



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**AMOKSİSİLİN KLAVULANİK ASİT, AMOKSİSİLİN
KLAVULANİK ASİT + VİTAMİN UYGULAMASININ
RATLARIN ÇEŞİTLİ DOKULARINDAKİ
MALONDİALDEHİT VE ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine ALTIN

Samsun

Haziran-2016



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**AMOKSİSİLİN KLAVULANİK ASİT, AMOKSİSİLİN
KLAVULANİK ASİT + VİTAMİN UYGULAMASININ
RATLARIN ÇEŞİTLİ DOKULARINDAKİ
MALONDİALDEHİT VE ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine ALTIN

Danışman

Prof. Dr. Ali ERTEKİN

Samsun

Haziran-2016

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Emine ALTIN tarafından Prof. Dr. Ali ERTEKİN danışmanlığında hazırlanan Amoksisilin Klavulanik Asit, Amoksisilin Klavulanik asit + Vitamin Uygulamasının Ratların Çeşitli Dokularındaki Malondialdehit ve Antioksidan Düzeylerine Etkisi başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından /.../2016 tarihinde yapılan sınav ile Veteriner Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Doç. Dr. Aydın HİM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, tezimin planlanması ve çalışılmasında yardımını esirgemeyen, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali ERTEKİN'e, eğitimim boyunca değerli bilgilerinden yararlandığım, üzerimde emeği geçen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gül Fatma YARIM'a, Sayın Prof. Dr. Sena ÇENESİZ'e, Sayın Doç Dr. Gülay ÇİFTÇİ'ye ve Sayın Doç. Dr. Cevat NİSBET'e teşekkürü bir borç bilirim.

Histolojik çalışmalarda tezime katkılarını sunan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Şerife TÜTÜNCÜ'ye ve Sayın Yrd. Doç Dr. Tuğrul ERTUĞRUL'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, hayvan deneyleri ve laboratuvar çalışmaları aşamasında yanımda olan sevgili dostlarım doktora öğrencisi Veteriner Hekim Ayris SALT'a, yüksek lisans öğrencileri Biyolog Elif TUNA, Biyolog Dilek ZORLU, Biyomühendis Berika TAŞTEKİN, Biyoloji Öğretmeni Emine İncilay TORUNOĞLU, Diyetisyen Tuğba ER ve Kimyager Merve ÖZCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca manevi desteklerini her zaman hissettiğim, beni bugünlere getiren, canım aileme sabır ve anlayışları için şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.15.015 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

AMOKSİSİLİN KLAVULANİK ASİT, AMOKSİSİLİN KLAVULANİK ASİT+VİTAMİN UYGULAMASININ RATLARIN ÇEŞİTLİ DOKULARINDAKİ MALONDİALDEHİT VE ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Amaç: Bu çalışmayla; amoksisilin klavulanik asitin, ratların karaciğer ve böbrek dokusunda antioksidan savunma mekanizması ve oksidatif stres durumu üzerine etkilerini incelenmesi ve antibiyotiğe ek olarak vitamin uygulamasının oksidatif stresi azaltıcı ve koruyucu bir etkiye sahip olup olmadığı araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot: Toplam 49 adet Wistar–Albino ırkı erkek rat; 1. grup: Amoksisilin klavulanik asit, 2. grup: Amoksisilin klavulanik asit + vitamin C, 3. grup: Amoksisilin klavulanik asit + vitamin E, 4. grup: Amoksisilin klavulanik asit + vitamin C+ vitamin E, 5. grup: Vitamin C, 6. grup: Vitamin E, 7. grup: Kontrol grubu olacak şekilde rastgele 7 gruba ayrıldı. Yedi gün süren çalışma sonunda ratlardan alınan karaciğer ve böbrek dokusunda MDA, GSH, CAT, vitamin C, total protein düzeyleri ile plazma ALT, AST ve GGT enzim aktiviteleri ölçüldü.

Bulgular: Plazma enzim düzeyleri incelendiğinde; sadece amoksisilin klavulanik asit verilen 1. grupta ALT enzim düzeyi, kontrol grubuna göre önemli bir artış gösterdi ($p<0,001$). Böbrek dokusuna ait bulgularda; MDA düzeyi kontrol grubuna kıyasla, sadece 1. grupta önemli bir artış gösterdi ($p<0,05$). Böbrek dokusu GSH düzeyleri incelendiğinde; 2. ve 4. grupta kontrol grubuna kıyasla GSH düzeylerinde önemli miktarda azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Böbrek dokusu CAT aktiviteleri; kontrole kıyasla, 1. grupta önemli bir artış gösterdi ($p<0,01$). Dördüncü grupta ise kontrole göre azalma gösterdi ($p<0,01$). Altıncı grupta da kontrole kıyasla CAT düzeylerinde önemli bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Böbrek dokusu vitamin C miktarı; kontrol grubuna kıyasla, 1. grupta önemli derecede daha düşük bulundu ($p<0,001$). Karaciğer dokusu MDA düzeyleri, kontrol grubuna göre diğer grupların tamamında önemli miktarda artış gösterdi (1., 3. ve 5. grup, $p<0,05$; 2., 4. ve 6. grup, $p<0,01$). GSH düzeyinde sadece 4. grupta kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,01$). CAT aktiviteleri kontrol grubuna göre diğer bütün gruplarda azalmış olup, bu azalmalar 1. ve 2. grupta ($p<0,01$) ve 6. grupta ($p<0,05$) anlamlıdır. C vitamini miktarları kontrole kıyasla; 1. grup ($p<0,001$) ve 2. grupta ($p<0,01$) önemli derecede azaldı. Total protein miktarı karaciğer dokusunda sadece 4. grupta kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) azaldı.

Sonuç: Amoksisilin klavulanik asit kullanımında MDA, antioksidan maddeler, vitaminler ve enzim düzeylerinde gözlenen değişimler, karaciğer ve böbrek hücrelerinde oksidatif hasardan kaynaklı kısmen yıkımlanmanın şekillenmiş olabileceğini göstermektedir. Hastalığın radikal tedavisi süresince kullanılan ilaçlardan kaynaklanabilecek olası oksidatif hasarlara karşı antibiyotiğe ek olarak antioksidanların da kullanılmasının faydalı olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Antioksidan savunma; amoksisilin klavulanik asit; malondialdehit; rat; vitamin

Emine ALTIN, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2016

ABSTRACT

THE EFFECTS OF AMOXICILLIN CLAVULANIC ACID, AMOXICILLIN CLAVULANIC ACID + VITAMIN ADMINISTRATION ON MALONDIALDEHYDE AND ANTIOXIDANT LEVELS IN VARIOUS TISSUES OF THE RATS

Aim: It was aimed to investigate the effects of amoxicillin clavulanic acid on antioxidant defense mechanism and oxidative stress in liver and kidney tissues of the rats and aimed to investigate whether vitamin application with antibiotics have an effect on reducing oxidative stress and protective effectiveness or not.

Material and Method: 49 Wistar-albino male rats were randomly divided into 7 groups. We applied; 1.group: Amoxicillin clavulanic acid, 2. group: Amoxicillin clavulanic acid + Vitamin C, 3. group: Amoxicillin clavulanic acid + Vitamin E, 4. group: Amoxicillin clavulanic acid + Vitamin C + Vitamin E, 5. group: Vitamin C, 6. group: Vitamin E and 7. group: Saline solution as a control group. After 7 days drug and vitamin administration period, MDA, GSH, CAT, vitamin C, total protein levels in liver and kidney tissue of the rats were analyzed, and plasma ALT, AST and GGT levels were measured.

Results: Plasma enzyme levels: only group 1 showed an increase in ALT enzymes activities. Renal tissue MDA levels increased in group 1 compared to the control group ($p < 0.05$). A significant decrease were determined in GSH levels in group 2 and 4 compared to the control group ($p < 0,05$). CAT activities showed a significant increase in group 1 ($p < 0.01$) and group 6 ($p < 0.05$). Group 4 showed a decrease in GSH levels compared to control ($p < 0.01$). Renal tissue vitamin C content was significantly lower in group 1 compared to the control ($p < 0.001$). Liver tissue MDA levels were increased in all the other groups than the control group (1st, 3rd and 5th group, $p < 0.05$; 2nd, 4th and 6th groups, $p < 0.01$). GSH levels decreased in only group 4 is statistically significant ($p < 0.01$). CAT activities decreased in all other groups compared to the control group, (group 1 and 2; $p < 0.01$, group 6; $p < 0.05$) were significant. Compared to the control; vitamin C amounts decreased in group 1 ($p < 0.001$) and group 2 ($p < 0.01$) significantly. Amount of total protein in liver tissue decreased only in group 4 ($p < 0.001$).

Conclusion: Amoxicillin clavulanic acid induced changes in MDA, antioxidants, vitamins, and enzyme levels that indicates liver and kidney cells may partially disintegrated due to oxidative damage. Our results suggest that use of combined administration of antioxidants and antibiotics may be useful against drug-induced oxidative stress.

Keywords: Antioxidant defense; amoxicillin clavulanic acid; malondialdehyde; rat; vitamin

Emine ALTIN, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	: Alanin Transaminaz
AMC	: Amoksisilin/Klavulanik Asit
AMX	: Amoksisilin
AST	: Aspartat Transaminaz
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
BSA	: Sığır Serum Albumini
CA	: Klavulanik Asit
CAT	: Katalaz
DEHAM	: Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
DNPH	: 2,4-dinitrofenilhidrazin
DTNB	: 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoik asit)
ETZ	: Elektron Taşıma Zinciri
FDA	: Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
GGT	: Gama-Glutamil Transferaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
i.m.	: İntramüsküler
i.p.	: İntraperitoneal

i.v.	: İntravenöz
LPO	: Lipit Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Protein
per os	: Peroral
R•	: Karbon merkezli radikal
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROOH	: Organik peroksitler
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
s.c.	: Subkutan
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: 2-tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikarboksilik Asit
TNB	: 5'-tiyo-2-nitrobenzoik asit
α-TTP	: Hepatik α -tokoferol Transfer Proteinini

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Amoksisilin	3
2.1.1. Etki Mekanizması	3
2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri	4
2.1.3. Tedavide Kullanımı	4
2.2. Klavulanik Asit	5
2.3. Amoksisilin Klavulanik Asit	6
2.4. Serbest Radikaller	8
2.4.1. Serbest Radikallerin Tanımı ve Genel Özellikleri	8
2.4.2. Biyolojik Sistemlerde Oluşan Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	9
2.4.3. Süperoksit Radikali	12
2.4.4. Hidrojen Peroksit	13
2.4.5. Hidroksil Radikali	14
2.4.6. Singlet Oksijen	15
2.4.7. Hipokloröz Asit	16
2.4.8. Peroksil Radikali	16
2.4.9. Nitrik Oksit	17
2.4.10. Peroksinitrit	18
2.5. Serbest Radikallerin Etkileri ve Oluşturduğu Hasarlar	18
2.5.1. Serbest Radikallerin Membran Lipitleri Üzerine Etkileri	20
2.5.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	20
2.5.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	21
2.5.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	21
2.6. Serbest Radikallerin Yararları	22
2.7. Lipit Peroksidasyonu	23

2.7.1. Malondialdehit.....	24
2.8. Antioksidan Savunma Sistemi.....	26
2.8.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	27
2.8.2. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	27
2.8.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx).....	27
2.8.4. Katalaz (CAT).....	29
2.8.5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	29
2.8.6. Glutatyon (GSH).....	29
2.8.7. A Vitamini ve Karotenoidler.....	31
2.8.8. C Vitamini.....	33
2.8.9. E Vitamini.....	36
3. MATERYAL VE METOT.....	38
3.1. MATERYAL.....	38
3.1.1. Deney Hayvanları.....	38
3.1.2. Deney Hayvanlarının Gruplara Ayrılması ve Yapılan Uygulamalar.....	38
3.1.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması.....	39
3.2. METOT.....	40
3.2.1. Dokuda Malondialdehit Tayini.....	40
3.2.2. Dokuda Redükte Glutatyon (GSH) Tayini.....	41
3.2.3. Dokuda Vitamin C Tayini.....	42
3.2.4. Dokuda Katalaz Tayini.....	43
3.2.5. Dokuda Total Protein Tayini.....	44
3.2.6. Plazmada ALT, AST ve GGT Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.....	45
3.3. Histolojik Metotlar.....	46
3.4. İstatiksel Analizler.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Plazma Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular.....	47
4.2. Böbrek Dokusuna İlişkin Bulgular.....	47
4.3. Karaciğer Dokusuna İlişkin Bulgular.....	48
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	48
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63

KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	76



1. GİRİŞ

Antibiyotikler insan sağlığında ve hayvansal üretimde bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde, koruyucu ve önleyici olarak kullanılmaktadır. Aşırı antibiyotik tüketimi insan ve hayvan sağlığı açısından beraberinde bazı riskler de taşımaktadır. Bakterilerin geliştirdiği direnç, ilaç kalıntısı ve dokuda oluşan hasar antibiyotik kullanımı sonucu oluşan istenmeyen durumlardandır (Kum ve Sekkin, 2012).

Amoksisilin (AMX), mikroorganizmaların neden olduğu bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılan orta spektrumlu, beta-laktam antibiyotiktir. Amoksisilin gram-pozitif organizmalara karşı geniş etkili, gram-negatif organizmalar için etkisi sınırlı bir antibiyotiktir. AMX, bakteriyel hücre duvarlarının sentezini inhibe ederek etki eder. Gram-pozitif bakterilerde hücre duvarının ana bileşenini oluşturan lineer peptidoglikan polimer zincirleri arasındaki çapraz bağlanmayı inhibe eder. Ağız yoluyla alınımını takiben, diğer beta-laktam antibiyotiklerden daha iyi absorbe edilmesi sebebiyle sınıfında tercih edilen bir antibiyotiktir. AMX, beta-laktamaz üreten bakteriler tarafından parçalanmaya duyarlı olan bir antibiyotiktir. Bu nedenle, duyarlılığını azaltmak için klavulanik asit ile birlikte verilebilir (Ünal ve ark, 2008).

Streptomyces clavuligerus kültürlerinden elde edilen klavulanik asit (CA), beta laktamazların çoğu ile etkileşir (özellikle *S. aureus* ve *B. fragilis*). Richmond- Sykes sınıflandırmasına göre tip II, III, IV, V beta laktamazları, *B. fragilis*'in beta laktamazlarını ve stafilokok beta laktamazları ve geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. İlk sınıfta yer alan kromozom kaynaklı beta laktamazlara karşı etkisiz olan CA, *in vitro* ortamda, yüksek konsantrasyonlarda, etkilidir. Antibakteriyel açıdan zayıf olan klavulanik asit, amoksisilin ile kombine edildiğinde beta laktamaz salgılayan, amoksisiline dirençli gram negatif ve gram pozitif aerobik ve anaerobik bakteriler, bu kombinasyona duyarlı hale gelir (Dökmeci, 2000).

Vitamin C suda eriyen bir bileşiktir. Moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c, gibi bileşikleri indirgeyen, sulu ortamlarda serbest radikallerle tepkimeye girebilen bir vitamindir. Kollajen ve epinefrin sentezinde, tirozin yıkımında, safra oluşumunda ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda rol alır. Hidroksil ve süperoksit radikallerini ortamdaki süpürücü etkisi vardır. Plazma konsantrasyonu düşük olduğunda oksidan özellik gösterir (Memişoğulları, 2005).

Vitamin E veya doğal aktif türevi olan α - tokoferol yağda çözünen bir vitamin olup endojen bir antioksidandır. Yiyeceklerde, özellikle bitkisel yağlarda yumurta sarısında, sütte, margarinde, sebze yapraklarında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Alfa-tokoferol E vitamini aktivitesi gösteren doğal 8 tokoferolden en aktif olanıdır. E vitamininin doymamış yağ asitlerini *in vitro* stabilize ettiği ve oksidasyon nedeniyle oluşan zararlı etkilere karşı hücre membranını koruduğu bilinmektedir. Isı ve ışığa dayanıklı olan tokoferoller, antioksidan etkilerine karşın, oksijenli ortamda oksitlenerek kinon bileşiğine dönüşmektedirler (Dökmeçi, 2000).

Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır. Organizmanın antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda artan serbest radikal düzeyleri hücrelerde hasar ve fonksiyon bozukluklarına neden olur (Tabakoğlu ve Durgut, 2013). Bu hasarların yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, immün sistemde zayıflama, otoimmün bozukluklar, kanser, katarakt, artrit gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Çakatay ve Kayalı, 2006; Shinde ve ark., 2012).

