glomerüler hastalıklar, post-iskemik ve toksik (sisplatin, gentamisin, kontrast ilaçlar, miyoglobininüri, hemoglobinüri vb.) sebeplerle oluşan akut böbrek yetmezliği ve pyelonefrit oluşumunda oksidanların rol oynadığı düşünölen böbrek hastalıklarındandır (Ichikawa, 1994; Çavdar, 1997).

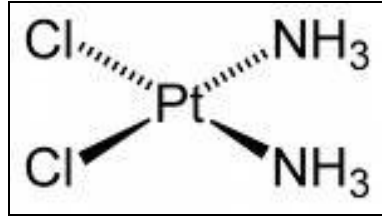
Antikanser ilaç kullanımı tek başına nefrotoksisite oluşturabilir. Özellikle dehidratasyon ve elektrolit bozukluğu gibi durumlar toksisite için yatkınlık yaratırlar (Tablo 2.2) (Yalçın ve Şahin, 2004).

Tablo 2.2. Bazı antikanser ilaçların böbrekte etkileri

İlaç	Renal toksisite	Toksisite tipi
SİSPLATİN	Şiddetli, doza bağlı	Akut böbrek yetmezliği Progresif renal bozukluk Hipomagnezemi Renal tübüler asidoz
Karboplatin	Sisplatinden az	Tübüler toksisite Arteriyel hipertansiyon Oligüri
Metotreksat	Yüksek doz	Renal yetmezlik
Mitomisin	Nadir şiddetli	Hemolitik üremik sendrom
İnterferon İfosfamid	Nadir Doza bağımlı	Protoinüri Renal yetmezlik Hipofosfatemi Akut tübüler nekroz

Bu anti-kanser ilaçlardan biri olan sisplatin çeşitli karsinomların tedavisinde kullanılmakta olup doz ile ilişkili nefrotoksisite oluşturmaktadır. Tübüler hücrelerde sitotoksik etki oluşturarak renal hasar yapmaktadır. Doza bağlı olarak bazı hastalarda kreatinin düşmesi, renal konsantrasyon defekti, renal magnezyum kaybı ile hipomagnezemi, renal tübüler asidoz, hiper aminoasidüri ve nadiren trombotik mikroanjiopati gelişebilir (Yalçın ve Şahin, 2004)

2.8. SİSPLATİN (cis-diamminchloroplatinum (II), Cisplatin, CDDP)



Şekil 2. 10. Sisplatinin yapısı (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cisplatin-2D.png>)

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum (II), cisplatin) yatay düzlemde cis pozisyonunda platinin klor ve amonyum atomları tarafından sarılması ile oluşan inorganik bir komplekstir. Sisplatin 1845'te Michel Peryone sentezlemiştir ve yapısını 1893'te Alfred Wegner tanımlamıştır, fakat sitotoksik özellikleri 1965'te Barnett Rosenberg tarafından tanımlanmıştır (*Escherichia coli*'de platin elektrotunun elektroliz ürünlerinin mitozu inhibe ettiğini keşfetmiştir). 1978'te Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) sisplatinin servikal, baş, boyun, yumurtalık, testis, mesane gibi kanserlerin klinik kullanımını onaylamıştır (Chirino ve Chaverri, 2008).

Sisplatin birçok kanser türünde yaygın olarak kullanılan anti-kanser ajanlardan biridir, ancak yan etkilerinin olması yüzünden kullanımı kısıtlıdır. Nefrotoksisite sisplatin ile ilişkili doz kısıtlayıcı en önemli yan etkidir (Hanigan ve Devarajan, 2003; Francescato ve ark, 2007).

Sisplatin DNA çift zincirinde zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini inhibe eder. Daha düşük düzeyde de olsa protein ve RNA sentezi de inhibe olur. Böbrek, karaciğer ve barsakların üst bölümlerinde yaygın dağılım gösterir. Verilişinden sonra dört ay süre ile böbrek dokusunda platin saptanabilir.

Sisplatinin başlangıç yarı ömrü plazmada 25-49 dakika ve ikincil yarı ömrü 58-73 saattir ve 2 saatte % 90'a kadar hızla protein bağlanması gerçekleşir (Güleç ve ark., 2004; Chirino ve Chaverri, 2008).

2.8.1. Sisplatin ve Böbrek Hasarı

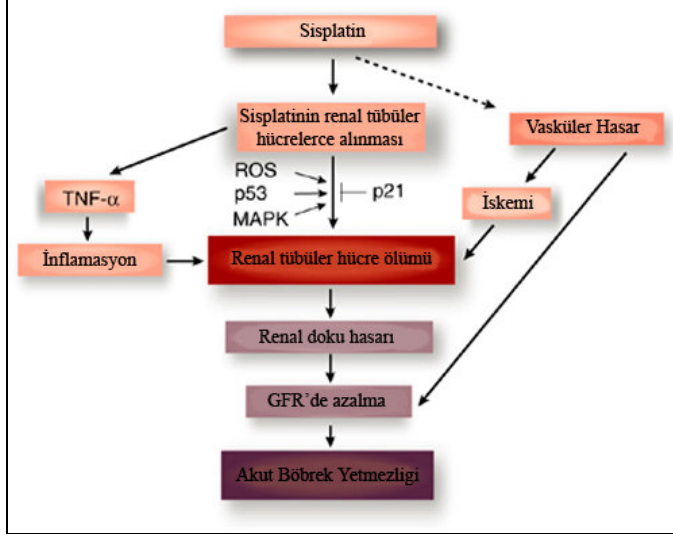
Böbrek hasarı serbest radikallerin oluşumu ve oksidatif stresle ilişkilidir. Serbest oksijen radikallerinin sisplatine bağlı renal tübüler hücre hasarında katkısı olduğu doğrulanmıştır (Kurt ve ark., 2002; Mishima ve ark., 2006; Francescato ve ark., 2007). Çünkü sisplatin en çok idrarla atılır, bu ajanın yüksek konsantrasyonu böbrek proksimal tüplerinde toplanır. Reaktif oksijen türleri sisplatine bağlı böbrek tübüler hücre hasarının patogeneğinde in vivo ve in vitro gösterilmiştir. Buna göre sisplatine bağlı reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi mitokondriyal solunum kompleksinin bozulması ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalma ile sonuçlanmaktadır (Mishima, 2006).

Birçok farmakolojik ajan ve endojen olarak oluşan bazı maddelerin yüksek konsantrasyonları akut böbrek yetmezliğine yol açabilir. Böbrek, yüksek kan akımı ile karşılaşması, interstisyumda toksinleri konsantre etme yeteneği ve tübüler epitelde spesifik taşıyıcılara sahip olması nedeniyle nefrotoksik zedelenmeye oldukça duyarlıdır (Evrenkaya ve ark., 2000).

Böbrek fonksiyonlarında bozulma sonucu oluşan birçok patolojik mekanizma yanında serbest oksijen radikalleri üretiminde artış ve/veya antioksidan sistemlerdeki yetersizlikler de kronik böbrek yetmezliğinin patojenezine ek katkıda bulunur. Kronik böbrek yetmezliği hastalarında serbest oksijen radikalleri düzeylerinde artış ve antioksidan sistem aktivitelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Çeliker ve ark., 2001).

Sisplatin tubuloglomeruler feedback nedeniyle renal vazokonstriksiyona (damar büzülmesi) yol açar. Sisplatin DNA'nın ağır metal alkilleyicisidir. İlaç metabolitleri üriner yolla atılır. Proksimal tübülüs dışında distal nefronu da etkiler. İlk tedavi küründen sonra % 25-35 akut tübüler nekroz gelişir. Doza bağımlı oluşan kümülatif renal yetmezlik oranı % 20-25'e kadar çıkar (Evrenkaya ve ark., 2000).

Platinin böbrekte toplanması hücre içinde hızlı bir süreçtir, sisplatin verildikten 1-6 saat sonra tamamlanır. Sıçanlarda böbrek sisplatinden 24 saat sonra yaklaşık verilen dozun %1'ini içerir ve platin konsantrasyonu plazma konsantrasyonunun sekiz kat üstündedir (Safirstein ve ark., 1984).



Şekil 2. 11. Sisplatine bağlı olarak böbrek hücrelerinde gözlenen hasarlar (http://www.nature.com/ki/journal/v73/n9/fig_tab/5002786f1.html)

İskemik hasar daha çok proksimal tübülün S3 segmenti boyunca gelişmektedir. Bu segment, kanlanmanın daha az olduğu dış medullada yerleşmiştir ve proksimal tübülün bu kısmı metabolik olarak çok aktif olduğundan, enerji eksikliğine kısa sürede duyarlı hale gelmektedir. Çıkan henle kulpu da bu bölgede yerleşmiş olmasına karşın, tübülün bu kısmında glikoliz yolu ile ATP sentezi mümkün olduğundan, iskemik hasar bu bölgede S3 segmentinde olduğu kadar izlenmez (Koç ve ark., 2006).