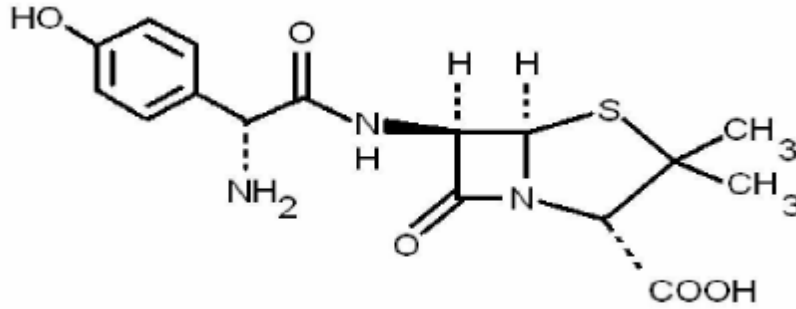
Bu tez çalışmasıyla; antibiyotikten kaynaklanabilecek olan oksidatif stres tehdidine karşı, antibiyotiğe ek olarak vitamin uygulamasının oksidatif stresi azaltıcı ve koruyucu olarak yararlı olup olmadığı irdelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Amoksisilin

Amoksisilin (AMX), mikroorganizmaların neden olduğu bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılan orta spektrumlu, beta-laktam antibiyotiktir. AMX gram-pozitiflere karşı geniş etkili, gram-negatif organizmalar içinse etkisi sınırlı bir antibiyotiktir. AMX, bakteriyel hücre duvarlarının sentezini inhibe ederek etki eder. Gram-pozitif bakterilerde hücre duvarının ana bileşenini oluşturan lineer peptidoglikan polimer zincirleri arasındaki çapraz bağlanmayı engeller. Ağız yoluyla alınımını takiben, diğer beta laktam antibiyotiklerden daha iyi absorbe edilmesi sebebiyle sınıfında tercih edilen bir ilaçtır. AMX, beta-laktamaz üreten bakteriler tarafından parçalanmaya duyarlı olan bir antibiyotiktir. Bu nedenle, duyarlılığını azaltmak için klavulanik asit ile birlikte verilebilir (Ünal ve ark, 2008).

Bir aminopenisilin olan AMX, benzilpenisilin yan zincirine amino grubu eklenmesiyle oluşur (Kayaalp, 2009).



Şekil 1. Amoksisilin kimyasal yapısı (Ünal ve ark., 2008'den)

2.1.1. Etki Mekanizması

Beta-laktam antibiyotiklerden penisilin grubunda bir aminopenisilin olan amoksisilin, bakterisidal bir preparattır. Duyarlı organizmalarda hücre duvarı sentezini engelleyerek etki gösterir (Alpaslan, 2008). Bakterilerde hücre duvarı sentezinde görev alan disakkarit peptitlerin karboksi ucu ile benzerlik gösterdiği için, bakteriyel sitoplazmik membranda bulunan penisilin bağlayıcı protein (PBP)'lere bağlanırlar. Bu bağlanma hücre duvarı sentezindeki son basamak olan transpeptidasyon reaksiyonunu

inhibe eder. Ayrıca bakteri hücre duvarında lezyonlara neden olan otolitik enzimleri aktive eder (Leblebicioğlu ve ark., 2003; Trevor ve ark., 2013).

2.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

Mide asidinden etkilenmeyen amoksisilin oral yolla alınır. Duodenumdan emilir, serum doruk noktasına 1-2 saat içinde ulaşır. Gıda alımı, penisilin grubu antibiyotiklerin emilimini olumsuz yönde etkilediği halde; amoksisilin emilimini fazla etkilememektedir (Leblebicioğlu ve ark., 2003). Oral yolla alınan amoksisilinden biyoyararlanım %70 civarındadır (Aktuğlu, 1989). Çoğunlukla ağız yoluyla alınan amoksisilin, intravenöz (i.v.), intramusküler (i.m.) enjeksiyonla veya i.v. infüzyonla da verilebilir (Kayaalp, 2009).

Amoksisilin serum proteinlerine %17-20 oranında bağlanır (Leblebicioğlu ve ark., 2003; Aktuğlu, 1989). Proteinlere daha yüksek oranda bağlanan penisilinlerin dokulardaki konsantrasyonları daha düşüktür (Leblebicioğlu ve ark., 2003). Amoksisilin enfekte olmuş dokulara ve organik sıvılara geçişi iyi düzeydedir. Sağlıklı bireylerle kan-beyin bariyerini geçmediği halde, cerrahi hastalarda yeterli düzeyde geçiş gözlemlenmiştir. Anne sütüne de az miktarda geçtiği bildirilmiştir (Karaca ve Çankal, 2006).

AMX'in, absorbe edilen dozunun yaklaşık %50-70'i değişime uğramadan böbreklerden atılır. Kalan kısmının eliminasyonu da karaciğerde gerçekleşir (Kayaalp, 2009). Hepatoksik etkisi çok nadir olan amoksisilin, karaciğer için güvenli bir antibiyotik olarak kabul görmektedir. Amoksisilin/klavulanik asit (AMC) ise kolestatik hepatite sebep olabilmektedir. Erişkinlerde görülen bu hasar, erkeklerde kadınlara oranla daha fazladır. 55 yaş üstü erkeklerde 10 günden fazla süren tedavilerde risk artmaktadır (Leblebicioğlu ve ark., 2003).

2.1.3. Tedavide Kullanımı

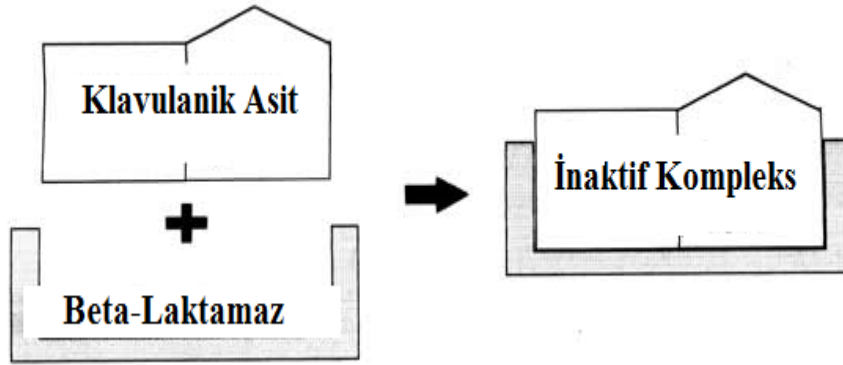
Amoksisilin, *E. coli*, *Enterokok*, *Salmonella* ve *P. muloccida* türleri üzerinde güçlü; *Shigella* ve *Enterobakter* türleri üzerinde ise daha zayıf etki gösterir (Kaya, 2007). Ayrıca *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* üzerine de etkili bir antibiyotiktir (Trevor ve ark., 2013).

Solunum yolu enfeksiyonlarının, üriner enfeksiyonların, akut otitis medianın, çocuklarda streptokokal farenjitin, bakteriyel sinüzitin, shigella ve salmonella

gastroenteritlerinin, bakteriyel bronşitin, gonore ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Kayaalp, 2009; Dökmeci, 2000).

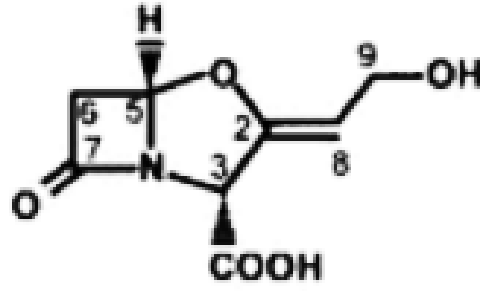
2.2. Klavulanik Asit

Streptomyces clavuligerus tarafından sentezlenen klavulanik asit (CA), anlamlı bir antibiyotik etkinliğe sahip değildir. Çeşitli gram-negatif ve gram-pozitif aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların ürettiği β -laktamaz enzimine irreversibl bir biçimde bağlanmasıyla enzimi inaktive eder (Brunton ve ark., 2009; Kayaalp, 2009). Bunun sonucu olarak penisilin yıkımını önler ve antimikrobiyal bir direnç oluşturur (Salvo ve ark., 2007). Penisilinaz duyarlı beta laktam ilaçlarla kombine edilir (Trevor ve ark., 2013). Tuz formunda (sodyum veya potasyum klavulanat) kullanılır (Kayaalp, 2009).



Şekil 2. Klavulanik asidin etki mekanizması (Pozzi ve Ben-David, 2002'den)

Ağız yoluyla emilimi iyi olan CA, ayrıca parenteral olarak da alınabilir (Brunton ve ark., 2009). Serum doruk noktasına 40-120 dakikada ulaşır, yarılanma süresi de 0,76-1,4 saattir. Hidroliz ve dekarboksilasyon ile vücutta inaktif edilen klavulanik asidin, %20-60 kadarı böbreklerden değişime uğramadan atılır. Plasentayı geçebilen klavulanik asidin anne sütüne geçişi yoktur (Leblebicioğlu ve ark., 2013; Dökmeci, 2000).



Şekil 3. Klavulanik asidin kimyasal yapısı (Liras ve Rodríguez-Garcia, 2000'den)

2.3. Amoksisilin Klavulanik Asit

Amoksisilin tek başına iken gram negatif bakteriler tarafından salgılanan beta laktamazlar aracılığıyla yıkıma uğradığı için, bu durumu önlemek amacıyla bir beta laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ile birlikte kullanılır (Brunton ve ark., 2009). Bu kombinasyon, amoksisilin'in etki gösterdiği tüm enfeksiyonlara, penisilinaz üreten veya üretmeyen mikroorganizmalara karşı kullanılır (Aktuğlu, 1989).

Amoksisilin ve klavulanik asidin birlikte kullanılması farmakokinetikleri üzerine önemli bir değişime sebep olmaz. Aynı zaman içerisinde serum doruk noktasına ulaşırlar (Aktuğlu, 1989). Yağda çözünürlük ve dağılım hacmi olarak klavulanik asit, amoksisiline göre daha zayıf olsa da; birlikte doku ve vücut sıvılarında yeterli derişime erişirler (Dökmeci, 2000).

Amoksisilin klavulanik asit (AMC), *H. İnfluenzae*, *E. Coli* ve *gonokoklar* gibi β -laktamaz üreten stafilokok türleri üzerinde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak etkilidir (Brunton ve ark., 2009). Diyabetik ayak yaralarında, insan ve hayvan ısırıklarında, çocuklarda akut otitis mediada, sinüzit ve diğer üst solunum yolu enfeksiyonlarında, akciğer enfeksiyonlarında, dental enfeksiyonlarda, obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlarda ve gonorede kullanılır (Brunton ve ark., 2009; Kayaalp, 2009, Dökmeci, 2000). Ülkemizde tablet, flakon, süspansiyon şeklinde satılmaktadır (Kayaalp, 2009).

Amoksisilin klavulanik asit plasentayı geçip fütal dolaşıma ve amniyotik sıvıya girer. Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) hem amoksisilini hem de amoksisilin klavulanik asiti 'B' sınıfı (hayvanlarda yapılan çalışmalarda hayvan gebelikleri üzerinde olumsuz bir etki belirtilmemiştir, ancak insan gebelikleri üzerine yapılan çalışmalar mevcut değildir veya hayvan gebelikleri üzerine olumsuz etkiler saptanmış, ancak insan

gebelik çalışmalarında bu olumsuzluklar görülmemiştir.) olarak sınıflandırmıştır (Nahum ve ark., 2006).

Veteriner hekimlikte amoksisilin klavulanik asit kombinasyonu 1980 yılından beri besi hayvanlarında ve evcil hayvanlarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Kullanımdaki formları; enjektabl, meme içi, subkutan (s.c.) oral tablet, hap ve oral damla şeklindedir. İnsan preparatlarında amoksisilin/klavulanik asit oranı 2:1 iken, veteriner preparatlarında bu oran 4:1'dir. Tek midelilerde peroral (*per os*) yolla, hayvansal gıda üretiminde i.m. yolla verilen bu kombinasyon, özellikle sığırlarda *Actinobacillus*, *Haemophilus* ve *Pasteurella* gibi β -laktamaz üreten organizmaların sebep olduğu alt solunum yolu enfeksiyonlarında yararlı olarak kabul görmektedir (Pozzi ve Ben-David, 2002).

Veteriner hekimlikte birkaç yıldır düzenli bir şekilde kullanılmasına rağmen, ne besi hayvanlarında ne de evcil hayvanlarda belirgin bir antibiyotik direnci oluşumu bildirilmemiştir. Kedi ve köpeklerde stafilokokal hastalıklar (*S. aureus*; *S. intermedius*) ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki incelenmiş, amoksisilin klavulanik aside direnç göstermekte başarısız olduklarını *S. intermedius*'un kolayca direnç geliştirmedeği belirtmiştir (Lloyd, 1996). Birleşik Krallık'ta 1995-2000 yılları arasında köpeklerde yapılan bir çalışmada 13 farklı kaynaktan izole edilen *B. bronchiseptica*'nın hepsinin amoksisilin klavulanik aside karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir (Speakman ve ark., 2000). Fransa'da 1986-1996 yılları arasında köpekler üzerine yapılan bir çalışmada 318 piyoderm vakasında (*S. aureus* 131; *S. intermedius* 187) antimikrobiyal duyarlılıklar test edilmiş ve %95'ten fazlasının amoksisilin klavulanik aside duyarlı olduğu bildirilmiştir (Pellerin ve ark., 1998).

Gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda, amoksisilin klavulanik asit formülasyonu akut enfeksiyonların, kısa süreli (birkaç gün) tedavisi için kullanılmaktadır. Bu hayvanlarda uzun süreli ve tekrarlanan bir tedavi olmadığı için direnci belirlemek olanaksızdır (Pozzi ve Ben-David, 2002).

Amoksisilin klavulanik asit atlarda ishalleri hastalıkların oluşumuna neden olduğu için kullanımı önerilmemektedir (Pozzi ve Ben-David, 2002).

Hayvanlarda amoksisilin klavulanik asit kullanımının insan patojenlerinin duyarlılığı üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı görülmektedir. İnsanlarda oluşan

direnç, insanların ilacı bilinçsiz kullanmalarından ileri gelmektedir (Pozzi ve Ben-David, 2002).

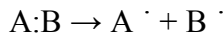
2.4. Serbest Radikaller

2.4.1. Serbest Radikallerin Tanımı ve Genel Özellikleri

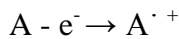
Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron bulunduran yapılardır. En dış orbitallerinde tek elektron bulunan, bir diğer deyişle eksik elektronlu olan bu moleküller oldukça reaktiflerdir. Ortamda bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek, elektron alışverişinde bulunurlar. Bu şekilde serbest radikaller fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar sırasında moleküllerin yapısını bozmaktadırlar (Durmuş ve Ünsaldı, 2005). Kimyasal reaktivitesi yüksek, yarı ömürleri kısa ve kararsız yapıdaki serbest radikaller, lipit, protein, nükleotid ve DNA gibi birçok biyolojik molekülü okside ederek hasara neden olmaktadır. Bu hasarların yaşlanma, kalp-damar hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, immün sistemde zayıflama, kanser, katarakt gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Çakatay ve Kayalı, 2006).

Serbest radikaller 3 farklı şekilde meydana gelmektedir (Özcan ve ark., 2015):

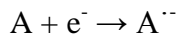
1. Kovalent bağlı normal bir moleküldeki bağların homolitik olarak parçalanması sonucu elektronlardan her birinin farklı atomlar üzerinde kalmasıyla oluşur.



2. Radikal özelliği bulunmayan moleküldeki bağların heterolitik olarak parçalanması veya tek bir elektronun kaybıyla oluşur.



3. Radikal özelliği bulunmayan moleküle bir elektronun eklenmesiyle oluşur.



Serbest radikaller hücrenin normal metabolizma süreçlerinde oluşabildiği gibi (endojen kaynaklı), dış faktörlerin etkisiyle de (ekzojen kaynaklı) meydana gelebilir (Çakatay ve Kayalı, 2006). Biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikaller

organik veya inorganik yapıda; elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler (Akkuş, 1995). Serbest radikallerin gösteriminde, sağ üst köşelerine en dış orbitallerindeki eşleşmemiş elektron sayısı kadar nokta konulur (R^{\cdot}) (Gönenç, 1997; Simic ve Taylor, 1986).