Sisplatin diğer organlara kıyasla böbreklerde daha fazla birikir ve tek doz 50-100 mg/m² verilmesinden sonra hastaların yaklaşık % 28-36'sı doza bağlı nefrotoksisite geliştirir. Sisplatine bağlı tübüler toksisite proksimal tübül S3 segmenti, distal tübül ve toplayıcı tübüllerde izlenir. Sisplatin toksistesinde iskemik zemin de muhtemelen rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, gerek insanlarda gerekse ratlarda sisplatin verilmesinden sonraki yaklaşık 3 saat içinde renal plazma akımında ve glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma saptanmıştır (Koç ve ark.,2006).

Böbrekte tübüler hasar gelişimindeki bir diğer mekanizma oksidatif strestir. Özellikle proksimal tübül hücrelerinin metabolik açıdan yoğun olmaları, ATN (akut tübüler nekroz) sırasında mitokondriyal hasar ve intrasitoplazmik kalsiyum artışı nedeniyle oksidatif moleküller fazla miktarlarda oluşur. Hücre hasarı sırasında oluşan süperoksitten yoğun miktarda hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit normalde su

molekülüne çevrilebildiği halde hasarlı hücrelerde hidroksil radikallerine de dönüşebilir. Oluşan hidroksi radikalleri gibi reaktif oksijen türevleri (ROS) lipid peroksidasyonuna sebep olarak, hücre proteinlerini okside ederek, plazma ve mitokondri membranını bozarak ve DNA'ya hasar vererek hücre zedelenmesine neden olur (Ichikawa, 1994).

Ancak, sisplatine bağlı böbrek yetmezliğinde temel mekanizma nekroz ve apoptozistir (Koç ve ark., 2006; Francescato, 2007). Sisplatin yapısında bulunan "cis" pozisyonundaki H₂O taşıyan sisplatin, proksimal tübüllerde bulunan DNA molekülü ile reaksiyona girerek DNA hasarına yol açmaktadır. Bunun ardından da tübül epitel hücrelerinde apoptozis veya nekroz gelişmektedir (Koç ve ark., 2006).

Sisplatin toksisitesinde bir diğer mekanizma da inflamasyondur. Farelerde yapılan bir deneyde, nükleer faktör kappa-B aktivasyonu sonrası proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun arttığı ve TNF-alfa aktivasyonunun blokajı ile tübüler hasar skorunun ve lökosit infiltrasyonunun daha az olduğu ve dolayısıyla sisplatin toksisitesinden korunulabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, TNF reseptör tip-2'yi taşımayan farelerde bu reseptörü taşıyan farelere kıyasla apoptozisin ve hücre nekrozunun azaldığı gösterilmiştir. Reaktif oksijen türevlerinin de sisplatin toksisitesinde rolünün olduğu gösterilmiştir. Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunun önlenmesi sisplatine bağlı sitotoksosite ve apoptoz gelişimini önleyebilmektedir (Koç ve ark., 2006).

Sisplatine bağlı böbrek hasarı ve artan TNF miktarı NAC (N-asetilsistein) ya da beroplast ile değiştirebilir. Bu bulgulardan siklik AMP'nin reaktif oksijen türlerini yok edilmesi ve p38 MAPK (mitojen aktive eden protein kinaz) aktivasyonunun engellenmesi ile bunu izleyen TNF sentezinin inhibisyonu ile sisplatine bağlı oksidatif hasara karşı böbrek tübüler hücrelerini koruduğu ileri sürülebilir (Mishima ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalar sisplatine bağlı nefrotoksitenin renal lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Zhong ve ark., 1990).

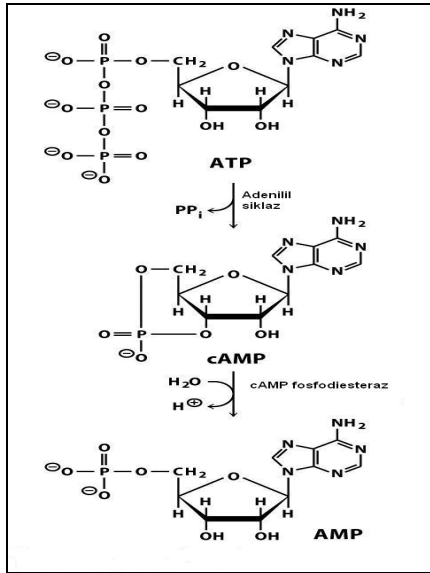
Sisplatin lipid peroksidasyonunu artırır, MnSOD aktivitesini artırırken CuZn SOD'u azaltır ve hücresel TNF- alfa miktarını artırır. TNF- alfa'nın yükselmesi ve sisplatin tarafından oluşan hücre hasarı SB203580 ve PD169316 gibi p38 MAPK 9 inhibitörleri ile azaltılır (Mishima ve ark., 2006). Sisplatin enjeksiyonu sonrası in vivo

akut böbrek hasarı renal TNF-alfa içeriği ile ilişkilidir. Sisplatin maruz kalındığında hücre hasarı ve hücre kültüründe TNF alfa içeriğinin arttığı bulunmuştur (Chirino ve Chaverri, 2008).

Yapılan çalışmalarda siklik AMP analogları ve sisplatin bağı renal hasara karşı tübüler hücreleri koruyan, forskolin ve prostasiklin analogları, beroplast gibi ajanlarının adenilat siklaz aktivitesini stimüle ederek cAMP/PKA sinyalinin sisplatin bağı nefrotoksisiteye karşı korumada önemli rolü olduğu kaydedilmiştir (Mishima ve ark., 2006).

2.9. cAMP (Siklik AMP)

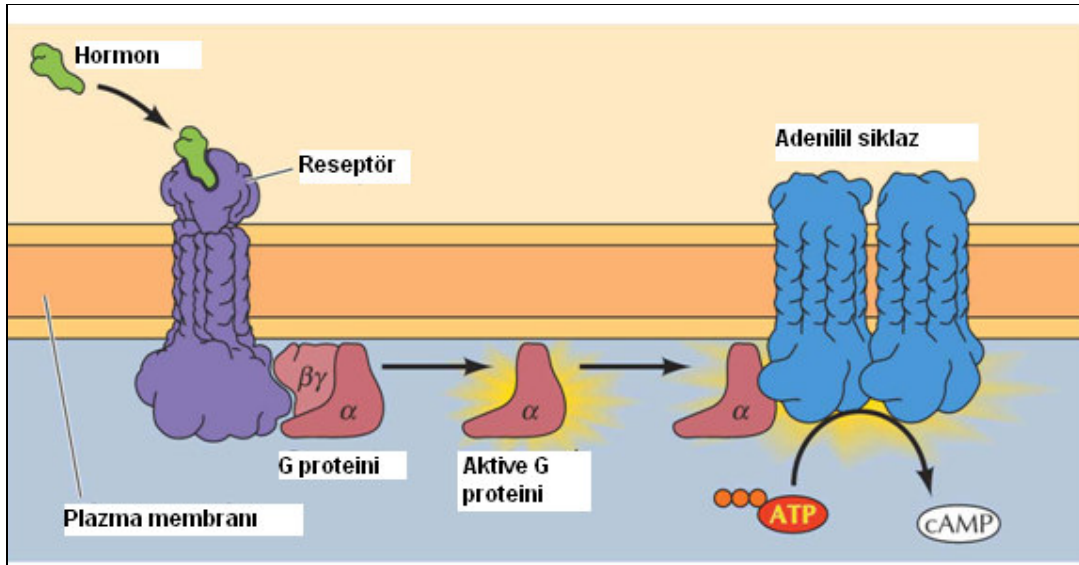
Siklik AMP, hücre membranında yerleşmiş bulunan adenilil siklaz enziminin katalitik etkisiyle ATP'den sentezlenen ve fosfodiesteraz enziminin etkisiyle 5'-AMP'ye dönüşerek inaktif hale gelen çok önemli bir hücre içi nükleotittir (Şekil 2.12) (Akkuş ve ark., 1989; Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 2.12. ATP'den cAMP ve cAMP'den AMP oluşumu
(sandwalk.blogspot.com/2007_05_01_archive.html)

1957 yılında Earl Sutherland ve Tedd Rall tarafından keşfedilen siklik AMP'ye, derişimindeki değişikliklerin hormon (birinci haberci) derişimindeki değişiklikleri yansıması nedeniyle ikinci haberci denir (Akkuş ve ark., 1989; Smith ve ark., 2007).

Bir hormon bağlandığı ve adenilil siklaz etkinleştiği zaman bu enzim adenosin trifosfattan siklik AMP sentez eder (Şekil 2.13). Siklik AMP, fosfodiesteraz tarafından AMP'ye hidroliz edilir. Siklik AMP ve diğer ikinci habercilerin derişimleri hücrelerde bu iki enzimin etkinlikleri arasında bir denge kurulacak şekilde çok düşük düzeylerde tutulmakta olduğundan hormon düzeyinde bir değişiklik olduğunda siklik AMP düzeyleri hızla değiştirilebilir. Bazı hormonlar siklik AMP derişimini adenilil siklaz yerine fosfodiesteraz enzimini etkileyerek değiştirir. Örneğin, insülin fosfodiesteraz etkinliğine neden olarak siklik AMP düzeylerini düşürür (Smith ve ark., 2007).

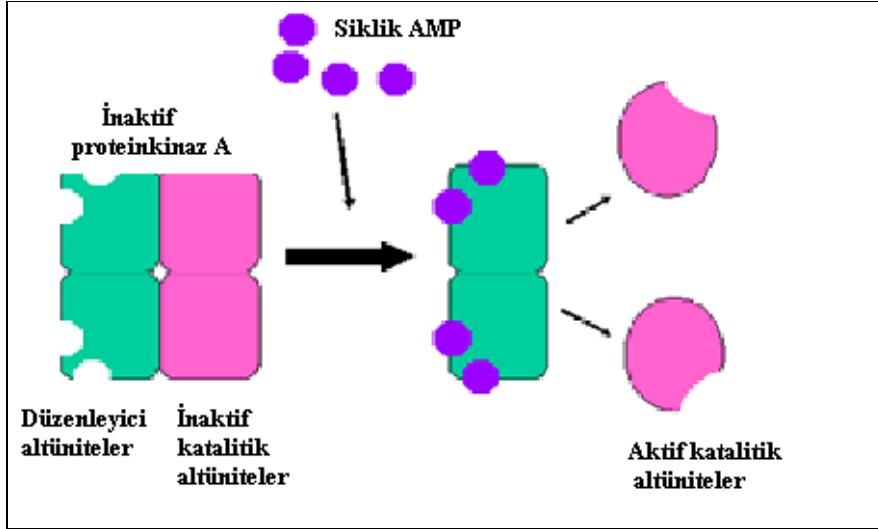


Şekil 2.13. ATP'den cAMP sentezlenmesi

(www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/notlar/1226997135.pdf)

Siklik AMP hücrelerde çeşitli etkiler gösterir. Çok sayıda metabolik enzimi fosforlayan ve bu yolla glukagon ve adrenalin gibi hormonlara hızlı bir yanıt verilmesini sağlayan bir serin/treonin proteinkinaz olan proteinkinaz A'nın allosterik bir etkinleştiricisidir. Siklik AMP proteinkinaz A'nın düzenleyici altünitelerin substrat bağlayıcı bölgesine bağlanarak proteinkinaz A'yı aktifleştirir (Şekil 2.14). Proteinkinaz A'nın katalitik alt birimleri çekirdeğe de girmekte ve CREB (döngüsel AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein) adı verilen bir gene özgül transkripsiyon faktörünü fosforlamaktadır. Yani, siklik AMP daha yavaş bir yanıt olan gen transkripsiyonunu da etkinleştirir. Diğer hücrelerde, siklik AMP ligand kapılı kanalları doğrudan etkinleştirmektedir (Smith ve ark., 2007). Aktive olan proteinkinaz ise hücre içinde enzimlerin fosforilasyonunda ve diğer proteinlerin fosforilasyonunda değişik tesirler

meydana getirmektedir. Enzimlerin aktivitesinde azalış veya artışlar yapar, böylece metabolizmada değişiklikler olur (Akkuş ve ark., 1989).



Şekil 2.14. Siklik AMP tarafından proteinkinaz A'nın aktive edilmesi (courses.washington.edu/conj/gprotein/kinasea.gif)

Siklik AMP bağımlı proteinkinaz A hücre proliferasyonu, gen indüksiyonu, metabolizma, anjiyogenez, iyon kanallarının düzenlenmesi ve apoptozis olaylarında yer alır. Daha önemlisi protein kinaz A birçok kanserin başlangıç ve devamında ve kanser tedavisine cevap oluşturmada rol oynar (Wang ve ark., 2007).

Adenilil siklazı stimüle eden hormonlar; Adrenokortikotropik hormon (ACTH), kalsitonin, katekolaminler (beta adrenerjik), korionikgenadotropin, folikül stimüle eden hormon, glukagon, lipotropin, luteinize hormon (LH), LH-releasing hormon, melanositi stimüle eden hormon, sinir büyüme faktörü, paratiroid hormon, prostaglandin E, tiroid stimüle eden hormon (TSH), tirotropin releasing hormon, vazopressindir. Bu hormonlardan katekolaminler (beta etki), glukagon, adrenokortikotropik hormon, vazopressin, lüteinize edici hormon (LH), follikülü stimüle edici hormon (FSH), melanositi stimüle edici hormon (MSH), parathormon (PTH), histamin, tiroid stimüle eden hormon (TSH), prostaglandinler ve serotonin hedef dokuda hücre içi siklik AMP seviyesini artırarak etki etmekte, insülin ve katekolaminler (alfa etki) ise azaltarak etki etmektedir (Akkuş ve ark., 1989).

Siklik AMP proteinkinaz, fosforilaz ve fosforuktokinaz enzimlerini aktive etmekte, glikojen sentetaz aktivitesini ise inhibe etmektedir. Glukoneogenez ve lipoliz

siklik AMP tarafından arttırılmakta, protein ve kolesterol sentezi ile hücre çoğalması ise inhibe edilmektedir (Akkuş ve ark., 1989).

Siklik AMP lökositlerin çeşitli fonksiyonlarında da önemli bir role sahiptir. Lökositlerin immünolojik ve enflamatuvar olaylara katılmalarının ve bazofil, eozinofil ve nötrofillerin yapışma kabiliyetlerinin intrasellüler siklik AMP tarafından azaltıldığı kaydedilmiştir (Akkuş ve ark., 1989). Siklik AMP, çeşitli hormonlara (insülin ve adrenalin, gibi) aracılık yaparak karbonhidrat ve yağların yıkımında da önemli rol oynar (Erdoğan, 1999).

Nötrofiller siklik AMP ile inkübe edildiklerinde bu hücrelerin kemotaktik faktörlere olan lökotaktik cevaplarının azaldığı görülmüştür. Öte yandan siklik AMP histaminin hücre içi salgılanmasını da inhibe eder.

Siklik AMP T-lenfositlerinin hedef hücreleri sitolizini ve çözünür lenfosit faktörleri(interferon) gibi salgılamalarını ve yine entijenle birleşerek farklılaşmış B-lenfositlerinin (mast hücreleri) immünooglobulin üretimi ve salgılanmalarını inhibe eder.

Siklik AMP'nin sinir hücreleri arasında bazı haberleşme şekillerine aracılık ettiği ve sinir sisteminde bazı nörotransmitterlerin post sinaptik etkilerine aracılık etmek, nörotransmitterlerin biyosentezini düzenlemek ve mikrotubullerin fonksiyonunu düzenlemek gibi önemli görevleri olduğu kaydedilmiştir (Akkuş ve ark., 1989).

İntrasellular kalsiyum iyonunun konsantrasyonunda değişiklikler siklik AMP'nin regülatuar sistemini etkiler. Siklik AMP'ye bağlı proteinkinaz tarafından aktive edilen fosforilaz kinaz katalitik fonksiyonu için Ca gerektirir. Birçok fosfodiesterazın aktivitesi önemli derecede Ca-bağlayıcı protein tarafından fazlalaştırılır. Membran reseptörlerine bağlanan birkaç hormon (insülin, prolaktin) adenilil siklazı aktive etmek için yetersiz kalır. Bu durumda Ca, K, Na akıntıları ile sitoplazmik cGTP ve fosfolipit turnover larının katkısı olur (Akkuş ve ark., 1989).

Siklik AMP ayrıca kalp atriumuna ait kas hücrelerinde sentez edilerek plazmaya salınan kuvvetli nat-riüretik, diüretik ve vazoaktif özellikleri olan bir peptid hormon olan atrial natriüretik peptit (ANP)'in etkili olmasına yardımcı olur (San ve Selçuk, 1993).

Kanser hücrelerindeki kontrolsüz çoğalmanın hücre içi siklik AMP seviyesindeki azalmanın bir sonucu olduğu gösterilmiştir (Akkuş ve ark.,1989).