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları (Çavdar ve ark., 1997; Mercan, 2004; Kabel, 2014'ten)

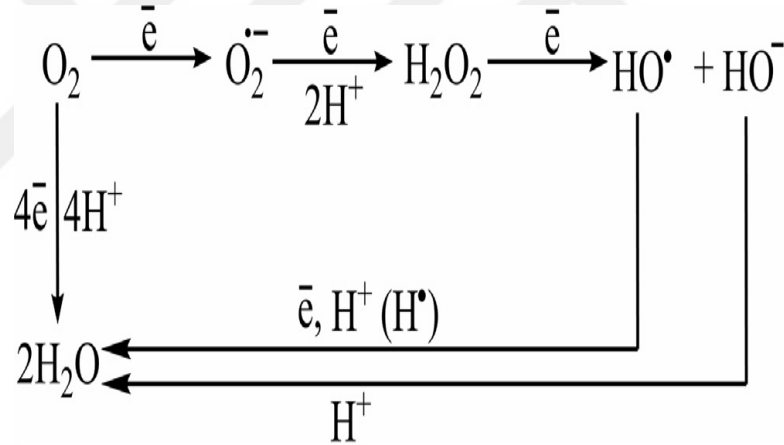
ENDOJEN KAYNAKLAR	EKZOJEN KAYNAKLAR
Elektron transport zinciri	Hava ve su kirliliği
İmmün hücre aktivasyonu	UV, sıcak şoku ve stres gibi nedenler
Oksidan enzimler (siklooksigenaz, ksantin oksidaz, monoamin oksidaz, indolamin dioksigenaz)	Bazı ilaçlar (Doksorubisin, Bleomisin, Siklosporin, Takrolimus)
Mental stres	Radyasyon, UV, x ışınları
Aşırı egzersiz	Sigara dumanı
İskemi/ reperfüzyon Hasarı	Alkol
Enfeksiyon	Ağır metaller (Demir, Civa, Bakır, Krom, Nikel)
Yaşlanma	Kimyasallar (CCl_4 , CO, NO, NO_2 , SO_2)
Kanser	Pestisidler
Enflamasyon	Alışkanlık yapan ksenobiyotik maddeler

2.4.2. Biyolojik Sistemlerde Oluşan Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

Hücredeki çoğu oksijen molekülü, hücresel enzimlerin aktiviteleri sonucu suya dönüştürülür. Bununla birlikte; bu enzimlerin bazıları oksijen molekülüne elektron sızdırıp serbest radikal oluşumuna yol açarlar. Serbest radikaller oksijen içeren normal biyokimyasal reaksiyonlar sırasında oluşurlar (Shinde ve ark., 2012).

Genellikle “Serbest Radikal” ile “Reaktif Oksijen Türleri (ROS)” terimleri birbirlerinin yerine kullanılmaktadır. Bu kullanım çoğu zaman doğru olmakla birlikte bazı durumlarda yanlıştır. Bu durumu açıklığa kavuşturmak için en kolay yol, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu değişimini ve eliminasyonunu incelemek olacaktır. Aerobik şartlar altında yaşayan organizmalarda tüketilen oksijenin % 90'dan fazlası dört elektron mekanizması yoluyla, elektron taşıma zincirindeki (ETZ) sitokrom oksidaz tarafından ROS salınımı olmaksızın doğrudan suya indirgenir. Ökaryotlarda, bu işlem iç mitokondriyal membranda bulunan ETZ tarafından gerçekleştirilir. Prokaryotlarda ise ETZ elemanları plazma membranında bulunmaktadır. ETZ'nin bu işleyişi ATP formunda enerji elde etmek için oksidatif fosforilasyonla eşleşmektedir.

Tüketilen oksijenin %10'dan daha az bir kısmı da birbirini izleyen tek elektron yolağını izler. Bu yolla moleküler oksijen (O_2), 1 elektron alarak süperoksit anyon radikaline ($O_2^{\cdot-}$), süperoksit anyon radikali de 2 proton (H^+) kabulüne eşlik eden bir elektron indirgemesiyle hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşür. Hidrojen peroksit serbest bir radikal değildir fakat ROS grubuna dâhil olan bu madde, kimyasal olarak moleküler oksijenden daha aktiftir. H_2O_2 molekülü de 1 elektron alarak hidroksil radikaline (HO^{\cdot}) ve hidroksil anyonuna (HO^-) ayrılır. Son olarak HO^{\cdot} bir elektron ve bir proton (H^+) ile etkileşerek su molekülünü (H_2O) oluşturur. Biyolojik sistemlerde bu reaksiyon esas olarak protein ve lipid gibi farklı bileşiklerden hidrojen atomunun çıkarılması vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Özetlemek gerekirse; $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve HO^{\cdot} hep birlikte reaktif oksijen türleri olarak adlandırılırlar. Fakat bunlardan $O_2^{\cdot-}$ ve HO^{\cdot} serbest radikal iken, H_2O_2 serbest radikal değildir (Lushchak, 2014).



Şekil 4. Moleküler oksijenden reaktif oksijen türlerinin ve suyun oluşumu (Lushchak, 2014'ten)

Biyolojik sistemlerdeki bu oksidanlar yapılarına göre 2 ana kategoride incelenebilir. Bunlar; reaktif oksijen türleri (ROS) ve Reaktif Nitrojen türleridir (RNS). Reaktif oksijen türleri; Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), peroksil (RO_2^{\cdot}), hidroperoksil (HRO_2^{\cdot}) gibi serbest radikal türlerini içerirken; hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit ($HOCl$) gibi radikal olmayan türleri de içerir. Yapısında azot bulunan reaktif nitrojen türlerinden nitrik oksit (NO^{\cdot}), nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot}) serbest radikal iken, peroksinitrit ($ONOO^-$), nitroz oksit (HNO_2) alkil peroksinitratlar ($RONOO$) radikal olmayan RNS'lerdir (Johansen ve ark., 2005).

Tablo 2. Biyolojik sistemlerdeki oksidanların sınıflandırılması (Johansen ve ark., 2005'ten)

	Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)
Serbest Radikal Olan Türler	Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) Hidroksil radikali (OH^{\cdot}) Peroksil (RO_2^{\cdot}) Hidroperoksil (HRO_2^{\cdot})	Nitrik oksit (NO^{\cdot}) Nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot})
Serbest Radikal Olmayan Türler	Hidrojen peroksit (H_2O_2) Hipokloröz asit ($HOCl$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) Nitröz oksit (HNO_2) Alkil peroksinitratlar ($RONOO$)

Serbest radikaller aracılı reaksiyonların çeşitli saptanabilir ürünleri, reaktif oksijen türlerinin oluşumunda potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılmaktadırlar (Kehrer ve Klotz, 2015).

Tablo 3. Serbest Radikal Reaksiyonlarının Biyobelirteçleri (Kehrer ve Klotz, 2015'ten)

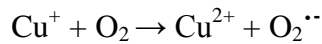
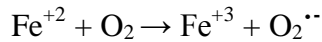
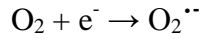
Lipitler	Lipid peroksitleri veya ürünleri (lipit hidroksi asitler ya da hidroperoksitler)
	İzoprostanlar
	MDA (genellikle tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler)
	Konjüğe dienler
	Etan / pentan oluşumu
	Yağ asiti analizi: lipit hidroperoksitlerin ve /veya lipit alkollerin oluşumu, Çoklu doymamış yağ asitlerinin kaybı
Proteinler	Protein oksidasyonu
	Sülfür oksidasyonu (sistein disülfidler, S-tiyolasyonu Metiyonin sülfoksit, Karışık disülfidler)
	Protein karboniller (yan zincir aldehitleri, ketonlar)
	Tirozin çapraz bağlantılar, klorlama, nitrozlama, hidroksilasyon
	Triptofanil modifikasyonlar
	Alifatik amino asitlerin Hidro(Pero)ksi türevleri
	Kloraminler, deaminasyon
	Amino asit arası dönüşümler (örneğin; Histidinin asparagine, prolinin hidroksiproline)
	Çapraz bağlanmalar, agregasyon, peptid bağı yıkımı
DNA	Okside pürinler (8-hidroksi deoksiguanozin) ve pirimidinler

Tablo 3. (Devamı) Serbest Radikal Reaksiyonlarının Biyobelirteçleri (Kehrer ve Klotz, 2015'ten)

Eklenme ürünleri	Lipit peroksidasyon ürünleri (örneğin malondialdehit, akrolein)
	Amino asit oksidasyon ürünleri (örneğin p-hidroksifenilasetaldehit);
	Glikoksidasyon (örneğin; karboksimetillizin)
	Lipitlere kovalent bağlanma
Enzim Aktiviteleri	Antioksidan enzimlerin indüksiyonu
	Oksidan duyarlı enzimlerin aktivite kaybı veya aktivitesinin artması
Antioksidan içeriği	Glutasyon kaybı
	Glutasyon disülfid oluşumu
	Vitamin E
	Vitamin C
	β-karoten
Çeşitli	Miyogloblin oksidasyonu

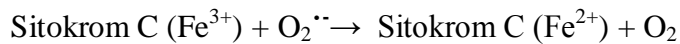
2.4.3. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Moleküler oksijenin indirgenmesi sırasında oluşan ilk radikaldır. Tüm aerobik hücrelerde, moleküler oksijene (O_2) bir elektronun eklenmesiyle oluşabileceği gibi; indirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu da oluşmaktadır (Özcan ve ark., 2015).

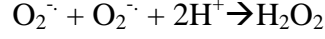


Mitokondriyal solunumun bir yan ürün olarak üretilen süperoksit anyonu, fagositlerde patojenleri öldürmek için, NADPH oksidaz enzimi vasıtasıyla da büyük miktarlarda oluşturulur. Böylece immün sistem ürettiği süperoksit ile mikroorganizmalara karşı kendini korur. Ksantin oksidaz enzimi de süperoksit üreten bir enzimdir (Valko ve ark., 2016).

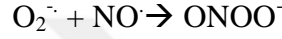
Süperoksit hem indirgeyici hem yükseltgeyici olarak davranmaktadır. Yapısındaki bir elektronu, bir radikale, sitokrom c'ye veya bir metal iyonuna verirse tekrar oksijene okside olur (Akkuş, 1995; Kılınç ve Kılınç 2002).



Asidik koşullarda süperoksit anyonu H_2O_2 'e kendiliğinden dönüşebileceğİ gibi, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığİyla da H_2O_2 oluşabilir (Kılınç ve Kılınç 2002).



Süperoksit, bir diğİer serbest radikal olan nitrik oksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna neden olur (Akkuş, 1995).



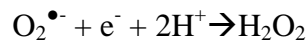
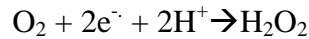
Hücre zarında fosfolipidlerin oluşturduğİ asidik ortamda çözünürlüğü daha fazla ve daha uzun ömürlü olan süperoksit anyonu, burada bir proton alarak hidroperoksit radikalini (HO_2^{\cdot}) oluşturur (Kılınç ve Kılınç 2002).

Metabolizmada süperoksit oluşturan kaynaklar; mitokondriyal solunum zinciri, katekolamin, miyogloblin gibi birçok biyomolekülün otooksidasyonu, NADPH oksidazlar ve ksantin oksidazdır (Virag ve ark., 2003).

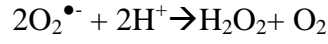
Süperoksit metal iyonlarıyla reaksiyona girerek bağılı oldukları proteinlerden ayrılmasına neden olur. İndirgenmiş nükleotidleri, amino asitleri ve bazı antioksidan bileşikleri (askorbik asit, tokoferol, glutatyon) okside eder (Kılınç ve Kılınç 2002).

2.4.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

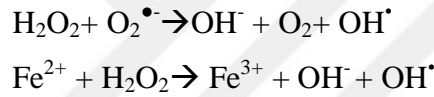
Moleküler oksijenin (O_2) etrafındaki başka moleküllerden 2 elektron almasıyla veya süperoksit anyonunun ($O_2^{\cdot-}$) 1 elektron alması sonucunda peroksit meydana gelir. Peroksit molekülünün de 2 hidrojen (H^+) atomu ile birleşmesiyle hidrojen peroksit oluşur.



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit için esas üretim kaynağı süperoksidin enzimatik veya non-enzimatik spontan gerçekleşen dismutasyonudur. 2 molekül süperoksit anyonunun 2 proton alması sonucu hidrojen peroksit oluşur (Akkuş, 1995).



Hidrojen peroksit bir oksidan olmasına rağmen, yapısında çiftleşmemiş elektron barındırmadığı için serbest radikal değildir. pKa'sı 10,6 olan hidrojen peroksitin asidik ve nötral şartlardaki net yükü sıfır olduğu için biyolojik zarları kolaylıkla geçerek bulunduğu yerden daha uzağa diffüze olur. Hidrojen peroksidin bir oksidan olarak kabul edilmesinin nedeni; süperoksit anyonu veya ortamdaki geçiş metalleri ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zararlı radikal olan hidroksil (OH[•])'in oluşumuna neden olmasıdır (Kılınç ve Kılınç, 2002).



Hidrojen peroksit proteinlerin hem grubunda bulunan demir ile reaksiyona girerek ferril demir (Fe^{IV}) ve perferril demir (Fe^V) oluşumuna yol açar. Yüksek oksidasyon düzeyindeki bu yapılar son derece reaktif olup, biyolojik membranlarda lipit peroksidasyonunun başlamasına neden olabilmektedirler (Kılınç ve Kılınç, 2002).

2.4.5. Hidroksil Radikali (OH[•])

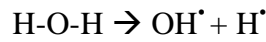
Hidroksil radikali küçük, yüksek hareket yeteneğine sahip, suda çözünen (Ayala ve ark., 2014), reaktif oksijen türleri içinde en reaktif olan ve çok kısa bir yarılanma süresine sahip olan radikaldir. Geçiş metallerinin varlığında, Fenton reaksiyonu ile H₂O₂'den oluşmaktadır (Özcan ve ark., 2015).



Süperoksit radikalinin hidrojen peroksiti Haber-Weiss Reaksiyonu adı verilen bir tepkimeyle indirgemesi sonucu da hidroksil radikali meydana gelir (Valko ve ark., 2016).



Suyun radyasyonla iyonize olması sonucunda da hidroksil radikali meydana gelir (Akkuş, 1995).



Hidroksil radikali, ayrıca alkil hidroperoksitlerin fotolitik ayrışmasıyla da üretilmektedir (Zorov ve ark., 2014).

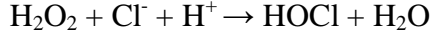
Son derece kararsız olan hidroksil radikali, oluştuğu yerden birkaç nanometre uzaklıktaki biyomoleküllere spesifik olmayan bir şekilde saldırarak oksidatif hasara neden olur. DNA, membran lipitleri ve proteinler gibi hücrel bileşenlere zarar verir. Kalp damar hastalıkları, nörodejenerasyon ve kanser gibi hastalıkların hücrel bozukluklarında ilgisi bulunmaktadır (Ayala ve ark., 2014). Karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler, tiyil radikalleri gibi yeni radikallerin oluşumuna neden olarak hasara yol açmaktadır (Sezer ve Keskin, 2014).

2.4.6. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Oksijenin enerjetik olarak uyarılmasıyla, elektronlarından birinin kendi spininin ters yönünde olan başka bir yörüngeye yer değiştirmesi, nitrik oksit ve süperoksit anyonunun tepkimeye girmesi veya hipoklorit ile hidrojen peroksitin reaksiyonu sonucu oluşur (Çaylak, 2011). Hücredeki ömrü 3 μs kadardır (Hackbarth ve ark., 2010). Suda 4 μs , nonpolar ortamda 100 μs boyunca varlığını sürdürmektedir. Oluştugu yerden yüzlerce nanometre uzağa diffüze olabilmektedir. Direkt olarak proteinleri, doymamış yağ asitlerini ve DNA'yı okside edebilmektedir. Deoksiguanozin ile seçici reaksiyon vererek nükleik asit modifikasyonlarına neden olmaktadır. β -karoten, α -tokoferol gibi antioksidan maddelerle etkisi sönümlendirilir (Abouzari ve Fakheri, 2015).

2.4.7. Hipokloröz Asit (HOCl)

Klorür iyonu varlığında, miyeloperoksidaz (MPO) ve diğer peroksidazlar aracılığıyla hidrojen peroksidin dönüştürülmesiyle oluşur (Voziyan ve Yazlovitskaya, 2014).



Enflamasyon bölgelerinde MPO tarafından üretilen HOCl, normal fizyolojide anti-bakteriyel doğal bağışıklık sisteminde önemli bir moleküldür. Nötrofil fagozomda üretilen hipokloröz asit, ya sindirilmiş bakterilerle direkt olarak ya da bakterileri öldürmede yardımcı olan fagozomal proteinlerde kloraminleri oluşturarak etkileşime girer (Voziyan ve Yazlovitskaya, 2014). HOCl'nin yüksek düzeydeki enfeksiyonlarda ön savunma cevabı oluşturarak mikroorganizmaların çoğunu öldürdüğü immun yanıtı düzenlediği öne sürülmüştür (Winterbourn ve Kettle, 2013). Diyabette MPO'nun aktivasyonu ve HOCl'nin aşırı üretimi rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2004). Kronik böbrek rahatsızlığı olan hastaların renal dokularında HOCl bağımlı protein oksidasyonu olduğu bildirilmiştir (Malle ve ark, 2003; Liu ve ark., 2011). Ayrıca, MPO türevli hipokloröz asidin aterosklerotik lezyonlarda HDL'ye hasar verdiği ve endotelial nitrik oksit sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Xu ve ark., 2006; Nicholls ve ark., 2005).

2.4.8. Peroksil Radikali (ROO•)

Canlı sistemlerde oluşan, oksijenden türevlenen bir reaktif radikal türüdür. En basit peroksil radikali, süperoksitin protonlanmış formu olan, hem hidroperoksil radikali hem deperhidroksil radikali olarak adlandırılan HOO•'dur (Valko ve ark, 2007). Hidroperoksil radikalının yağ asidi hidroperoksit (LOOH)-bağımsız ve LOOH-bağımlı olmak üzere 2 paralel yolla lipid peroksidasyonunu başlattığı bildirilmiştir (Aikens ve Dix, 1991). Hidroperoksil radikali süperoksit anyonuna göre çok daha güçlü bir oksidan olup, çoklu doymamış fosfolipitlerde zincir oksidasyonunu başlatabilir. Böylece membran fonksiyonlarında bozukluklara neden olur (Ayala ve ark., 2014).

2.4.9. Nitrik Oksit (NO•)

Nitrik oksit (NO•) damar ve sinir sisteminde bulunan, diffüze olabilir moleküler habercidir. L-arginin amino asidinin guanidino grubundan, nitrik oksit sentetazlar (NOS) olarak adlandırılan bir enzim ailesi aracılığıyla, enzimatik oksidasyonla oluşmaktadır (Virag ve ark., 2003). Bu enzimin endotelial (eNOS), nöronal (nNOS), ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç ayrı formu bulunmaktadır. eNOS ve nNOS enzimlerinin ürettiği düşük konsantrasyondaki NO, düz kaslarda ve sinir sisteminde hücre içi ve hücreler arası bir haberci olarak işlev görmektedir. Sitoplazmik gualinat siklazı uyarıcı NO, hücredeki cGMP konsantrasyonunu artırır. eNOS ve nNOS izoformlarının aktivite göstermesi için kalsiyum gereklidir. Başlıca fagositik lokositlerde bulunan iNOS formunun sentezini sitokinler ve bakteriyel toksinler uyarır. Bu formun aktivitesi kalsiyumdan bağımsız olup, ortamda arjinin olduğu müddetçe NO sentezini gerçekleştirir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

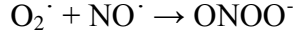
Enzimatik sentez, NO• miktarının büyük bir kısmını oluşturursa da; deride, terde bulunan nitritin non-enzimatik redüksiyonu da NO• üretimi sağlar (Weller ve ark., 1996).

NO mikromolar konsantrasyonlarda geri dönüşümlü olarak, katalaz ve sitokrom p-450'yi inhibe edebilir. Ayrıca tirozin artığı içeren ve DNA sentezinden sorumlu bir enzim olan ribonükleotit redüktazı da inhibe edebilir. Ribonükleotit redüktazın inhibisyonu geri dönüşümlüdür ve NO konsantrasyonu, birkaç mikromolardan daha az olduğu zaman inhibisyon ortadan kalkar. Mikromolar düzeyin altında NO, sitokrom-c oksidaz enzimini de geri dönüşümlü olarak inhibe edebilir. Bu enzim elektron transport zincirinden superoksit sızıntısını kısa süreliğine arttırabilmektedir. Oluşan süperoksit daha sonra NO ile etkileşime girerek peroksinitrit oluştururlar (Pacher ve ark., 2007).

Nitrik oksit kan akışını, trombozu ve nöral aktiviteyi düzenleyen, tüm omurgalılarda bulunan bir intraselüler habercidir. Nitrik oksitin biyolojik üretimi nonspesifik konak savunması için önemli olsa da; kendi başına hücre içi patojenleri ve tümörleri doğrudan yok etmesi mümkün değildir. Her ne kadar NO, yüksek oranda toksik ve reaktif olarak tanımlansa da; NO gazının düşük konsantrasyonlarda solunması, yeni doğanlarda persistent pulmoner hipertansiyon tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Pacher ve ark., 2007).

2.4.10. Peroksinitrit (ONOO⁻)

Nitrik oksitin, süperoksit anyonu veya hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesi ile oluşur (Berlett ve Stadtman, 1997). *In vitro* sistemlerde, süperoksit ve NO[•] oranı peroksinitritin reaktivitesini belirler. Aşırı miktardaki NO[•], peroksinitrit tarafından gerçekleştirilen oksidasyonu azaltır (Rubbo ve ark., 1994; Miles ve ark., 1996).



Peroksinitrit, özellikle aromatik moleküller ve serbest amino asit veya peptit artıkları içeren organosülfür üzerine etkili bir oksidandır. Hücrenin önemli antioksidan kaynaklarından sistein ve glutasyonu disüflitlere dönüştürür. Metiyonini ya sülfokside dönüştürür ya da etilen ve dimetilsülfide parçalar. Dimetil sülfoksidi formaldehite okside eder. Süperoksit dismutazı, glutaredoksini ve diğer antioksidan molekülleri ve sistemleri inhibe edebilir. Önemli hücresel antioksidanlardan biri olan glutasyonun, peroksinitrit aracılı olarak tükenmesi, oksidatif hasarın şiddetlenmesine yol açar (Szabo, 2003).

Lipit peroksidasyonunu başlatır, DNA kırıklarına neden olur, tiyollerle etkileşime girer. Peroksinitrit kaynaklı protein modifikasyonlarına, protein oksidasyonuna (metiyonin, sistein, triptofan, tirozin artıkları üzerinden) ve nitrasyonuna (tirozin, triptofan artıkları) neden olur. Aktif merkezinde geçiş metali içeren enzimler oksidanın ana hedefidir, metaloenzimleri inaktif hale getirir. Peroksinitrit reaksiyonları lokal pH ve mikroortamdan etkilenir. Hidrofobik membran kompartmanları nitrasyon lehine bir ortam oluştururken, sulu ortamlar oksidasyon için uygun çevreyi oluşturmaktadır (Virag ve ark., 2003).

2.5. Serbest Radikallerin Etkileri ve Oluşturduğu Hasarlar

ROS ve RNS konsantrasyonlarının özellikle ekstraselüler olarak aşırı şekilde yükselmesi normal hücre fonksiyonunda değişikliklere neden olur (Guo ve Ward, 2007).

Serbest radikaller lipid, protein, DNA ve nükleotid gibi birçok biyolojik molekülü okside ederek hasara neden olmaktadır. Bu hasarların yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, immün sistemde zayıflama,

otoimmün bozukluklar, kanser, katarakt, artrit gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Çakatay ve Kayalı, 2006; Shinde ve ark., 2012).

Serbest radikaller membran yapısında bulunan fosfolipitlerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu hücrelere zarar verirler. Hücre organellerinden mitokondriyi ve lizozomu çevreleyen zarların geçirgenliğini artırarak parçalanmasına sebep olurlar. Ekstrasellüler matriks bileşenlerinden hyaluronik asit ve kollajenin yapısını bozarak hasara neden olurlar (Durmuş ve Ünsaldı, 2005; Akkuş, 1995; Bulkley, 1983; Freeman ve Crapo, 1982; Halliwell ve Gutteridge, 1996; Kehrer, 1993). Proteinlerde enzim aktivitesinin kaybına yol açan yapısal değişimlere neden olurlar (Halliwell, 2007). Hücrede mutasyonlara yol açan DNA zincir kırılmalarına neden olabilirler. Organizma DNA onarım enzimleri veya antioksidanlar vasıtasıyla bu saldırıları ortadan kaldırmaya çalışır (Pacher ve ark., 2007). Serbest radikallerin neden olduğu mutajenisite ve sitotoksisite karsinogenezde anahtar rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türlerinin mutasyonları tetiklediği, DNA tamir işlemini inhibe ettiği ve böylece bazı tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açarak kansere neden olduğu düşünülmektedir (Diplock ve ark., 1994).

Reaktif oksijen türleri; LDL, kolesterol, kolesterol türevi maddelerin oksidasyonunu stimüle eder. Köpük hücrelerinin, aterosklerotik plakların ve vasküler trombozun oluşmasına neden olan protein modifikasyonlarını uyarır. Böylece kardiyovasküler hastalıkların oluşumunu tetikler (Kumar ve ark., 2010).

Oksidatif stresin; pnömöni, akut respiratuar distres sendromu (ARDs), kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), idiyopatik pulmoner fibroz, kistik fibroz, bronşektazi, iskemi-reperfüzyon ve akciğer kanseri gibi hastalıklarda olduğu belirtilmiştir (Guo ve Ward, 2007).

Bilimsel çalışmalar, serbest radikallerinin birikimine bağlı olarak pankreas adacık hücrelerinin yıkımının, insülin bağımlı diabetes mellitus (DM)'un patogenezi nedenlerinden biri olduğunu belirtmektedir. Hiperglisemiye bağlı olarak mitokondriyal ROS'un aşırı üretimi, NF-κB, p38 MAPK ve Jak/STAT, polioller (sorbitol) ve heksozamin yolları, Protein Kinaz C (PKC) ve İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri (AGEs) gibi strese duyarlı yolları aktive ederek bir kısır döngü başlatır. İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri, sorbitol ve proinflamatuvar sitokinler ROS ve RNS üretimi için pozitif bir geri bildirim uygular ve gen ifadesinin yanı sıra; vasküler işlevi ve yapıyı değiştirerek, PKC

aracılı vasküler disfonksiyonu şiddetlendirir (Johansen ve ark., 2005; Shinde ve ark., 2012).

Sperm motilitesini ve canlılığını azalttığı bilinen serbest radikaller erkek kısırlığına katkı sağlamaktadır. Memeli spermatozoa plazma membranının lipid kompozisyonu, memeli somatik hücrelerinden belirgin bir şekilde farklıdır. Spermatozoa membranında yüksek miktarda fosfolipitler, steroller, doymuş ve çoklu doymamış yağ asitleri bulunmaktadır. Bu yüzden sperm hücreleri aşırı ROS düzeylerinin sebep olduğu hasara özellikle duyarlıdır. Lipid peroksidasyonu defektif sperm fonksiyonu etiolojisinde önemli bir rol oynar (Yadav ve ark., 2006).

Tükürükteki serbest radikaller ve antioksidan düzeyleri arasındaki dengesizliğin periodontal hastalıkların başlamasında önemli rol oynadığı, bu nedenle tükürükteki oksidatif stresin ölçülmesiyle intraoral ortamın durumu hakkında daha doğru veriler elde edilebileceği belirtilmiştir (Cully ve ark., 2002).

2.5.1. Serbest Radikallerin Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

Serbest radikaller oksidasyona karşı son derece duyarlı olan fosfolipid-doymamış yağ asiti artıkları ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu ve peroksidasyon ürünleri oluşur. Peroksidasyon sonucu malondialdehit ve 4-hidroksi-2-nonenal oluşur. MDA sıçanlarda kanserojen, bakteri ve memeli hücrelerinde mutajenik etki gösterir. 4-hidroksi-2-nonenal daha zayıf mutajenik etkiye sahiptir fakat lipit peroksidasyonunun ana toksik son ürünüdür (Valko ve ark., 2007).

Lipit peroksidasyonu sonucu membran akışkanlığında azalma, normalde spesifik kanallar dışında membranı geçemeyen maddelerin, membrandan sızmasında bir artış meydana gelir. Ayrıca membran proteinlerinin hasar görmesi sonucu reseptörler, enzimler, ve iyon kanallarının inaktivasyonu gerçekleşir (Vašková ve ark., 2012).

2.5.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşime girmesi, proteinlerde doğrudan veya dolaylı olarak modifikasyonlara neden olur. Doğrudan modifikasyonlar; protein aktivitesinin nitrozilasyonla, karbonilasyonla, disülfid bağı oluşumuyla ve glutatyonilasyonla düzenlemesini içerir. Proteinlerin, yağ asidi peroksidasyon yıkım ürünleri ile konjuge olması dolaylı yoldan modifikasyonlara yol açar (Abouzari ve Fakheri; 2015).

Kükürt ve tiyol grupları içeren aminoasitler ROS saldırılarına karşı daha duyarlıdır. Aktive olmuş oksijen, amino asidin sistein artığından bir hidrojen çıkararak tiyil radikali oluşumuna neden olur. Tiyil radikali ikinci bir tiyil radikali ile çapraz bağ yaparak disülfit köprüsü oluşturur. Kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), civa (Hg) gibi çeşitli metaller, proteine bağlı tiyol gruplarının tükenmesine neden olmaktadır (Stohs ve Bagchi, 1995). Metiyonine eklenen oksijen, metiyonin sülfoksit türevleri oluşumuna yol açmaktadır. ROS varlığında tirozin çapraz bağlanarak, bi-tirozin ürünleri meydana gelmektedir (Davies, 1987). Arjinin, histidin, lizin, prolin, treonin ve triptofan amino asitleri oksidasyon sonucu serbest karbonil grublarını verir. Bu durum proteolitik bir saldırıya karşı duyarlılıklarını artırır (Moller ve ark., 2007). Demir-sülfür merkezlerinin süperoksit anyonu ile okside olması, enzimlerde geri dönüşümsüz inaktivasyonlara neden olur (Gardner ve Fridovich, 1991).

2.5.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, DNA yapısındaki bazlara eklenme veya şeker kısmından hidrojen çıkarma suretiyle reaksiyona girmektedirler. Pirimidinlerde bulunan C4-C5 çift bağı, özellikle OH[•] radikalinin saldırılarına karşı duyarlıdır. Bu etkileşim sonucu timin glikol, urasil glikol, üre artıkları, 5-hidroksideoksiuridin, 5-hidroksideoksisitidin, hidantoin gibi oksidatif pirimidin hasar ürünleri oluşmaktadır. OH[•] radikalinin pürinlerle reaksiyonu sonucu 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG), 8-hidroksi deoksiadenozin, formamidopirimidinler gibi oksidatif ürünler oluşmaktadır. Karsinogenezle ilişkili olduğu bildirilen 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının güvenilir bir belirteçidir (Devasagayam ve ark., 2004).

2.5.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Hidroksil radikali gibi serbest radikaller, karbonhidratlardan bir hidrojen atomunu çıkartarak karbon merkezli radikal oluşumuna neden olurlar. Bu durum hyaluronik asit gibi önemli biyolojik moleküllerde zincir kırılmasına neden olur. Eklemleri çevreleyen sinoviyal sıvıda enflamasyon sırasında nötrofillerin aktivasyonu ve birikimi önemli miktarda oksiradikallerin üretimine neden olur. Bu durum romatoid artrit ile de ilişkilidir (Devasagayam ve ark., 2004).

2.6. Serbest Radikallerin Yararları

Genel anlamda reaktif oksijen türlerinin düşük konsantrasyonları, gen ekspresyonu, hücresel büyüme ve enfeksiyonlara karşı savunma gibi normal fizyolojik fonksiyonlar için esansiyeldir. Bazen de hücre içindeki biyokimyasal süreçler için uyarıcı ajanlar olarak işlev görürler (Dröge, 2002).