Sitoplazmada siklik AMP artışı bazı hücrelerin (normal B lenfosit, B hücreli kronik lenfositik lösemi hücreleri, timosit, insan meme kanseri hücreleri) ölümünü tetiklerken bazı hücrelerin (nötrofil, lökosit, hepatosit, beyincikteki nöronlar) ise ölümünü engellemektedir (Gönlügür ve Gönlügür, 2007).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre (UV-VIS Spectrophotometer-Jenway), Kubota 3500 soğutmalı santrifüj (Japon), Avery Berkel hassas terazi, Sanyo Ultra Low Derin dondurucu, Jenway 3010 pHmetre, SONICS Vibra-Cell sonikatör, Vortex, Chiltern hotplate magnetic stirrer HS31 manyetik karıştırıcı

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Cisplatin (Onco-Tain DBL) 50 mg/50 mL; Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphate, Sodium Salt (Calbiochem); EDTA, KH₂PO₄, Na₂HPO₄×2H₂O, CuSO₄, NaOH, Na₂CO₃, Na-K Tartarat, Sükröz, TBA, TCA (Merck W. Germany); Xanthine, Xanthine oxidase bovine milk, Stokrom c, Süperoksit dismutaz, Folin phenol reagent, BSA (Sigma London England) kimyasalları kullanılmıştır.

3.3. Araştırma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada ağırlıkları 250-350 gr. arasında değişen, *Wistar albino*, erkek 100 sıçan, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilerek kullanıldı. Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında tutuldu ve standart fare yemi ile beslendi. Bu çalışmanın yapılması Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 01.06.2007 tarih ve HEK-28 nolu kararı ile kabul edilmiştir.

Kontrol, sisplatin, siklik AMP ve sisplatin+siklik AMP olmak üzere dört ana grup oluşturuldu. 4, 8, 12, 24 ve 48 saatleri için kontrol, sisplatin, siklik AMP ve sisplatin+siklik AMP gruplarından her gruptan 5 hayvan olacak şekilde toplam 20 sıçan rastgele seçilerek tabloda belirtildiği gibi sisplatin ve siklik AMP uygulamaları yapıldı (Tablo 3.1).

Kontrol gruplarına hiçbir madde uygulaması yapılmamıştır. Sisplatin gruplarındaki sıçanlara intraperitoneal olarak 10 mg/kg sisplatin uygulandı (Bolaman ve ark., 2001; Avcı ve ark., 2008). Liyofilize halde olan siklik AMP serum fizyolojik içinde çözdürülüp 50 mg/kg/gün tek doz intraperitoneal olarak uygulandı (Andrijevic ve Andrijevic, 2001).

Tablo 3.1. Deney gruplarının rastgele oluşturulması

Grup Adı	4.saa	8.saat	12.saat	24.saat	48.saat	Uygulama
Kontrol	5	5	5	5	5	Uygulama yok
Sisplatin	5	5	5	5	5	Sisplatin
cAMP	5	5	5	5	5	cAMP
Sisplatin+cAMP	5	5	5	5	5	Sisplatin+cAMP

3.4. Doku Örneklerinin Alınması

Bütün gruplardan (kontrol, sisplatin, siklik AMP, sisplatin+siklik AMP grupları), her gruptan 5'er sıçan olmak üzere toplam 20 sıçan, sisplatin ve siklik AMP uygulamalarının 4., 8., 12., 24., 48. saatleri dolduğunda servikal dislokasyon işlemi uygulanarak sakrifiye edildi. Ratların sakrifiye edilmesi ve dokularının alınması işlemi OMÜ Cerrahi Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Sakrifiye edilen hayvanların böbrek dokuları alınarak tartıldı. Ağırlıklarının iki katı kadar 0,25 M sükröz içine alınan doku örnekleri aktivite tayini için çalışılacağı güne kadar saklanmak üzere -80 °C'de donduruldu.

3.4.1. Doku Örneklerinde Aktivite Öncesi Uygulanan İşlemler

Böbrek örnekleri, 1/3 ağırlık/hacim olacak şekilde sükrözle seyreltilip, homojenize edildi. Doku örneklerine aktivite tayini öncesi homojenizasyon+sonikasyon işlemi yapıldı. İşlem buzda, 20 sn. süre ile ve 10 sn. ara vererek 4 kez, toplam 2 dk. gerçekleştirildi. Örnekler bu işlemden sonra (+4 C'de) 15 000 rpm.de 25 dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar total protein tayini ve enzim aktivite ölçümünde kullanıldı.

Doku protein düzeyleri, sığır serum albumini (BSA)'nin standart olarak kullanıldığı Lowry yöntemine göre ölçüldü. Lowry yönteminin prensibi alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşması ve bu kompleksin D reaktifini redükleyerek koyu mavi bir renk oluşturmasıdır. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Lowry ve ark., 1951).

Protein Miktarı = (Numune absorbansı/Standart absorbansı) x Standart Konsantrasyonu
Soruçlar mg/ml cinsinden verilir.

3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.5.1. SOD Aktivite Tayini

SOD aktivitesi tayini McCord ve Fridovich'in (1969) ve Flohe ve Otting'in (1984) metotlarından yararlanılarak yapıldı.

A Çözeltisi:

0,76 mg (5 μ mol) ksantinın 10 mL 0,001 N NaOH içindeki çözeltisi ve 24,8 mg (2 μ mol) stokrom c'nin 100 mL 50 mM pH 7.8 ve 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırıldı (Bu çözelti +4°C'de 3 gün kararlıdır).

B Çözeltisi:

Taze hazırlanan ksantin oksidazın 0,1 mM EDTA içindeki çözeltisi hazırlandı (0,2 U/mL).

Yöntemin Uygulanması

1. Spektrofotometre küvetine 3 mL distile su konuldu ve kör tüp olarak kullanıldı.
2. Spektrofotometre kör tüple sıfırlandı.
3. 3 mL'lik küvete 2,9 mL A çözeltisi koyuldu. Üzerine 50 μ L örnek eklendi.
4. Tepkime 50 μ L B çözeltisinin eklenip hızla karıştırılmasıyla başlatıldı ve 550 nm'de 2 dk boyunca 30 sn aralıklarla köre karşı absorbans değişimi okundu.
5. Kontrol (Blank) tüpü için örnek yerine 50 μ L distile su eklenerek köre karşı 2 dk boyunca 30 sn aralıklarla değişen absorbans okundu.
6. Örnekleri değerlendirme işlemi kontrol tüpüne göre yapıldı.
7. Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyonlardaki ($5 \cdot 10^{-7}$ M) SOD çözeltisinin 5 μ L, 10 μ L ve 15 μ L'deki değeri bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem için saf SOD enzimi kullanıldı. Aktivite değişimleri 550 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi.

% inhibisyon = (Δ OD örnek/ Δ OD kontrol) \times 100 formülü ile hesaplandı.

SOD'un bir ünitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen süperoksit anyonu ile sitokrom c'nin redüksiyonunun % 50 inhibisyonu için gerekli enzim miktarı olarak kabul edilmiştir.

3.5.2. MDA Analizi

Kullanılan Çözeltiler

% 10'luk Triklor Asetik Asit (TCA): 10 g TCA tartılarak 100 mL distile su içinde çözdürüldü.

% 0,675'lik Tiyobarbütirik Asit (TBA): 0,675 g TBA tartılarak 100 mL distile su içinde çözdürüldü.

Testin Prensibi

Malondialdehitin TBA ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin absorbansı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunur.

Yöntemin Uygulanması:

Her deney tüpüne 2,5 mL % 10'luk TCA ve üzerine 0,5 mL örnek konuldu (Kör tüpü hazırlanırken örnek yerine 0,5 mL distile su konuldu ve sonraki işlemler uygulandı). Tüpler vorteksenerek 90 °C'de su banyosunda 15 dk. bekletildi. Su banyosundan alınan tüpler buz dolu kaba alındı ve 15 dk. buz içinde bekletildikten sonra oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek elde edilen süpernatanttan 2 mL alınıp başka bir tüpe konuldu ve üzerine 1 mL TBA eklendi. 90 C'de su banyosunda 15 dk. bekletilip tekrar buz dolu kap içinde 15 dk. tutuldu. Tüpler oda sıcaklığına geldiğinde spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda kör tüpüne karşı absorbansları okundu.

Testin Hesaplanması

MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki molar ekstinksiyon katsayısı olan $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ esas alınarak hesaplandı.

Örnek Absorbansı = $a \times b \times c$

a = Ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), bu sabit bir değerdir.

b= 1 cm ışık yolu (spektrofotometrik analiz için kullanılan küvetin ışık yolunun 1 cm olması gerekir)

c= örnek konsantrasyonu

Konsantrasyon (mol / l) = Absorbans / $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times \text{Dilüsyon faktörü}$
formülüne göre hesaplandı.

Analizler ve analize ait hesaplamalar Draper ve Hadley (1990) ve Hommouda ve ark. (1995)'e göre yapıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Bütün sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edildi. Grupların değerlendirilmesinde ikili karşılaştırmalı t testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda sisplatin verilen sıçanların böbrek hücrelerinde siklik AMP'nin SOD ve MDA üzerine etkisi araştırılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm gruplara ait SOD aktivitesi ünite/mg protein, MDA düzeyi nmol/g doku olarak hesaplanmıştır.