Ayrıca reaktif oksijen türleri tiroksin, prostaglandin gibi gelişimsel süreçleri uyaran biyomoleküllerin sentezine katılır. Serbest radikaller immün sistem tarafından da kullanılır. Makrofajlar ve nötrofiller fagositozla yutulabilecek bakterileri öldürebilmek için radikal üretirler (Schreck ve Baeuerle, 1991). Bu moleküller, enfeksiyona karşı kimyasal konak savunmasının bir parçası olarak nörotransmitter, ikinci haberci olarak işlev görürler (Guo ve Ward, 2007).

NO[•], hemen hemen vücuttaki her hücre ve organ fonksiyonunda görev alan, en yaygın sinyal moleküllerinden biridir. Endotelial hücreler tarafından üretilen NO[•]'nun fizyolojik seviyeleri; vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesi ve çoğalması, lökosit adhezyonu, trombosit agregasyonu, anjiyogenez, tromboz ve kas tonusunun düzenlenmesi için esansiyeldir. Ayrıca, nöronlar tarafından üretilen NO[•], nörotransmitter olarak işlev görür. Aktive olmuş makrofajların ürettiği NO[•], immün cevapta önemli bir aracı olarak görev yapar (Fang ve ark., 2002).

İmmün sistem tarafından ROS üretiminin önemi, granüloematözlü olgularda açıkça gösterilmiştir. Bu hastalarda süperoksit radikalini üretecek olan, membrana bağlı NADPH oksidaz enzim sistemi kusurlu olduğundan, süperoksit üretimi gerçekleşemez. Bu durum çok sayıda ve kalıcı enfeksiyona neden olur (Pham-Huy ve ark., 2008).

Aktive olmuş fagositik lökositler süperoksit anyonu üreterek bakterisidal etki gösterirler (Kılınç ve Kılınç, 2002). Ayrıca süperoksid anyonu apoptoziste, vasküler işlevlerin düzenlenmesinde ve enflamasyonda görev alır (Memişoğulları, 2005).

Belirli hücre kompartmanlarında üretilen hidrojen peroksit, çeşitli önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde ikincil haberci olarak görev yapmaktadır. (Valko ve ark., 2016). Süperoksit anyonunun dismutasyonu sonucu üretilen H₂O₂; nötrofillerde miyeloperoksidaz enziminin katalizlediği reaksiyonla, antibakteriyel etkinliğe sahip olan hipokloröz asiti oluşturur (Çavdar ve ark., 1997).

2.7. Lipit Peroksidasyonu

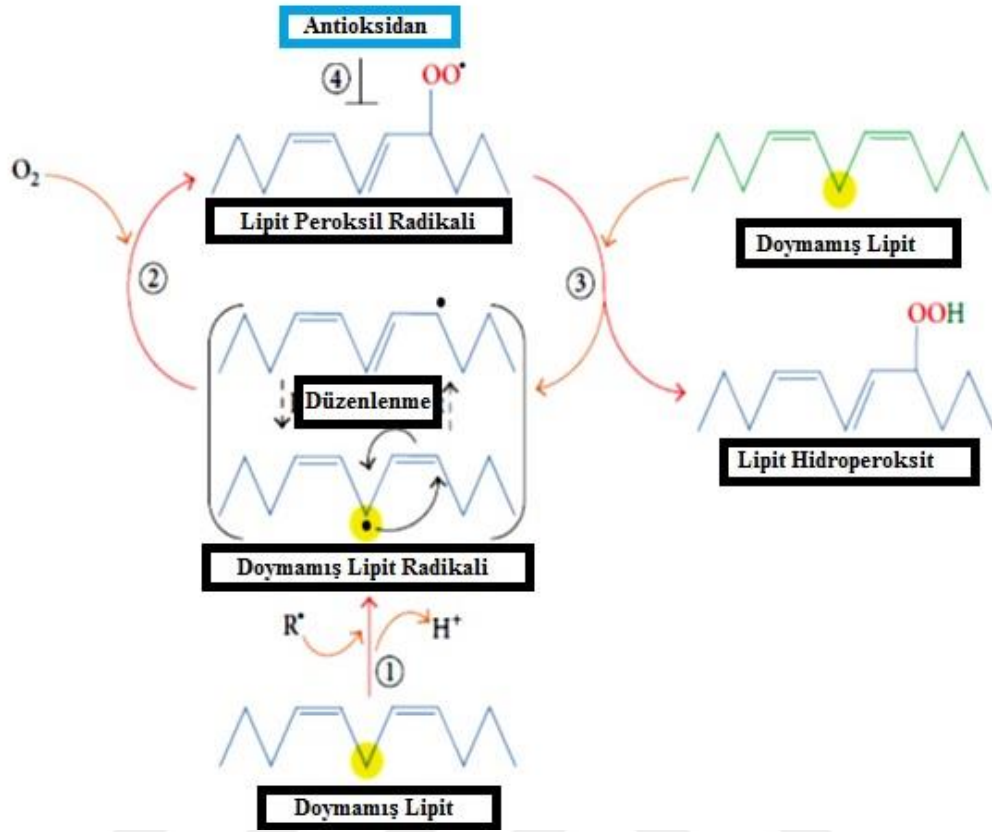
Lipitler hücrelerin bütünlüğünü sağlayan ve hücre fonksiyonlarını kontrol eden hücre membranının esansiyel bileşenleridir. Bu yapılar reaktif oksijen türleri için birincil hedef olup; oluşan lipit peroksidasyonu birçok patolojik durum ile bağlantılıdır (Bradley-Whitman ve Lovell, 2015). Lipid peroksidasyonunun, ateroskleroz, kanser, şeker hastalığı, kronik alkole maruz kalma, akut akciğer hasarı, Alzheimer ve Parkinson gibi nöro-dejeneratif bozukluklarla ilintili olduğu bildirilmiştir (Yin ve ark., 2011) .

Kontrollü enzimatik lipit metabolizmasının aksine, lipit peroksidasyonu (LPO) başlama, uzama ve sonlanma basamaklarından oluşan, kontrolsüz bir şekilde ilerleyen non-enzimatik bir süreçtir. Hidroksil, alkoksil veya peroksil radikalleriyle başlatılan, doymamış yağ asitlerinin karbon-karbon çift bağına komşu metilen grubundaki hidrojen atomunun ayrılmasıyla meydana gelen bir kimyasal reaksiyondur (Bradley-Whitman ve Lovell, 2015).

Uzama safhasında; karbon merkezli lipit radikalının oksijenasyonu daha sonra komşu doymamış yağ asidinden hidrojen ayrılmasıyla lipit peroksil radikalini üretir, kendi kendine devam eden bir zincir reaksiyonu başlatarak başlangıçtaki oksidatif durumu çoğaltır (Bradley-Whitman ve Lovell, 2015). Hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerden hidrojen atomunun ayrılmasına neden olan lipit peroksil radikali serbest kalan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlere dönüşür (Gürdöl ve Ademoğlu, 2010).

Peroksidasyon sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerin yıkımı, biyolojik olarak aktif olan aldehitlerin oluşumuna yol açar. Oluşan bu aldehitler ya hücrede metabolize edilir ya da olduğu bölgeden daha uzak kısımlara yayılarak hücrel hasarı çoğaltırlar (Akkuş, 1995).

Radikal-radikal nötralizasyonu veya vitamin E gibi zincir kırıcı antioksidanların radikallerle etkileşimi sonucu sonlanma gerçekleşir (Halliwell ve Chirico, 1993; Bradley-Whitman ve Lovell, 2015).



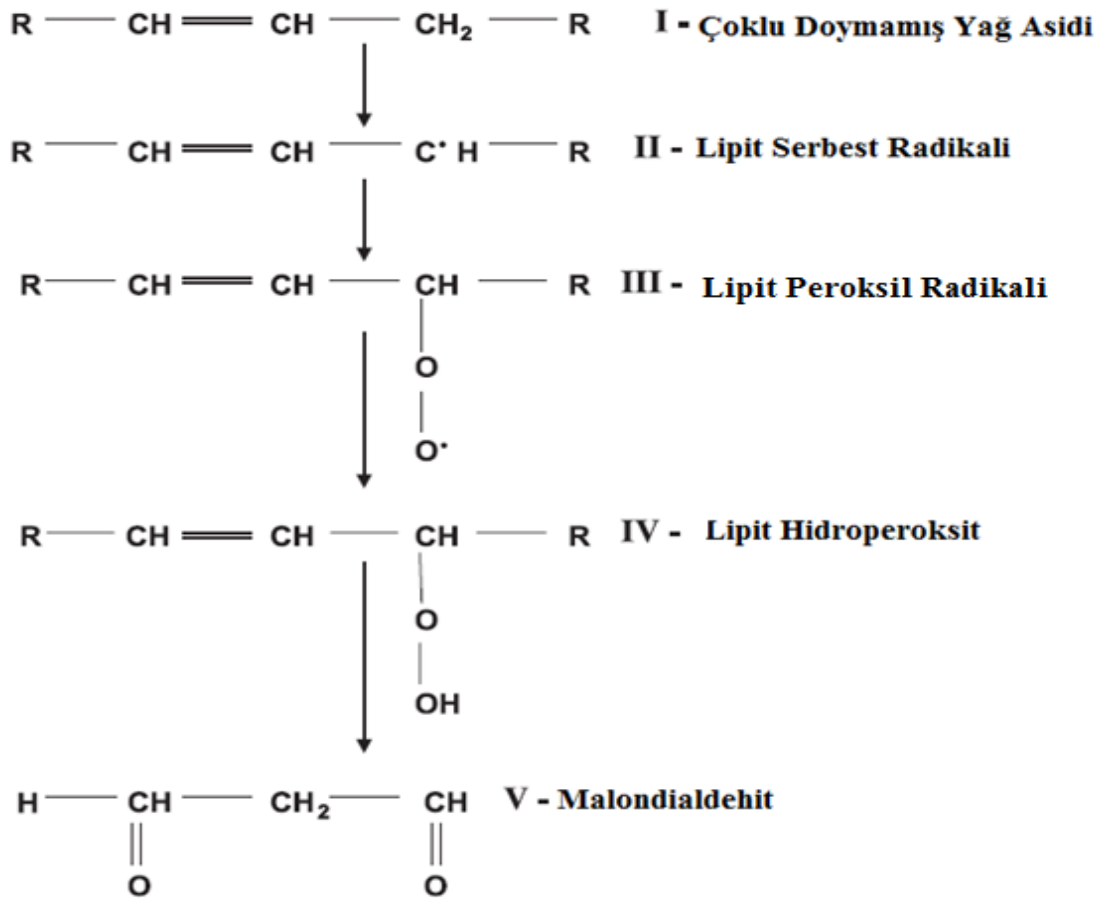
Şekil 5. Lipit Peroksidasyonu. Başlangıçta prooksidanlar karbon merkezli lipit radikali oluşturmak üzere alilik hidrojeni çıkarırlar. Karbon radikali bir konjüge dien oluşturmak için moleküler yeniden düzenleme ile stabilize olma eğilimindedir (1. Basamak). İlerleme safhasında lipit radikali hızlı bir şekilde oksijen ile etkileşerek lipit peroksil radikalini oluşturur (2. Basamak). Oluşan bu lipit peroksil radikali başka bir doymamış yağ molekülünden hidrojen çıkartarak yeni bir lipit radikalinin ve lipit hidroperoksitin oluşumuna neden olur (3. Basamak). Sonlanma basamağında antioksidanlar lipit peroksi radikal türlerine hidrojen vererek radikal olmayan ürünlerin oluşmasını sağlarlar (4. Basamak). (Ayala ve ark., 2014'ten)

2.7.1. Malondialdehit

Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelen en önemli üründür. Yüksek derecede toksik olan bu aldehit molekülü, lipit peroksidasyonunun biyobelirteçi olarak kabul edilmektedir. Fizyolojik durumda, nötral pH'da MDA bir enolat anyonu olarak bulunmakta ve düşük kimyasal reaktivite göstermektedir. Bununla birlikte, bu molekül, nükleik asit bazları ile etkileşime girerek çok çeşitli katılma ürünü oluşturabilmektedir. Malondialdehit bu

şekilde genotoksik, mutajenik ve karsinojenik özellikler göstermektedir ve birçok fizyolojik mekanizmayı bozabilmektedir (Del Rio ve ark., 2005).

Çoklu doymamış yağ asitlerinde karbon-karbon çift bağı reaktif türlerin hedefidir (I). Bu çift bağı; karbon-hidrojen bağı zayıflatarak, hidrojen atomunun serbest radikaller tarafından kolayca çıkarılmasını sağlar. Serbest radikalın bir hidrojen atomunu çıkarmasıyla lipit serbest radikali oluşur (II) ve lipit serbest radikali bir peroksil radikali oluşturmak üzere oksidasyona uğrar (III). Peroksil radikali diğer çoklu doymamış yağ asitleriyle etkileşime girerek elektron koparır, böylece lipit hidroperoksit ve diğer lipit serbest radikallerinin oluşmasına neden olur (IV). Bu süreç bir zincir reaksiyonu içerisinde sürekli olarak tekrarlanıp, çoğaltılabilir. Lipit hidroperoksit kararsız bir yapıda olduğundan, parçalanır ve MDA (V) ve 4-hidroksi-2-nonenal gibi ürünler elde edilir (Grotto ve ark., 2009). Aşağıdaki şekilde MDA oluşum basamakları şematize edilmiştir.



Şekil 6. Çoklu doymamış yağ asitlerinden MDA oluşumu (Grotto ve ark., 2009'dan)

2.8. Antioksidan Savunma Sistemleri

Aerobik canlılar organik moleküllerden enerji eldesi için moleküler oksijeni kullanırlar. Hücrenin fizyolojik ve metabolik süreçlerinden kaynaklanan reaktif oksijen ürünlerinin zararlı etkilerine maruz kalan bu organizmalarda, reaktif oksijen türlerini bertaraf etmek için 'Antioksidan Savunma Sistemi' olarak bilinen koruyucu bir sistem gelişmiştir. Bu sistemin görevi oksijenin tam olarak indirgenmemiş türlerinin oluşturduğu hasara karşı hücreyi korumaktır. Normal şartlarda reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge bulunmaktadır (Gönenç, 1997). Serbest radikallerin oluşumu ve uzaklaştırılması arasında dengesizlik meydana gelmesi oksidatif stres olarak adlandırılan durumun gelişmesine neden olur. Normal bir hücrede denge durumunun devamı söz konusudur. Bu denge radikal oluşumunun artması veya antioksidan düzeylerinin azalması sonucu bozulabilir. Masif ve uzun süreli stres sonucu ciddi hücre hasarları meydana gelmektedir (Shinde ve ark., 2012).

Serbest radikallerin etkisizleştirilmesi için organizmanın sahip olduğu koruyucu antioksidanlar, endojen kaynaklı ve ekzojen kaynaklı olarak 2 gruba ayrılırlar. Endojen kaynaklı antioksidanlar da enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak 2'ye ayrılırlar. Enzimatik antioksidanlar; katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimlerdir (Durmuş ve Ünsaldı, 2005; Shinde ve ark., 2012).

Enzimatik olmayan antioksidanlar da metabolik antioksidanlar ve besinsel antioksidanlar olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Lipoik asit, glutatyon, ürik asit, bilirubin, L-arginin gibi maddeler metabolik antioksidanlardandır. Vitamin C, vitamin E, karatenoidler, selenyum, bakır, çinko, mangan gibi iz elementler vücutta üretilmediği için dışarıdan alınması gereken besinsel antioksidanlardır (Shinde ve ark., 2012).

Antioksidan savunmanın çeşitli mekanizmaları vardır. Bunlar;

1. Birincil veya zincir kırıcı antioksidanlar (radikal temizleyici antioksidanlar): Bu antioksidanlar kendi elektronlarından birini vererek serbest radikalleri etkisiz hale getirirler.
2. İkincil veya önleyici antioksidanlar: (a) Metal katalizli reaksiyonlara katılmayan geçiş metallerinin sekestrasyonu, (b) CAT ve GPx tarafından, geçiş metal iyonlarıyla etkileşerek ROS üreten peroksitlerin ortadan

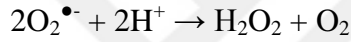
kaldırılması, (c) reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılması gibi birçok olası mekanizma aracılığıyla etki ederler.

3. Üçüncül ve onarıcı antioksidan koruma: Ortamdaki varlıkları hücre metabolizmasını ve canlılığını değiştiren hasarlı biyomoleküllerin, birikmeden ortadan kaldırılmasını sağlayan onarım işlemi. Örneğin; hasar görmüş DNA'nın metiyonin sülfoksit redüktaz (MSR) enzimi ile onarımı (Kumar ve ark., 2010).