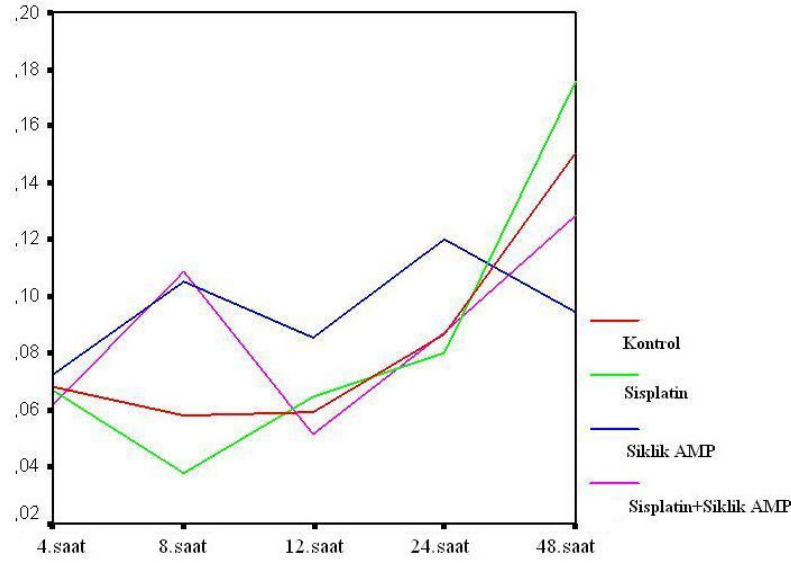
4.1. SOD Aktivitesi Sonuçları

Kontrol grubu, sisplatin, siklik AMP ve sisplatin+siklik AMP gruplarına ait, saatlere göre (4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde) SOD aktivitesi değişimi değerlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama \pm standart hata ve p değerlerine göre) Tablo 4.1'de, grupların zamana karşı SOD değerlerinin grafiksel ifadesi ise Grafik 4.1'de gösterildi. Bu değerlere göre sisplatin, siklik AMP ve sisplatin + siklik AMP grupları kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında SOD değerlerinin saatlere göre değişimi değerlendirildi.

Tablo 4.1. Deney grupları ve kontrol grubunda zamana bağlı SOD aktivitesi (IU/mg protein) değişimi değerlerinin istatistiksel sonuçları

GRUPLAR	SAATLER				
	4	8	12	24	48
Kontrol	0,068 \pm 0,027	0,058 \pm 0,020	0,059 \pm 0,025	0,086 \pm 0,040	0,150 \pm 0,060
Sisplatin	0,067 \pm 0,030	0,038 \pm 0,019 ^a	0,065 \pm 0,016	0,080 \pm 0,025	0,175 \pm 0,060
Siklik AMP	0,072 \pm 0,020	0,105 \pm 0,037	0,085 \pm 0,033	0,120 \pm 0,029	0,094 \pm 0,028
Sisplatin+ Siklik AMP	0,061 \pm 0,010	0,109 \pm 0,122	0,051 \pm 0,020	0,087 \pm 0,050	0,128 \pm 0,046

(a: sisplatin grubu siklik AMP grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05)

Grafik 4.1. Grupların zamana bağlı SOD aktivite değişimi

Sisplatin grubu SOD aktivite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde sisplatin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. 8. saatte sisplatin grubunda bir azalma görüldü ancak istatistiki açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$).

Siklik AMP grubu SOD değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde siklik AMP grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$).

Sisplatin+siklik AMP grubu SOD değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde sisplatin+siklik AMP grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. 8. saatte sisplatin+siklik AMP grubu SOD değerinin kontrol grubuna göre biraz arttığı görüldü ancak bu artış istatistiki açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$).

Sisplatin grubu ve siklik AMP grubu SOD değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında; 8. saatte siklik AMP'nin anlamlı bir yükseliş gösterdiği görüldü ($p<0,05$). 4, 12, 24 ve 48. saatlerde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$).

Sisplatin grubu ve sisplatin+siklik AMP grubu SOD değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde anlamlı bir fark gözlenmedi. 48. saatte

sisplatin+siklik AMP grubu SOD değerinin sislpatin grubuna göre azaldığı görüldü ancak bu azalma istatistiki açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$).

Siklik AMP ve sislpatin+siklik AMP grubu SOD değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$).

4.2. MDA Konsantrasyon Sonuçları

Kontrol grubu , sislpatin , siklik AMP ve sislpatin+siklik AMP gruplarına ait, saatlere göre (4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde) MDA düzeyi değerlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama \pm standart hata ve p değerleri) Tablo 4.2.'de ve grupların zamana bağlı ortalamalarının grafiksel ifadesi Grafik 4.2.'de gösterildi. Bu değerlere göre MDA'nın saatlere göre değişimi değerlendirildi.

Tablo 4.2. Deney grupları ve kontrol grubunda zamana bağlı MDA (nmol/g doku) düzeyi istatistiksel sonuçları

GRUPLAR	SAATLER				
	4	8	12	24	48
Kontrol	144,93 \pm 43,99	84,78 \pm 55,13	85,23 \pm 25,55	208,70 \pm 48,61	94,48 \pm 35,21
Sislpatin	90,33 \pm 49,62 a	182,40 \pm 74,38 d	116,90 \pm 28,12	101,05 \pm 41,71 a	70,93 \pm 32,45
cAMP	74,41 \pm 44,12 b,e	71,28 \pm 38,76 e	86,28 \pm 36,32	65,05 \pm 22,22 b	76,83 \pm 36,89
Sislpatin+cAMP	142,94 \pm 45,03	124,94 \pm 15,10	105,21 \pm 66,21	78,21 \pm 36,82 c	76,48 \pm 34,35

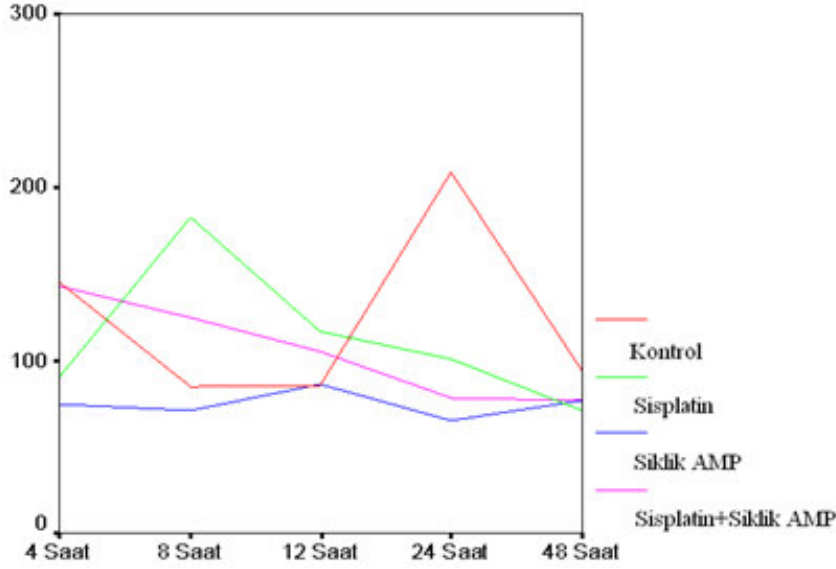
a: Sislpatin grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

b: Siklik AMP grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

c: Sislpatin+siklik AMP grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

d: Sislpatin grubu siklik AMP grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

e: Siklik AMP grubu sislpatin+siklik AMP grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

Grafik 4.2. Grupların zamana bağlı MDA düzeyi değişimi

Sisplatin grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; sisplatin grubunun MDA değerlerinin kontrol grubuna göre 4. saatte ve 24. saatte anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p < 0,05$). 8. ve 12. saatlerde sisplatin grubu MDA değerlerinin kontrol grubuna göre arttığı, sisplatin+siklik AMP gruplarında ise bu artışın az da olsa azaldığı gözlemlendi ancak bu değişimler istatistiki olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).

Siklik AMP grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; siklik AMP grubunun kontrol grubuna göre 4. ve 24. saatlerde anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p < 0,05$). 8, 12 ve 48. saatlerde anlamlı bir fark gözlemlenemedi ($p > 0,05$).

Sisplatin+siklik AMP grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 24. saatte sisplatin+siklik AMP grubunun kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği görüldü ($p < 0,05$). 8. ve 12. saatlerde sisplatin+siklik AMP grubunun kontrol grubuna göre artış gösterdiği ancak bunun istatistiki açıdan anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$).