2.8.1.Enzimatik Antioksidanlar

2.8.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutazlar (EC 1.15.1.1) süperoksit anyonunu oksijen ve hidrojen peroksit'e dismutasyonunu katalize eden bir enzim sınıfıdır.



SOD enzimleri hemen hemen bütün aerobik hücrelerde ve ekstraselüler sıvıda mevcuttur. Yapısında bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), demir (Fe) gibi metal iyonlarını kofaktör olarak bulundurur. İnsanlarda, dimerik Cu/ZnSOD izomeri sitozolde bulunurken, tetramerik MnSOD izomeri mitokondride bulunur. Ayrıca aktif bölgesinde bakır ve çinko bulunduran, bir üçüncü tür ECSOD da ekstraselüler sıvıda bulunmaktadır. Bu 3 tür arasında biyolojik olarak en önemli olan mitokondriyal izoenzimidir. Bu enzimin eksikliğinde farelerde doğumdan sonra kısa bir süre içinde ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2010; Özel ve Birdane, 2014).

Fe içeren izomeri FeSOD, prokaryotlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunmaktadır (Erenel ve ark., 1992).

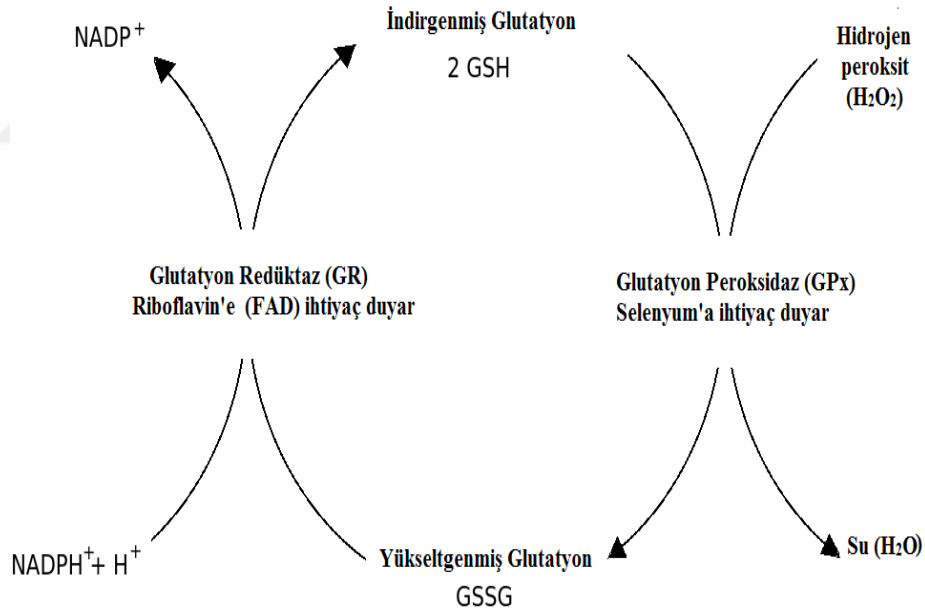
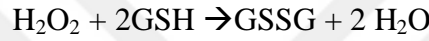
Süperoksit radikalının H₂O₂'ye dönüşümü kendiliğinden gerçekleşebildiği gibi; enzim aracılığıyla bu dönüşüm 10,000 kat artmaktadır. Doku oksijenasyonunun arttığı durumlarda veya süperoksit radikali oluşturan parakuat gibi toksik maddelerin varlığında SOD enziminin biyosentezi uyarılır (Dökmeçi, 2000; Gönenç, 1997).

2.8.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon Peroksidaz (GPx)'lar (EC 1.11.1.9), tetramerik enzim ailesinden olup, aktif bölgelerinde özgün bir amino asit olan selenosistein bulunduran ve glutatyon

gibi düşük moleküler ağırlıklı tiyollerini kullanan bir enzim sınıfıdır. Farklı genler tarafından kodlanan 4 çeşit GPx tanımlanmıştır. GPx-1 (selüler GPx) yaygın olan, H₂O₂ ve yağ asiti peroksitlerini indirgeyen fakat esterleşmiş peroksil lipitleri indirgeyemeyen formudur. Esterleşmiş lipitler membrana bağlı GPx-4 (fosfolipid hidroperoksit GPx) tarafından indirgenirler. GPx-2 (gastrointestinal GPx), gastrointestinal epitel hücrelerinde lokalize olup, besinsel peroksitleri indirgemeye yardımcı olurlar. GPx-3 (ekstraselüler GPx), hücre dışı alanda bulunan tek GPx olup, memelilerde en önemli ekstraselüler antioksidan enzim olduğu düşünülmektedir (Birben ve ark., 2012).

GPx, indirgenmiş haldeki GSH'ı GSSG'ye yükseltirken, H₂O₂'yi de H₂O'ya çevirir.

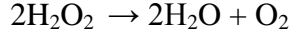


Şekil 7. Glutatyon redoks döngüsünde GPx

GPx eritrositlerdeki en önemli antioksidandır. Membran lipitlerini ve eritrositleri oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı korur. Selenyum eksikliği sonucu GPx yetersizliği görülebilmektedir (Memişoğulları, 2005).

2.8.4. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT) (E.C. 1.11.1.6), hemen hemen bütün aerobik hücrelerin peroksizomlarında bulunan, hidrojen peroksiti (H₂O₂) moleküler oksijen (O₂) ve suya (H₂O) yıkımlayarak serbest radikal üretmeden hücreyi toksik etkilere karşı koruyan bir enzimdir.



CAT aynı zamanda H₂O₂'yi kullanarak fenoller, formik asit, formaldehit ve alkoller gibi toksinleri okside eder (Koltaş ve Bilgin, 2016).

Hidrojen peroksit yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz enzimi tarafından, düşük konsantrasyonlarda ise glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından ortamdaki uzaklaştırılır (Özcan ve ark., 2015).

Böbrek, karaciğer, müköz membranlar, kan, eritrosit ve kemik iliğinde yüksek aktivite göstermektedir. İmmün sistemde, hücreleri kendi solunum patlamasına karşı korur (Sezer ve Keskin, 2014).

Değişmiş katalaz aktivitesi birçok hastalıkta görülebilmektedir. DM'de, malign hastalıklarda, down sendromunda, nefrotoksisitenin deneysel koşullarında ve yenilenmekte olan dokularda azalmış katalaz aktivitesi gösterilmiştir (Djordjević ve ark., 2000). Eritrosit katalaz enziminde görülen genetik bozukluk sonucu akatalazemi (normal aktivitenin %10'undan az aktivite göstermesi) ve hipokatalazemi (normal aktivitenin %50 kadarı aktivite göstermesi) durumu oluşmaktadır (Eaton ve Ma, 1995).

2.8.5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.8.6. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (GSH), sistein, glisin ve glutamat amino asitlerinden sentezlenen bir tripeptittir. Bütün memeli dokularında bulunan (en yüksek konsantrasyonu karaciğerde) GSH'nın konsantrasyonu 1-10 mM düzeyindedir. Hücre çoğalmasını, apoptozu, immün fonksiyonu, fibrogenезisi düzenler. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda ve antioksidan savunmada görev alır. Redoks potansiyelinin devamında rol alır (Lu, 2013). Aminoasit taşınmasında, proteinlerin sülfidril gruplarının indirgenmiş halinin devamında görevlidir. Dokularda indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) halde 2 ayrı formda bulunmaktadır. GSH, glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi aracılığıyla

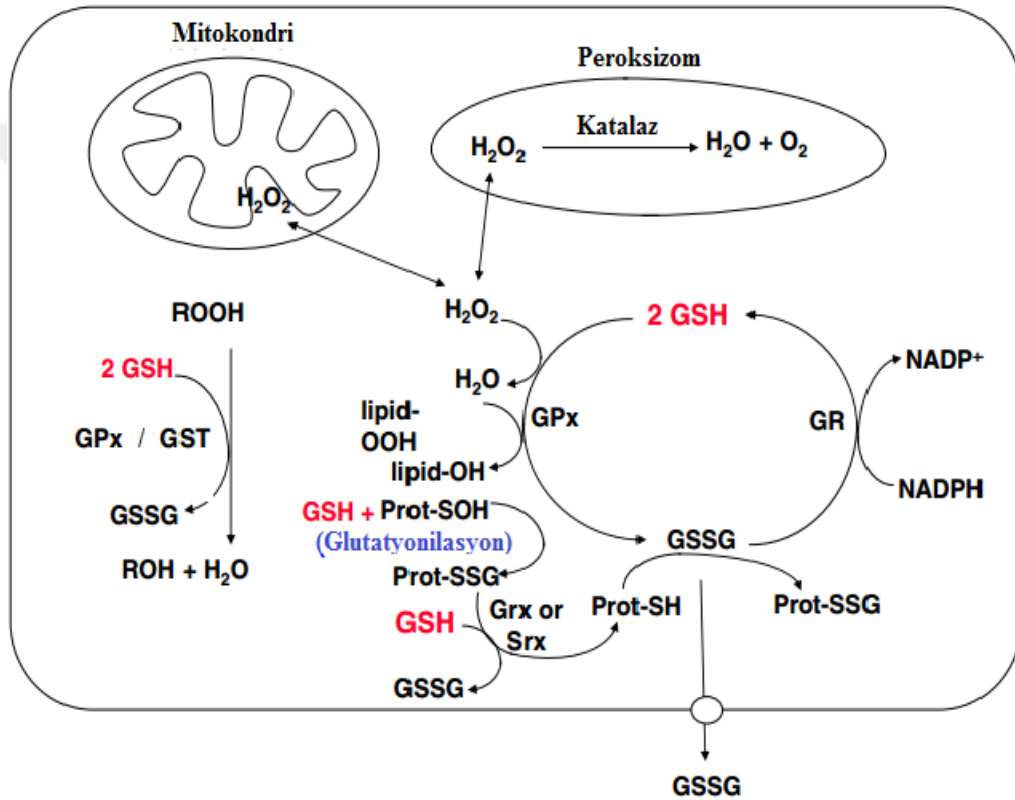
GSSG'ye dönüşür (Konukoğlu ve Akçay, 1995). Fizyolojik koşullarda hücredeki temel formu indirgenmiş haldeki GSH'dir. Ökaryotik hücrelerde belirli bir GSH rezervesi bulunmaktadır. Büyük çoğunluğu sitozolde bulunan GSH, mitokondri, nukleus ve endoplazmik retikulum gibi organellerde de bulunmaktadır. Endoplazmik retikulumda proteinlerin doğru katlanması ve salgılanması için okside formu (GSSG) hakimdir (Aquilano ve ark., 2014). Rat karaciğer sitozolik glutasyonu 2-3 saatlik bir yarılanma ömrüne sahiptir (Lu, 2013).

GSH'ı hidrolize edebilen tek enzim, belirli hücre çeşitlerinin dış yüzeyinde bulunan γ -glutamiltanspeptidaz (GGT) enzimidir. Bu durumun sonucu olarak; GSH hücre içi yıkımlanmaya karşı dayanıklı olmakta, sadece GGT enzimini eksprese eden hücrelerce ekstraselüler olarak metabolize edilmektedir. Plazma ve safradaki GSH'nın kaynağı karaciğerdir (Lu, 2013).

GSH, hücreleri ROS ve RNS gibi endojen ve ekzojen toksinlere karşı korumada en önemli hidrofilik antioksidandır. Bu türler arasında radikal maddeler GSH'nın non-enzimatik indirgenmesi ile temizlenirken, hidroperoksitlerin eliminasyonu GPx ve CAT enzimlerinin enzimatik katalizi ile gerçekleşmektedir. GSH'nın elde edilen oksitlenmiş formu GSSG, 2 molekül GSH'nın arasındaki disülfid bağı ile karakterizedir. GSSG NADPH-bağımlı bir flavoenzim olan glutasyon redüktaz (GR) ile tekrar GSH'a indirgenir (Aquilano ve ark., 2014).

GSH'nın antioksidan işlevi, hidrojen peroksiti (H_2O_2) ve lipid peroksiti indirgeyen, aynı zamanda GSH'ı GSSG'ye oksitleyen GPx enziminin katalizlediği reaksiyonlar ile gerçekleşir. Aerobik metabolizmanın ürettiği hidrojen peroksit (H_2O_2), sitozolde ve mitokondride GPx ile metabolize edilirken, peroksizomlarda CAT ile metabolize edilir. GSSG de NADPH bağımlı bir enzim olan GR enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüşür. Organik peroksitler (ROOH) hem GPx ile hem de Glutasyon S-transferaz (GST) enzimleriyle indirgenirler. GSH aynı zamanda protein redoks sinyalizasyonunda anahtarrol oynamaktadır. Oksidatif stres esnasında protein sistein artıkları sülfenik aside (Prot-SOH) okside olurken, oluşan bu yapılar GSH ile etkileşime girerek protein karışık disüfritleri (Prot-SSG) meydana gelir (glutasyonilasyon). Prot-SSG'ler de glutaredoksin (Grx) veya sülfiredoksin (Srx) enzimleri yardımıyla protein sülfidrilere (Prot-SH) dönüşürler. Bu mekanizma duyarlı protein tiyollerini geri dönüşümsüz oksidasyondan korur ve ayrıca oksidatif koşullar altında GSH kaybını

önlenebilir. GSH, özellikle mitokondride hem fizyolojik hem de patolojik kaynaklı oksidatif strese karşı savunmada önemlidir. GSH/GSSG oranı intraselüler redoks potansiyelini büyük ölçüde belirler. Hücrenin GSSG'nin GSH'a indirgeme yeteneği, oksidatif stresi karşılayamadığında, GSSG birikir. Redoks dengesindeki değişimi önlemek için; GSSG ya aktif olarak hücre dışına verilir veya protein sülfidril (Prot-SH) grupları ile etkileşime girerek karışık disülfidlerin (Prot-SSG) oluşumuna yol açar. Böylece ağır oksidatif stres koşulları hücrel GSH'ı tüketir (Lu, 2013).

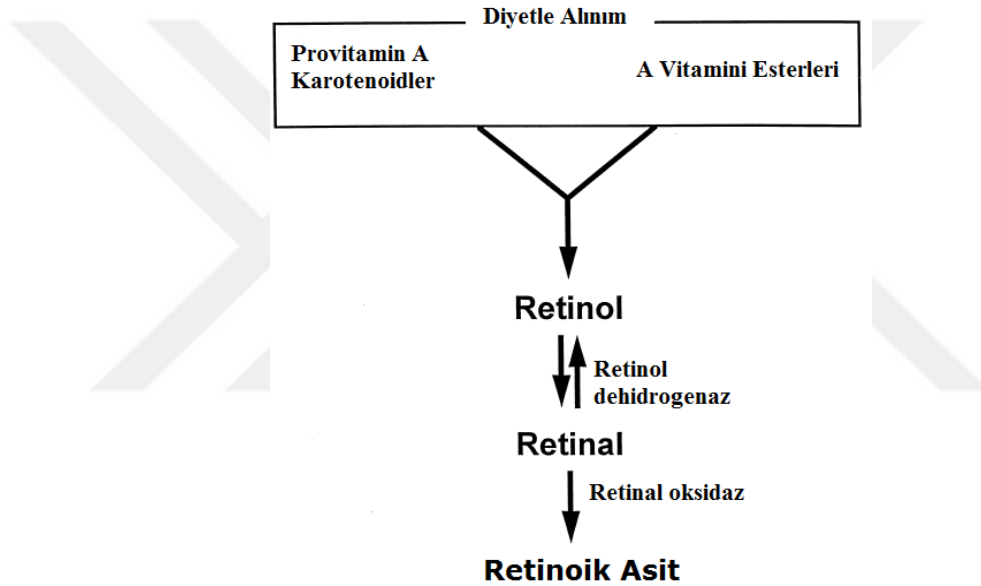


Şekil 8. GSH'nın antioksidan fonksiyonu (Lu, 2013'ten)

2.8.7. A Vitamini ve Karotenoidler

Karotenoidler, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, renkli, yağda çözünebilir pigmentlerdir. Bugüne kadar 600'den fazla karotenoid tanımlanmış olup; bunların az bir kısmı (~19 tane) insan dokusunda tespit edilmiştir. Bu karotenoidler, besinsel karotenoidler ve bunların metabolitleridir. Likopen, β-karoten, ksantofiller, kantaksantin, astaksantin, lutein, zeaksantin karotenoidlerden bazılarıdır (El-Agamey ve ark., 2004). A vitamini diyetle alınması gereken bir vitamindir. Yeşil ve

sarı sebzeler, süt ürünleri, meyve ve kırmızı et A vitaminince zengin kaynaklardan bazılarıdır. Vücut içerisinde A vitamini, retinol, retinal ve retinoik asit halinde bulunabilir. A vitamininin serbest alkol formu olan retinol, çeşitli dokularda enzimatik yolla retinal'e dönüşebilir. Retinal de geri dönüşümü olmayan bir reaksiyonla güçlü bir transkripsiyon faktörü olan retinoik aside dönüşür. Bu formların hepsi yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğu için ekstraselüler sıvıda ve hücre içerisinde proteinlere bağlı halde bulunmaktadır. A vitamini esas olarak uzun zincirli yağ esterleri şeklinde ve karaciğerde, böbrekte ve adipoz dokuda provitamin karotenoidler olarak depolanır (Palace ve ark., 1999).