Sisplatin ve sisplatin+siklik AMP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlenemedi. 8. ve 12. saatlerde sisplatin+siklik AMP grubu MDA değerlerinin, sisplatin grubuna göre az da olsa azalma gösterdiği görüldü ancak bu azalma istatistiki açıdan anlamlı değildi ($p > 0,05$).

Siklik AMP ve sisplatin+siklik AMP grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında 4. ve 8. saatte sisplatin+siklik AMP grubu MDA değerlerinin siklik AMP grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA SONUÇ

Vücudun tüm dokularında ortaya çıkabilen kanser türleri günümüzde önemini gittikçe arttırmaktadır. Dünya genelinde kanser türleri ile ilgili erken tanı, nedenlerinin ortaya çıkarılması, patogenezin açıklanması ve yeni tedavi şekilleri için ilaçların geliştirilmesi üzerine oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Bunun yanında kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan antineoplastik ilaçların etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak için yapılan çalışmalar da artarak devam etmektedir (Söğüt ve ark., 2004).

Kanser tedavisinde oldukça yaygın kullanılan sisplatin gibi antineoplastik ilaçlar, sıklıkla tümörlü doku dışındaki diğer dokuları da etkilemekte ve ciddi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu durumda tedavi dozunda kısıtlamaya gidilmekte ve bu da tümör dokusunun istenilen oranda sınırlandırılmasına engel olabilmektedir (Söğüt ve ark., 2004).

Kanser tedavisinde sık kullanılan bir anti-kanser ajan olan sisplatinin tedaviyi olumsuz etkileyen önemli yan etkileri olmaktadır. Bu yan etkilerden en önemlisi böbreklerde ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada sisplatin uygulanmış sıçanların böbrek hücrelerinde siklik AMP'nin radikal süpürücü enzim aktiviteleri üzerine etkisini araştırıldı. Tüm gruplara ait MDA nmol/g doku, SOD ünite/mg protein olarak hesaplanarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Sisplatin diğer organlara kıyasla böbreklerde daha fazla birikir ve tek doz 50-100 mg/m² verilmesinden sonra hastaların yaklaşık %28-36'sı doza bağlı nefrotoksisite geliştirir. Sisplatine bağlı tübüler toksisite proksimal tübül S3 segmenti, distal tübül ve toplayıcı tübüllerde izlenir. Sisplatin toksisitesinde iskemik zemin de muhtemelen rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, gerek insanlarda gerekse ratlarda sisplatin verilmesinden sonraki yaklaşık 3 saat içinde renal plazma akımında ve glomerüler filtrasyon hızında azalma saptanmıştır (Koç ve ark., 2006).

Sisplatine bağlı böbrek yetmezliğinde temel mekanizma apoptozis ve nekrozdur. Sisplatin, DNA'nın ağır metal alkilleyicisidir ve proksimal tübüllerde bulunan DNA molekülü ile reaksiyona girerek DNA hasarına yol açmaktadır. Bunun ardından da tübül epitel hücrelerinde apoptozis veya nekroz gelişmektedir. Serbest oksijen radikallerinin sisplatine bağlı renal tübüler hücre hasarında katkısı olduğu doğrulanmıştır (Kurt ve

ark., 2002; Mishima, 2006; Francescato ve ark., 2007). Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunun önlenmesi sisplatine bağlı sitotoksosite ve apoptoz gelişimini önleyebilmektedir (Evrenkaya ve ark., 2000; Koç ve ark., 2006).

Siklik AMP, hücre membranında yerleşmiş bulunan adenilil siklaz enziminin katalitik etkisiyle ATP'den sentezlenen ve fosfodiesteraz enziminin etkisiyle 5'-AMP'ye dönüşerek inaktif hale gelen çok önemli bir hücre içi nükleotittir (Akkuş ve ark., 1989; Lehninger, 2005).

Siklik AMP hücrelerde çeşitli etkiler gösterir. Çok sayıda metabolik enzimi fosforlayan ve bu yolla glukagon ve adrenalin gibi hormonlara hızlı bir yanıt verilmesini sağlayan bir serin/treonin proteinkinaz olan proteinkinaz A'nın allosterik bir etkinleştiricisidir (Smith ve ark., 2007).

Böbreklerde sisplatine bağlı olarak oluşan hasara karşı siklik AMP'nin etkisine yönelik yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Kodha ve Gemba (2001) tarafından rat renal cortical slices'da sefoloridin-bağlı hasarda siklik AMP'nin etkisi incelenmiş ve renal epitelyum hücrelerinde oluşan serbest radikal hasarına karşı dibütiril siklik AMP'nin koruyuculuğu gösterilmiştir.

Zhang ve Ma (2006) ototransplant rat böbreğinde iskemi-perfüzyon hasarında olprinone (tip 3 fosfodiesteraz inhibitörü) ile hücresele siklik AMP'nin arttırılmasının koruyuculuğunu göstermişler ve olprinone'nin intrasellular siklik AMP'nin arttırılması yoluyla iskemi perfüzyon hasarına karşı yararlı etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. Hamet ve ark (1975) üremide (böbrek yetmezliği sonucu kanda üre bulunması) siklik AMP'nin etkinliğinin azaldığı göstermişlerdir. Wong ve ark. (2007) siklik AMP'nin sisplatin uygulaması sonrası düştüğünü, sisplatin sitotoksitesinin siklik AMP konsantrasyonunu düşürdüğünü belirlemişler.

Mishima ve ark.'nın (2006) yaptıkları çalışmada siklik AMP analogları ve sisplatine bağlı renal hasara karşı tubuler hücreleri koruyan, forskolin ve prostasiklin analogları, beroplast gibi ajanlarının adenilil siklaz aktivitesini sitümüle ederek cAMP/PKA sinyalinin sisplatine bağlı nefrotoksositeye karşı korumada önemli rolü olduğu kaydedilmiştir.

SOD süperoksit radikalini hidrojen peroksida dönüştüren dismutasyon reaksiyonunu katalizleyen enzimdir (McCord ve Fridovich, 1969). Organizmada oksidan stresin arttığı bazı klinik durumlarda bu enzim sistemi aktivitesini artırarak koruyucu etkinliğini sürdürmeye çalışır (Erden, 1992). Sisplatin tarafından üretilen süperoksit SOD tarafından hemen hidrojen peroksit'e çevrilerek SOD aktivitesi azaltılmaktadır (Mishima, 2006).

Bu çalışmada 4, 8, 12, 24 ve 48. saat sonunda kontrol, sisplatin, siklik AMP ve sisplatin+siklik AMP uygulanan sıçanların SOD enzim aktivitesi değerlendirilmiştir.

8. saatte sisplatin grubu SOD değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma gösterdiği görülmüştür. 8. saatte siklik AMP ve sisplatin+siklik AMP grubunda ise SOD değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış bulunurken, 48. saatte de beklenilenin aksine sisplatin grubu SOD değeri anlamlı olmayan bir şekilde kontrol grubundan fazla bulunmuştur.

Siklik AMP verilmiş gruplarda SOD değerlerinin 4, 8, 12 ve 24. saatlerde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir yükseliş gösterdiği, buna karşılık 48. saatte ise kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir düşüş gösterdiği görülmüştür.

Sisplatin ve siklik AMP'nin birlikte verildiği sisplatin+siklik AMP grubu SOD değerleri 4, 12. ve 24. saatlerde kontrol grubuyla hemen hemen aynı değerlerdeydi. Genel olarak sisplatin+siklik AMP grubu SOD değerleri değerlendirildiğinde saatler arasında anlamlı bir fark görülemedi.

Mishima ve ark. yaptıkları çalışmada (2006), sisplatinin LLC-PK1(renal epitel hücresi) hücrelerinde aşırı miktarda reaktif oksijen türleri ürettiğini ve böylece sisplatinin SOD (CuZnSOD) değerini azalttığını kaydetmişlerdir. Yaptığımız çalışmada SOD değerlerinin sisplatin verilmesiyle artan serbest oksijen radikalleri nedeniyle azalması buna karşılık sisplatin ve siklik AMP'nin birlikte uygulanmasıyla bu azalmanın siklik AMP'nin etkisiyle kontrol seviyesine gelmesine de artış göstermesi beklenirdi.

Çalışmamızda sisplatin verilen grupların, 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlere göre, kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırılmaları sonucunda SOD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$) Sadece 8. saatte anlamlı olmasa da

sisplatin grubunun SOD değerinin kontrol grubuna göre azaldığı, sislpatin+siklik AMP grubunda ise sislpatin grubuna göre SOD değerinin az da olsa arttığı görülmüştür. 8. saatte istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sislpatin ve sislpatin+siklik AMP gruplarında SOD aktivitesi değerlendirildiğinde Mishima ve ark'nın çalışmasıyla uyumlu olduğu söylenebilir.

Oksidatif stres birçok biyolojik molekülde hasar oluşturur, hasarın en önemli hedefleri protein ve DNA'dır ve hasar sürecinden sonra sık sık lipit peroksidasyonu meydana gelmektedir (Halliwell ve Chirico, 1993).

MDA lipit hidroperoksitlerinin değerlendirilmesinde dikkat çekici bir belirleyicidir (Batsoglou, 1994). Lipit hidroperoksitler doğrudan DNA zincirini kırabilir ve lipit peroksil ve alkoksil radikalleri DNA'da oksidasyona neden olabilir (Yılmaz ve Ozan, 2003). Yapılan alışmalar sislpatine bağlı nefrotoksisitenin renal lipit peroksidasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Zhong ve ark., 1990). Ayrıca sislpatin tarafından oluşturulan hasarların artmış olan MDA düzeyleriyle doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir (Karahan ve ark., 2006).

Sıçanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda böbrek hücrelerinde sislpatine bağlı olarak lipit peroksidasyonunun arttığı belirlenmiştir (Nakano ve Gemba, 1989; Fukishi ve Gemba, 1989; Sadzuka, 1992; Mishima ve ark., 2006).

Çalışmamızda MDA'nın ölçümünde yaygın kullanılan bir metot olan ve MDA ile iki molekül TBA'nın reaksiyonu sonucu oluşan pembe kompleksin spektrofotometrede ölçümüne dayanan TBA yöntemi kullanılarak sislpatine bağlı MDA değişiklikleri değerlendirilmiştir.

Sislpatin grubunun MDA düzeylerinin 4. ve 24. saatte beklenenin aksine kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. 8. ve 12. saatte sislpatin gruplarının MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış gösterdiği ve bu artışın sislpatin ve siklik AMP'nin birlikte uygulanmasıyla biraz azaldığı gözlenmiştir. Sislpatin grubu MDA değeri ve 8. saatte siklik AMP grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. 4. ve 8. saatlerde ise sislpatin+siklik AMP grupları MDA değerleri siklik AMP grubuna göre anlamlı olarak artmıştır.

Mishima ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmaya göre sisplatin lipit peroksidasyonunu arttırmaktadır. Genel olarak gruplar değerlendirildiğinde saatlere göre MDA düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenememesine rağmen 8. ve 12. saatlerde MDA düzeyi sonuçlarımızın anlamlı olmasa da bu bulguyla örtüştüğü söylenebilir.

Elde edilen sonuçlar literatürde benzer çalışmaların çok az sayıda olması nedeniyle kendi içinde ve birkaç çalışma arasında değerlendirilmiştir. SOD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin olmaması, siklik AMP'nin tek başına sisplatinin yarattığı hasarla başa çıkamadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, sisplatin uygulanmış sıçanların böbrek hücrelerinde siklik AMP'nin SOD ve MDA seviyeleri üzerine etkilerini kesin olarak ifade edebilmek için siklik AMP'nin antioksidan etki yaratabilecek başka bir ajanla birlikte kullanılmasının daha etkili olabileceği ve diğer radikal süpürücü enzim aktivitelere de bakılarak daha ayrıntılı araştırmalara gerek olduğu kanısına varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Andrijevic, L., Andrijevic, I., 2001. The Effect of Nucleoside Analogues on Biochemical Parameters in Rats' Sera, *Archive of Oncology*, 9(3):155-9
2. Ak, A., Oto, A., 1988. Oksijen Serbest Radikalleri. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji*, Cilt:1, Sayı:1.
3. Akkuş, İ., Türkmen, F., Yeğın, M., 1989. Siklik 3', 5' –Adenozin Monofosfat (cAMP) ve Klinik Önemi. *Türkiye Klinikleri*, Cilt 9, Sayı 3.
4. Armstrong, DA., 1998. *Methods in Molecular Biology*, Volume 108, Toronto, Humana Press
5. Avcı, A., Çetin, R., Ergüder, İ.B, Devrim, E., Kılıçoğlu, B., Çandır, Ö., Öztürk, H.S, Durak, İ., 2008. Cisplatin Causes Oxidation in Rat Liver Tissues: Possible Protective Effects of Antioxidant Food Supplementation, *Turk J Med Sci*, 38(2): 117-120
6. Bolann, B.J., 1991. Ulvik, R.J, Improvement of a Direct Spectrophotometric Assay for Routine Determination of Superoxide Dismutase Activity, *Clin. Chem.*, 37/11, 1993-1999
7. Bolaman, Z., Demir, S., Köseoğlu, M., Enli, Y., Kadıköylü, G., Aslan, D., 2000. Multipl Miyelomalı Hastalarda Lipit Peroksidasyonu, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 1(3) : 13 – 15.
8. Bolaman, Z., Köseoğlu, MH., Demir, S., Kadıköylü, G., Barutca, S., Atalay, H., Aslan, D., 2003. Effect of α -Tocopherol on Lipid Peroxidation Caused by Cisplatin in Rat Kidney, *Turk J Haematol*, 20(1): 35-38
9. Botsoglou, N.A, Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis,A.J., Trakatellis, A.G., 1994. Rapid, Sensitive and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples, *J Agric. Food Chem.*, 42, 1931-1937
10. Burçak, G., Andican, G., 2004. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma, *Cerrahpaş J Med*, 35: 159-169.

11. Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanism. *Food and Chemical Toxicology*, 37,949-962.
12. Chirino, Y., Pedraza-Chaverri, J., 2008. Role of Oxidative and Nitrosative Stres in Cisplatin-induced Nephrotoxicity, *Exp Toxicol Pathol*, doi:10.1016
13. Cohen, G., Heikkila, R.E., 1974. The Generation of Hydrogen Peroxide, Superoxide Radical and Hydroxyl Radical by 6-Hydrodopamine, Dialuric Acid and Related Cytotoxic Agents. *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol.249, No.8, 2447-2452
14. Çimen, Ç., Öter, Ç., Demir, H., Savran, A., 2005. Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi, *YYÜ Vet Fak Der*, 16(1):15-20
15. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., 1997. Hastalıkların Patogenez ve Tedavisinde Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidanlar. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4:96-101.
16. Delibaş, N., Özcankaya, R., 1995, Serbest Radikaller, *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2(3):11-17.
17. Derin, D., Yazıcı, A., Erkoç, Ş., 2001. Şizofrenik Bozukluğu Olan Hastalarda Serbest Radikal Metabolizması ve Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemi Elemanlarının İncelenmesi. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 11:174-182.
18. Draper, H.H, Hadley, M, 1990. MDA Determination as a Index of Lipid Peroxidation, *Methods in Enzymology*, 186, 421-430
19. Dülger, H., Alıcı, S., Şekerlioğlu, M.R, Noyan, T., Yalçınkaya, A., 2002. Kanserli Hastalarda Kemoterapinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi. *Van Tıp Dergisi*, Cilt: 9, Sayı: 2.
20. Erden, M., 1992, Serbest Radikaller, *T Klin Tıp Bilimleri*, 12.
21. Erbay, A., Erbay, R., Baykam, N., Eren, Ş., Dokuzoğuz, B., 2003. Kızamıkta Oksidatif Stres. *İnfeksiyon Dergisi*, 17 (4) :381-383.

22. Erdoğan, S., 1999. Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz (PDE) Ailesi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Veteriner), cilt 13, Sayı 3, 431-436
23. Evrenkaya, R., Bilgi, O., Atasoyu, M, Gültepe, M., Tulbek, Y., 2000. Ratlarda Sisplatin Nefrotoksitesisi Üzerine Verapamil ve Balık Yağının Etkileri. Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi, 1:25-29.
24. Flohe, L., Otting, F., 1984. Superoxide Dismutase Assays, Methods in Enzymology, Vol 105, 93-104
25. Fukuishi, N., Gemba, M., 1989. Use of Cultured Renal Epithelial Cells for the Study of Cisplatin Toxicity. Jpn J Pharmacol., 50(2):247-9.
26. Francescato, H.D.C, Costa, R.S, Junior, F.B., Coimbra, T.M., 2007. Effect of Inhibition on Cisplatin-Induced Renal Damage, Nephrol Dial Transplant, 1 of 11, doi:10.1093/ntd/gfm144
27. Gönllüğü, T., Gönllüğü, U., 2007. Kanser Tedavisinde Teofilin. Dicle Tıp Dergisi, Cilt:34, Sayı:2, (150-154).
28. Güleç, M., Yılmaz, R., Iraz, M., Ağlamış, S., Söğüt S., 2004. Sisplatin Nefrotoksitesisi Oluşturulan Sıçanların Plazma Glutatyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz, AdenozinDeaminaz Aktiviteleri ve Nitrik Oksit Seviyelerine Ginkgo Bloba Ekstraktının Etkileri. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 24:585-591.
29. Günaydın, B., Çelebi, H., 2003. Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkileri. Anestezi Dergisi, 11(2): 87-98.
30. Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal Antioksidanlar, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt 23, ek (1/1):85-89
31. Hammouda, A.R., Khalil, M.M., Salem, A., 1995. Lipid Peroxidation Products in Pleural Fluid for Separation of Transudates and Exudates, Clinical Chemistry, 41, 1314-1315
32. Halliwell, B., Chirino, S., 1993. Lipid Peroxidation: Its Mechanism, Measurement, and Significance. Am J Nutr, 57(suppl):715-25.