Şekil 9. Karotenoid ve retinil esterlerinin A vitamininin farklı aktif formlarına biyodönüşümü (Palace ve ark., 1999'dan).

Vitamin A ve karotenoidler antioksidan aktivitesini hidrofobik zincirlerindeki polien birimler vasıtasıyla gösterir. Bu birimler singlet oksijeni ortamdaki giderir, tiyil radikallerini nötralize eder ve peroksil radikallerini kararlı hale getirir. Genel olarak daha uzun polien zinciri, daha fazla peroksil radikalini kararlı hale getirme yetisi kazandırır (Palace ve ark., 1999).

A vitamini antioksidan etkisini değişik şekillerde göstermektedir. Peroksil radikalının hücrenin lipit fazındaki peroksidasyonu iletmeden ve hidroperoksitler oluşmadan önce, A vitamini peroksil radikali ile birleşir, A vitamini zincir kırıcı bir etki

gösterir. Ayrıca A vitamini radikal türleri tarafından direkt okside olarak, 5,6-retinoid epoksite oluşturur. Böylece lipid radikallerini kararlı hale getirir. Retinol fosfatidilkolin lipozomlarında ve metil linoleatın homojen solüsyonlarında peroksidasyonu inhibe ederek, efektif bir peroksil süpürücüsü olarak işlev görmektedir (Tesoriere ve ark.,1993). Retinoik asidin A vitaminine oranla daha düşük konsantrasyonda olması, nispeten daha az antioksidan aktivite göstermesine neden olmaktadır. Benzer şekilde retinil esterlerinin gösterdiği antioksidan koruma, Vitamin A'nın serbest alkol formlarının gösterdiği antioksidan etkiden daha azdır. *İn vitro* peroksidasyon sistemi göz önüne alındığında retinoidlerin antioksidan aktiviteleri retinol \geq retinal \gg retinil palmitat $>$ retinoik asit şeklinde sıralanmaktadır (Das, 1989).

Karotenoid ailesinin yağda çözünür üyesi olan β -karoten, aktif A vitaminine dönüşebildiği için provitamin olarak kabul edilir. Görme fonksiyonunda esansiyel olan retinole dönüşür. Yağda, tahıllarda, meyve ve sebzelerde (havuç, kabak, ıspanak, yeşil bitkiler) bolca bulunur (Pham-Huy ve ark., 2008).

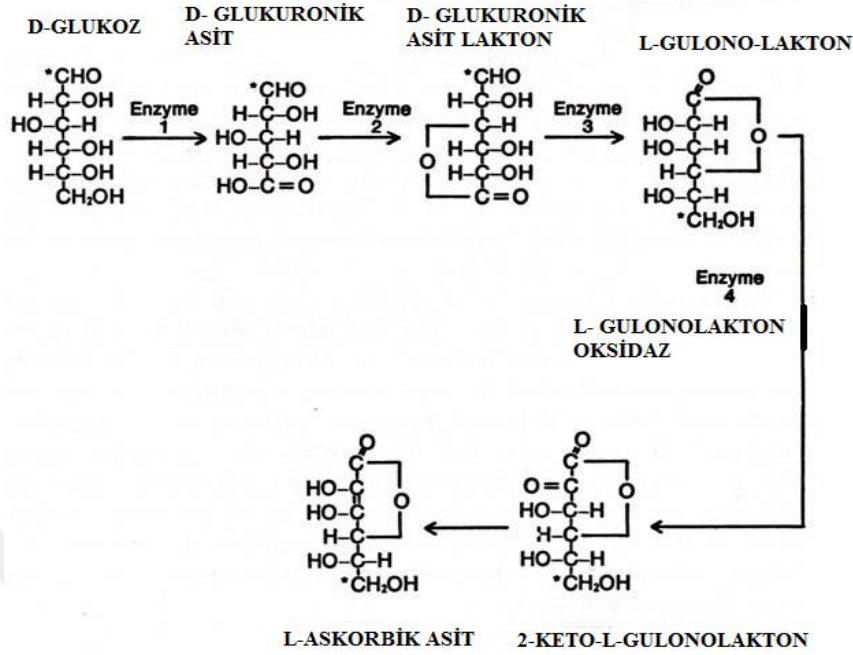
β -karoten, enzimatik antioksidanlar olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinde artışa aracılık ederek antioksidan savunmayı destekler (Blakely ve ark., 1988). Ayrıca β -karoten, glutasyon (tiyil), sülfonil ve nitrojen dioksit radikallerini bastırır (Everett ve ark., 1996), singlet oksijeni en iyi temizleyici antioksidandır (Pham-Huy ve ark., 2008).

Yapılarından dolayı A vitamini ve karotenoidler, oksijen miktarı arttığında otooksidasyona uğramaktadırlar. Bu yüzden en etkili antioksidan işlevini dokulardaki fizyolojik düzeyde düşük oksijen miktarı varlığında göstermektedirler (Palace ve ark., 1998).

2.8.8. C Vitamini

C vitamini (askorbik asit), insan, primat, guinea pig hariç, birçok memeli türünün karaciğerinde glukozdan sentezlenen 6 karbonlu bir laktondur. Bu türlerde 2-keto-L-gulonolakton öncül maddesinden, askorbik asidin sentezi için gerekli olan gulonolakton oksidaz enzimi bulunmamaktadır. 2-keto-L-gulonolakton oluşuktan sonra enzime ihtiyaç duymaksızın kendiliğinden L-askorbik aside dönüşür (Stone, 1982). Gulonolakton oksidazı kodlayan DNA mutasyona uğrayarak, fonksiyonel enzimin kaybına neden olmuştur (Nishikimi ve ark., 1994; Nishikimi ve Yagi, 1996).

Böceklerde, omurgasızlarda ve balıklarda da C vitamini sentezlenememektedir (Chatterjee ve ark.,1975).



Şekil 10. C vitamininin Sentezi (Stone, 1982'den)

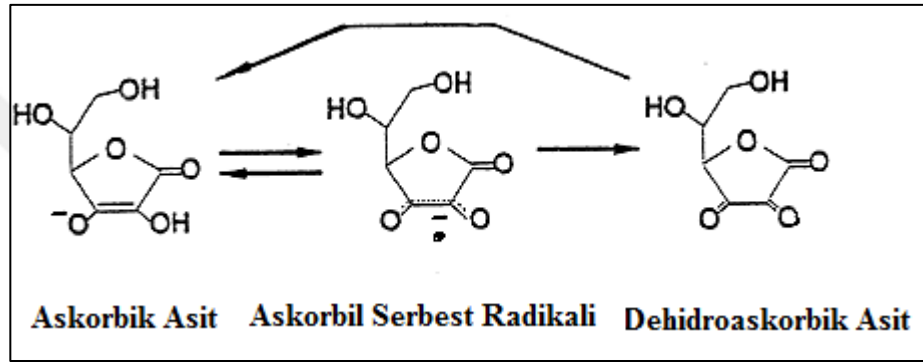
C vitamini elektron verici indirgen bir ajandır. Bilinen tüm fizyolojik ve biyokimyasal işlemlerde C vitamini elektron verici olarak görev yapmaktadır. Askorbik asit 6 karbonlu yapısındaki 2. ve 3. karbonları arasındaki çift bağdan 2 elektron vererek diğer bileşiklerin okside olmasını engeller. Bu nedenle C vitamini antioksidan olarak nitelendirilir. Bununla birlikte bu reaksiyonun doğası gereği, işlem sırasında kendisi de oksitlenir (Padayatty ve ark., 2003).

C vitamini 2 elektronunu sırasıyla verirken, 1 elektronunun kaybıyla bir serbest radikal, semidehidroaskorbik asit veya askorbil radikali oluşur. Diğer serbest radikal türleri ile karşılaştırıldığında; askorbil radikali 10^{-5} saniyelik yarı ömrü ile nispeten daha stabil ve tepkimeye girmeyen bir maddedir. Bu özelliği askorbik asidin neden tercih edilen antioksidan olduğunu açıklayıcı olabilmektedir. Çünkü askorbik asit reaktif ve muhtemelen zararlı olan bir serbest radikal ile reaksiyona girdiğinde, reaktif serbest radikal indirgenirken, oluşan askorbil radikali daha az reaktivite göstermektedir. Bir reaktif serbest radikalın indirgenmesi ve bunun yerine daha az reaktif bir bileşimin oluşması süpürme (scavenging) veya sönmülendirme (quenching) olarak

adlandırılmaktadır. Askorbik asit kimyasal özellikleri nedeniyle iyi bir serbest radikal süpürücüsüdür (Buettner ve Moseley 1993; Bielski ve ark., 1975).

Çiftleşmemiş elektrona sahip askorbil radikali uzun ömürlü bir bileşik değildir. İkinci elektronun kaybıyla dehidroaskorbik asit meydana gelir. Dehidroaskorbik asidin stabilitesi de sıcaklık pH gibi faktörlere bağlıdır (Washko ve ark., 1993).

Hem askorbil radikali ve hem de dehidroaskorbik asit oluştuktan sonra tekrar askorbik aside indirgenebilmektedir. Fakat insanda bu indirgenme kısmi bir şekilde gerçekleşmekte, bu nedenle oksitlenen askorbik asidin tamamı geri kazanılamamaktadır (Padayatty ve ark., 2003).



Şekil 11. Askorbik asit metabolizması

Vitamin C'den elektron alarak indirgenen türler birkaç sınıfa ayrılabilir. Bunlar; (a) çiftleşmemiş elektron bulunduran oksijen ile ilgili radikaller (süperoksit, hidroksil radikali, peroksil radikalleri), sülfür radikalleri ve nitrojen-oksijen radikalleri, (b) hipokloröz asit, nitrozaminler, nitröz asit ve ozon gibi reaktif olup da radikal olmayan türler, (c) ilk iki grupta reaksiyona girerek oluşan, daha sonra vitamin C ile etkileşen maddeler. LDL'de ekzojen radikal oksidanlarla α -tokoferolün etkileşime girmesi ile, tokoferol radikalinin oluşumu bu duruma bir örnek teşkil etmektedir. Tokoferol radikali askorbik asit vasıtasıyla α -tokoferole indirgenir (Neuzil ve ark., 1997). (d) Demir ve bakırla ilgili geçiş metalleri aracılı reaksiyonlar. Örneğin; demirin askorbik asit ile indirgenmesi, Fenton reaksiyonu yoluyla diğer radikallerin oluşumuna yol açar (Hallberg, 1995).

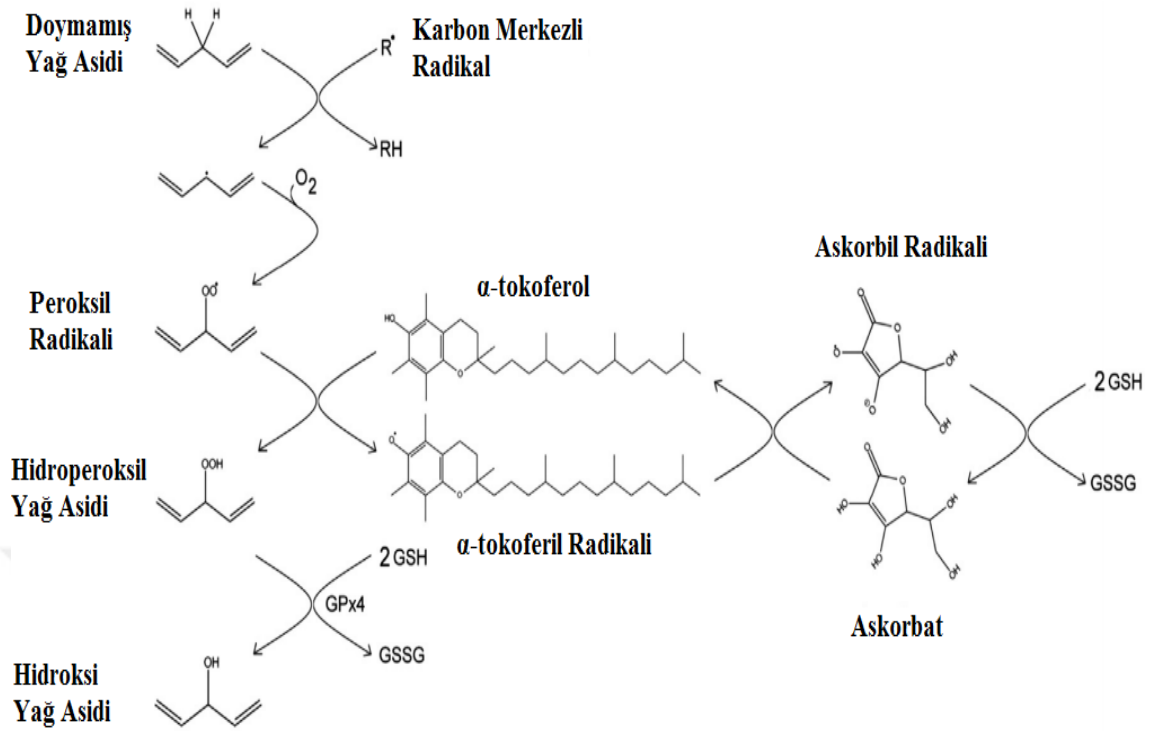
C vitamini insanda 8 farklı enzim için elektron verici olarak görev yapar. Bu 8 enzimden 3'ü kollajen hidroksilasyonunda görevlidir. Bu reaksiyonlarda, kollajen

molekülündeki prolin ve lizin amino asitlerine hidroksil grubu eklenir. Böylece kollajen molekülünün 3'lü heliks yapısının stabilitesi büyük ölçüde artar (Prockop ve Kivirikko, 1995; Peterkofsky, 1991; Kivirikko ve Myllyla, 1985). Vitamin C bağımlı enzimlerden 2'si karnitin sentezinde görev alır. Karnitin ATP üretimi için mitokondriye yağ asitlerin taşınmasında gereklidir (Rebouche, 1991; Dunn ve ark., 1984). Diğer 3 vitamin C bağımlı enzimden biri dopaminden norepinefrin biyosentezinde görev alırken (Levine ve ark., 1992; Kaufman, 1974); bir diğeri peptit hormonlara amid grupları ekleyerek stabilitelelerini güçlendirir (Eipper ve ark., 1993; Eipper ve ark., 1992). Bir diğeri de tirozin metabolizmasını düzenler (Englard ve Seifter, 1986; Lindblad ve ark., 1970).

2.8.9. E Vitamini

E vitamini Evans ve Bishop (1922) tarafından, ratlarda üreme için gerekli olan bir besin faktörü olarak keşfedilmiştir. Gıdalarda bulunan 4 tokoferol türünden (α -, β -, γ - ve δ - olarak belirlenmiştir) yalnızca α -tokoferol insan için E vitamini gereksinimini karşılamaktadır. E vitamini, lipid peroksidasyonunun ilerlemesini engelleyen zincir kırıcı bir antioksidan olarak işlev görmektedir (Food and Nutrition Board Institute of Medicine, 2000).

Yağda çözünen bir antioksidan olan α -tokoferol, geniş bir antioksidan ağı ile birlikte hücrel membranları lipid peroksidasyonundan korumaktadır. Lipid peroksidasyonunun ilerleme safhasında karbon merkezli radikal (R^\bullet), komşu doymamış yağ asitinden bir alilik hidrojen alır. Moleküler oksijen yağ asidi radikali ile reaksiyona girer ve peroksil radikalini oluşturur. α -tokoferol lipid peroksil radikallerini lipid hidroperoksitlerine indirgerken; selenyum bağımlı GPx-4, GSH'yı harcayarak hidroperoksitleri daha az toksik olan lipid hidroksitlere dönüştürür. Askorbat (C vitamini) da α -tokoferol radikalini indirgeyerek, aktif α -tokoferolü rejenere eder. Daha sonra okside olan askorbil radikali de GSH aracılığıyla askorbata dönüşür. Antioksidan ağın devamlılığı, hücrel membranların radikal aracılı yıkımına karşı korunmada çok önemlidir (Lebold ve Traber, 2014).