33. Hamet, P., Stouder, D., Ginn, E., Hardman, J., Liddle, G., 1975. Studies of the Elevated Extracellular Concentration of Cyclic AMP in Uremic Man. The Journal of Clinical Investigation, Volume 56:339-345.
34. Hanigan, M., Devarajan, P., 2003. Cisplatin Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms. Cancer Ther., 1:47-61.
35. Ichikawa, I., Kiyama, S., Yashioka, T., 1994. Renal Antioxidant Enzymes : Their Regulation and Function. Kidney International, Vol.45, pp.1-9.
36. Karahan, İ., Yılmaz, S., 2006. Ratlarda Cisplatin ve Gentamisin Kan ve Karaciğerde Oluşturdukları Oksidatif Stres Üzerine Likopenin Etkileri. F.Ü Sağlık Bil. Dergisi, 20(1),39-43.
37. Kılınç, K., Kılınç, A., 2002. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 33(2):110-118.
38. Kodha, Y., Gemba, M., 2001. Modulation by cyclic AMP and Phorbol Myristate Acetate of Cephaloridine-induced Injury in Rat Renal Cortical Slices. Jpn. J. Pharmacol, 85,54-59.
39. Koç, M., Arıkan, H., Odabaşı, Z., Akoğlu, E., 2006. İskemik ve Toksik Akut Tübüler Nekroz Patofizyolojisi, Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 15 (1) 13-24
40. Kurt, E., Evrensel, T., Gönüllü, G., Kanat, Ö., Demiray, M., Arslan M., Ünlü, Ö., Dilek, K., Manavoğlu, O., 2002. Cisplatin'e Bağlı Böbrek Toksisitesi ve Sentetik Oral Prostaglandin E₁ Analogunun Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 28 (2): 17-20.
41. Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem, 193(1):265-75.
42. Maxwell, S., Lip, G., 1997. Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Disease. Br J Clin Pharmacol, 44: 307-317.
43. McCord, J., The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress, 2000. The American Journal of Medicine. Volume 108:652-57.

44. McCord, JM., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase, An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin), The Journal of Biological Chemistry, Vol.244, No.22, 6049,6055
45. Mercan, U., 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYU Vet Fak Derg., 15(1-2):91-96.
46. Memişoğulları, R., 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi, Dicle Tıp Dergisi, 3:30-39
47. Mishima, K., Baba, A., Matsuo, M, Itoh, Y., Oishi, R., 2006. Protective Effect of cyclic AMP against Cisplatin-induced Nephrotoxicity. Free Radic Biol Med., 40(9):1564-77.
48. Nakano, S., Gemba, M., 1989. Potentiation of Cisplatin-induced Lipid Peroxidation in Kidney Cortical Slices by Glutathione Depletion. Jpn J Pharmacol., 50(2):87-92.
49. Nelson, D., Cox, M., 2005. (Çeviri editörü: Kılıç, N.) Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Palme Yayıncılık.
50. Özkan, Y., Güney, H., Koca, S., Karata, F., Dönder, E., 2003. Orlistat Tedavisinin Serum A, E, C Vitamini Düzeylerine ve Oksidatif Stres Üzerine Etkileri. T Klin Tıp Bilimleri, 23: 464-470.
51. Öztürk, M., Güzelhan, Y., Sayar, K., Tüzün, Ü., 2001. Yaygın Gelişimsel Bozukluğu Olan Çocuklarda Plazma Malondialdehit ve Glutatyon Düzeylerinin Araştırılması. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, cilt:11, sayı:3.
52. Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, K.J.A., 2006. Free Radical Biology and Medicine: It's a gas, man! Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 291:R491-R511.
53. Saad, S.Y, Najjar, T.A.O., Alashari, M., 2004. Role of non-selective Adenosine Receptor Blockade and Phosphodiesterase Inhibition in Cisplatin-induced Nephrogonadal Toxicity in Rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 31,862-867.

54. Sadzuka, Y., Shoji, T., Takino, Y., 1992. Mechanism of the Increase in Lipid Peroxide induced by Cisplatin in the kidneys of Rats, Toxicol Lett., 62(2-3):293-300.
55. Savaş, H., Gergerlioğlu, S., Gürel, A., Selek, S., Savaş, E., Koçoğlu, E., Özen, M., Herken, H., Akyol, Ö., 2005. İkiüçlü Bozukluk Hastalarında Ötimik Evrede Artmış Ksantin Oksidaz ve Malondialdehid Düzeyleri. *Klinik Psikiyatri*, 8:180-185.
56. Sakac, V., Sakac, M., 2000, Free Oxygen Radicals and Kidney Diseases-Part I, *Med Preg*, 53(9-10): 463-74
57. Safirstein, R., Miller, P., Guttenplan, J.B, 1984. Uptake and Metabolism of Cisplatin by Rat Kidney, *Kidney International*, Vol. 25, pp. 753-758
58. San, A., Selçuk, N.Y., 1993. Atrial Natriüretik Peptid, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 1(1-6)
59. Smith, C., Marks, A., Liberman, M., 2007. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım (Çeviri editörleri: İnal, ME., Atik, U., Aksoy, N., Haşimi, A.). Güneş Tıp Kitabevleri.
60. Söğüt, S., Yılmaz, HR, Songur, A., Güleç, M., Kotuk, M., Ağlamış, S., 2004. Sıçanlarda Sisplatin ile Oluşturulan Nefrotoksisitede Bazı Metabolik Enzim Aktiviteleri ve Bunlar Üzerine E vitamininin etkileri, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2(1):23-28
61. Tylicki, L., Rutkowski, B., Hörl, W., 2003. Antioxidants: A Possible Role in Kidney Protection, *Kidney Blood Press Res*, 26:303-314.
62. Wang, H., Li, M., Lin, W., Wang, W., Zhang, Z., Rayburn, E.R., Lu, J., Chen, D., Yue, X., Shen, F., Jiang, F., He, Jie, Wei, Wu, Zeng, X., Zhang, R., 2007. Extracellular Activity of cyclic AMP-dependent Protein Kinase as a Biomarker for Human Cancer Detection: Distribution Characteristics in a Normal Population and Cancer Patients, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16 (4)

63. Yalçın, U., Şahin, G., 2004. Kanser ve Böbrek, Türkiye Klinikleri J Nephrol, Sayı 2
64. Yazıcı, C., Köse, K., 2004. Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 13(2) 56-65
65. Yılmaz, S., Ozan, ST., 2003. Meme Kanseri Hastalarında Lipit Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki, Türk Biyokimya Dergisi, 28 (4): 252-256
66. Yılmaz, R., Söğüt, S., Özyurt, H., Iraz, M., Yıldırım, Z., Akyol, Ö., 2004. Sıçanlarda Sisplatinle Oluşturulan Nefrotoksisitede Metabolik Enzim Aktivitelerine Kafeik Asit Fenil Ester'in Etkisi, Van Tıp Dergisi, 11(1):1-6.
67. Zhang, Y., Ma, Q., 2006. The Enhancement of Cellular cAMP with Olprirone Protects Autotransplanted Rat Kidney Against Cold Ischemia-Reperfusion Injury. Transplant Proc, 38 (5): 1580-3.
68. Zhong, L.F., Zhang, J.G., Zhang, M., Ma, S.L., Xia, Y.X., 1990. Protection Against Cisplatin-induced Lipid Peroxidation and Kidney Damage by Proceine in Rats, Arch Toxicol, 64:599-600

Online Kaynaklar

69. www.biomatrixone.com/support_anti-ox.html, 2008
70. www.nature.com/.../v73/n9/fig_tab/5002786f1.html, 2008
71. www.smokersrx.com/why_skin_ages.html, 2008
72. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cisplatin-2D.png>, 2008
73. http://www.nature.com/ki/journal/v73/n9/fig_tab/5002786f1.html, 2008
74. sandwalk.blogspot.com/2007_05_01_archive.html, 2008
75. www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/notlar/1226997135.pdf, 2008
76. courses.washington.edu/conj/gprotein/kinasea.gif, 2008

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı : Hilal ALTINKAYNAK

Doğum yeri : Merzifon

Doğum tarihi : 20.06.1977

Medeni hali : Bekar

Bildiği yabancı diller: İngilizce

Eğitim durumu:

Lise : Amasya Lisesi (1994)

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi/ Fen-Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü (1999)

Çalıştığı kurum/yıl : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı (2001 -)