Şekil 12. Lipit peroksidasyonu, E vitamini ve antioksidan ağ (Lebold ve Traber., 2014'ten)

α-Tokoferol, E vitamini alınımının yetersiz olduğu zamanlarda periferik dokularda tükenmiş olsa bile, nöronal dokulardaki, özellikle beyindeki miktarı korunmaktadır (Lebold ve Traber, 2014). Belirgin eksikliği çok nadir görülmekle birlikte; yetersiz beslenmede, vitamini absorbe edemeyen bireylerde ve hepatik α-tokoferol transfer proteinde (α-TTP) meydana gelen kalıtsal anormallik durumlarında normal kan konsantrasyonunun devamlılığı sağlanamamaktadır (Food and Nutrition Board Institute of Medicine, 2000; Lebold ve Traber, 2014). E vitamini eksikliği olan insanlarda başlangıçta hafif bir duyuşal nöropati daha sonra ilerleyerek periferik nöropatiye, spinoserebellar ataksiye ve sonuçta ölüme neden olmaktadır (Lebold ve Traber, 2014).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından, OMÜ Deneysel Hayvanlar Araştırma Merkezi'nde (DEHAM) yürütülmüştür. Tez çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (14.07.2015 tarihli 2015/50).

3.1. Materyal

3.1.1. Deneysel Hayvanlar

Bu çalışmanın materyalini 3-4 aylık, 250-300 g canlı ağırlığa sahip 49 adet Wistar-Albino erkek rat oluşturdu. Ratların temini ve bakımı OMÜ DEHAM tarafından sağlandı.

3.1.2. Deneysel Hayvanlarının Gruplara Ayrılması ve Yapılan Uygulamalar

Her grupta 7 rat olacak şekilde 7 gruba ayrılan ratlar tel kafeslerde, 12 saat gündüz 12 saat gece periyotlarında, $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve $\%50\pm 5$ nemde tutuldu. Çalışma süresi 7 gün olarak belirlendi. Çalışma süresince ratların önünde sürekli yem ve içme suyu bulunduruldu.

Ratların gruplara bölünmesi;

1. Grup: Amoksisilin klavulanik asit uygulama grubu: ml'sinde 35 mg klavulanik asit + 140 mg amoksisilin trihidrat ihtiva eden enjeksiyonluk süspansiyondan (Noroclav-Etkin İlaç San.) 150 mg/kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde intramusküler (i.m.) olarak uygulandı.

2. Grup: Amoksisilin klavulanik asit + vitamin C uygulama grubu: 1 ml'sinde 35 mg klavulanik asit + 140 mg amoksisilin trihidrat ihtiva eden enjeksiyonluk süspansiyondan 150 mg/kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde i.m. olarak uygulanmıştır. İlave olarak ml'sinde 100 mg askorbik asit içeren flakondan (Redox-C, Bayer İlaç) 200 mg/kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde intraperitoneal (i.p.) olarak uygulama yapıldı.

3. Grup: Amoksisilin klavulanik asit + vitamin E uygulama grubu: 1 ml'sinde 35 mg klavulanik asit + 140 mg amoksisilin trihidrat ihtiva eden enjeksiyonluk süspansiyondan 150 mg/kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde i.m. olarak uygulandı. İlave olarak ml' sinde 150mg alfa tokoferol içeren flakondan (Evigen- Laurus İlaç) 150 mg/kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde i.m. olarak uygulandı.

4. Grup: Amoksisilin klavulanik asit + vitamin C+ vitamin E uygulama grubu: 1 ml'sinde 35 mg klavulanik asit+140 mg amoksisilin trihidrat ihtiva eden enjeksiyonluk süspansiyondan 150 mg/kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde i.m. olarak, ml'sinde 100 mg askorbik asit içeren flakondan 200mg/ kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde i.p. olarak ve ml' sinde 150 mg alfa tokoferol içeren flakondan 150 mg/kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde i.m. olarak uygulandı.

5. Grup: Vitamin C grubu: 1 ml'sinde 100 mg askorbik asit içeren flakondan 200 mg/ kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde i.p. olarak uygulama yapıldı.

6. Grup: Vitamin E grubu: ml'sinde 150 mg alfa tokoferol içeren flakondan 150mg/kg canlı ağırlık/gün olacak şekilde i.m. olarak uygulama yapıldı.

7. Grup: Kontrol grubu: 0,1 ml/gün olacak şekilde serum fizyolojik i.p. olarak uygulandı.

3.1.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması ve Analizler İçin Hazırlanması

7 günün sonunda, etik kurallara uygun olarak, intraperitoneal yolla verilen anestezi maddelerin karışımı [%2'lik Basilazin (2-5 mg/kg c.a.) ve %10'luk Ketazol(0,8-1,3 ml/kg c.a.)] ile ratların uyutulması sağlandı. Karınları açılan ratların kalplerinden EDTA'lı tüplere kan alınımı gerçekleştirildi. Daha sonra karaciğer ve her iki böbrek dokusu kesilerek çıkartıldı. Dokular soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, bir kısım doku örnekleri histolojik inceleme için % 10'luk formol çözeltisi içine konuldu.

Alınan kanlar aynı gün 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj (Nüve NF800R) edildi. Plazmaları çıkarılan örneklerin, otoanalizörde ALT, AST, ve GGT enzim aktiviteleri ölçüldü.

Soğuk serum fizyolojik ile yıkanan doku örnekleri, 1/10 oranında Tris-HCl tamponuyla sulandırıldı ve homojenize edildi (PRO 200 homojenizatör). Elde edilen homojenizatlar 4000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısmı ependorf tüplerine bölünerek pipetlendi. Süpernatantlar biyokimyasal çalışmaların yapılacağı güne kadar -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

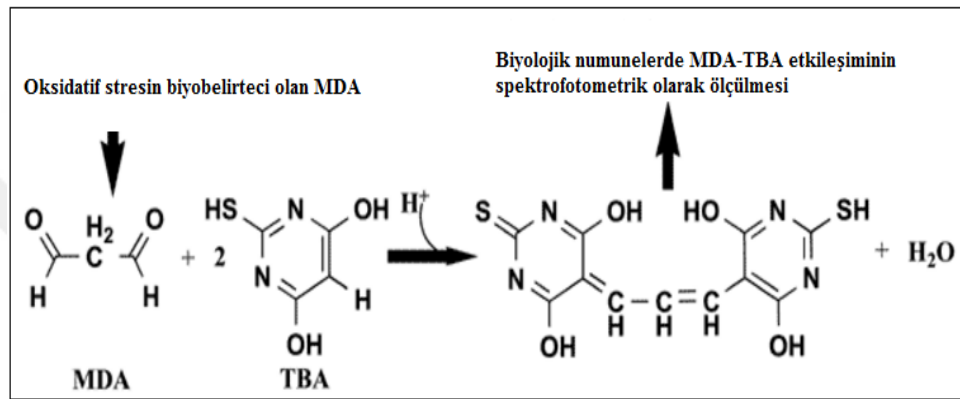
Tris-HCl Tamponu: 0,2 M Tris: 24,23 g Tris tartıldı. Bir miktar distile suda çözündürüldükten sonra hacmi distile su ile 1 l' ye tamamlandı. 0,1 N HCl: 8,3 ml HCl alınıp bir miktar distile suya konuldu. pH'sı pH metrede (Cyberscan 510) 7 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra hacmi distile su ile 1 l'ye tamamlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Dokuda Malondialdehit Tayini

Prensip

Malondialdehit (MDA), bazı primer ve sekonder lipid peroksidasyon ürünlerinin parçalanması yoluyla oluşan, düşük molekül ağırlıklı son ürünlerdendir. Düşük pH ve yükselmiş sıcaklıkta MDA, 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile nükleofilik katılma reaksiyonuna girerek kırmızı floresan renk oluşturur (Janero, 1990).



Şekil 13. MDA-TBA reaksiyonu (Khoubnasabjafari ve ark., 2016'dan)

Kullanılan Kimyasallar

1. Fosfat Tamponu: 8,1 g NaCl, 0,194 g NaH₂PO₄ ve 2,302 g Na₂HPO₄ tartıldı, bir miktar distile suda çözüldürüldü. Hacmi balonjojede distile su ile 1 l'ye tamamlandı. pH'sı 7,4'e ayarlandı.
2. 0,1 M EDTA Çözeltisi: 37,224 g EDTA-Na₂H₂O tartıldı, bir miktar distile su ile çözüldürüldü. Hacmi balonjojede distile su ile 1 l'ye tamamlandı.
3. %0,88'lik BHT Çözeltisi: 0,220 g BHT tartıldı. Bir miktar mutlak alkol ile çözüldürüldü. Hacmi balonjojede 25 ml'ye tamamlandı.
4. 0,05 N NaOH Çözeltisi: 2 g NaOH tartıldı. Bir miktar distile su ile çözüldürüldü. Hacmi balonjojede distile su ile 1 l'ye tamamlandı.
5. %30'luk TCA Çözeltisi: 30 g TCA tartıldı, bir miktar distile su ile çözüldürüldü. Hacmi balonjojede 100 ml'ye tamamlandı.
6. %1'lik TBA Çözeltisi: 1 g TBA tartıldı, bir miktar 0,05 N NaOH ile çözüldürüldü. Hacmi balonjojede 0,05 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen süpernatantlarda MDA tayini Sushil ve ark., (1989)'nın metoduna göre yapıldı. Deney tüplerine alınan 200 µl'lik süpernatant örneklerinin üzerine 800µl fosfat tamponu, 25 µl BHT çözeltisi ve 500 µl %30'luk TCA çözeltisinden eklenerek tüpler iyice karıştırıldı. 2 saat buz içerisinde bekletilen tüpler daha sonra 15 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerin üst kısmından 1'er ml süpernatant alınarak başka tüplere pipetlendi. Süpernatantların üzerine de 75 µl 0,1 M EDTA-Na₂H₂O ve 250 µl %1'lik TBA çözeltisi eklendi ve tüpler karıştırıldı. Daha sonra tüpler 15 dakika boyunca 90 °C'lik sıcak su banyosunda bekletildi. Oda sıcaklığına getirilen tüplerin 532 nm'de spektrofotometrede (Thermo-Scientific Genesys 10S UV-Vis) absorbansları okundu. Kör olarak; 200 µl süpernatant yerine 200 µl distile su kullanıldı ve aynı işlemler uygulandı.

Hesaplamalar

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/g doku}) = (\text{OD}_{532} / \epsilon \cdot b) \times F$$

OD₅₃₂ = 532 nm'deki absorbans

F: Seyreltme Faktörü

ε: Ekstinksiyon Katsayısı = 1,56 x 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹

b: Işık yolu = 1 cm

3.2.2. Dokuda Redükte Glutatyon (GSH) Tayini

Prensip

Glutatyonun spektrofotometrik analiz yöntemi; GSH'nin bir sülfhidril reaktifi olan 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile oksidasyonu sonucu oluşan sarı renkli 5'-tiyo-2-nitrobenzoik asidin (TNB), 412 nm'de absorbansının okunması prensibine dayanmaktadır (Rahman ve ark., 2007).

Kullanılan Kimyasallar

1. 0,3 M Na₂HPO₄ Çözeltisi: 53,396 g Na₂HPO₄.2H₂O tartılıp hacmi 1 l'ye tamamlandı.

2. DTNB (Ellman's) Ayracı: 100 mg DTNB (5-5' dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (0,4 mg/ml olacak şekilde) %1'lik sodyum sitrat çözeltisi ile 250 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Dokulardaki GSH tayini modifiye Ellman metodu ile gerçekleştirildi (Yüzüak ve ark., 2014). Deney tüpüne alınan 0,5 ml süpernatant üzerine 2 ml 0,3 M Na₂HPO₄ eklendi. Daha sonra bu karışımın üzerine 0,2 ml DTNB ayracı pipetlendi. Karışım vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika beklendi ve 412 nm'de absorbansı okundu. Kör olarak distile su kullanıldı.

Hesaplamalar

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/g doku}) = (\text{OD}_{412} / \epsilon \cdot b) \times F$$

OD₅₃₂ = 532 nm'deki absorbans

F: Seyreltme Katsayısı

ϵ : Ekstinksiyon Katsayısı = 13600 M⁻¹ cm⁻¹

3.2.3. Dokuda Vitamin C Tayini

Prensip

C Vitamini (askorbik asit) içeriği tayini 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) kullanılan kolorimetrik yöntemle gerçekleştirilmiştir (Omaye ve ark., 1979). Askorbik asit dehidroaskorbik asit oluşturmak üzere bakır tarafından okside edilir. Askorbik asit ürünlerinin DNPH ile işleme tabi tutulmasıyla bis-2,4 dinitrofenilhidrazon türevi oluşur. (Nakamura ve ark., 2006). Oluşan rengin absorbansı 520 nm'de okunur.

Kullanılan Kimyasallar

1. %10'luk TCA: 10 g TCA tartıldı. Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 2,4-dinitrofenilhidrazin ayracı (DNPH): 3 g DNPH, 4 g tiyoüre, 50 mg bakır sülfat tartıldı. Hacmi 9 mol/L'lik H₂SO₄ ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. H₂SO₄ (9 mol/L): %98 saflıktaki H₂SO₄'den 48,91 ml alındı. Bir miktar distile suyun üzerine konuldu. Daha sonra hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4. %85'lik H_2SO_4 : %98 saflıktaki H_2SO_4 'den 216 ml alınarak bir miktar distile suyun üzerine konuldu. Daha sonra hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

Dokularda C vitamini tayini Omaye ve ark. (1979)'nın metoduna göre yapıldı. 1 ml %10'luk doku homojenizatından alınarak üzerine 1 ml %10'luk TCA çözeltisi eklendi. İyi karıştırıldıktan sonra 4000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilen tüplerden 1'er ml süpernatant alındı. Alınan süpernatantların üzerine 0,5 ml DNPH ayracı eklendi ve 37°C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından tüplere, buzda bekletilmiş %85'lik H_2SO_4 'den 2,5 ml konuldu. İyi karıştırılan tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve absorbansları 520 nm'de okundu. Standartı 10 µg/ml'lik saf askorbik asit ile hazırlandı (George, 2003).

Hesaplamalar

Vitamin C (mg/100g doku) : (OD numune/OD standart) x F

3.2.4. Dokuda Katalaz Tayini

Prensip

Katalaz enziminin substratı olan hidrojen peroksidin yıkım hızının, 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Aebi, 1984).

Kullanılan Kimyasallar

1. Fosfat tamponu : a-) 6,81g KH_2PO_4 tartıldı hacmi distile su ile 1 l'ye tamamlandı. b-) 8,90g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ tartıldı, hacmi distile su ile 1 l'ye tamamlandı. Karışım çözeltisi a+b 1:1,5 oranında alınarak hazırlandı.
2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) (30 mM): 0,34 ml %30' luk H_2O_2 çözeltisi pipetlendi, hacmi 100 ml'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.
3. H_2O_2 'li Fosfat Tamponu: Hazırlanan H_2O_2 çözeltisinden, fosfat tamponuna optik dansite (240 nm) 0,5 olana kadar ilave edilerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Aşağıdaki belirtilen pipetlemeler yapıldıktan sonra, 240 nm'de köre karşı örneğin absorbansının lineer azalma gösterdiği zaman aralığı ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı.

	Kör	Örnek
Fosfat Tamponu	2,99 ml	
Homojenat	-	0,01 ml
H ₂ O ₂ 'li Fosfat Tamponu	0,01 ml	2,99 ml

Hesaplamalar

$$\text{Aktivite (k/g doku)} = (2.3/\Delta t) \times (\log A_1/A_2) \times F$$

A₁= İlk okunan absorbans

A₂= Son okunan absorbans

F (sulandırma katsayısı) = 1000

3.2.5. Dokuda Total Protein Tayini

Prensip

Total protein miktarını belirlemek amacıyla biüret metodu kullanılmıştır. Alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının bakır ile kompleks oluşturması ve oluşan bu rengin 540 nm'de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanır (Tiftik, 1996).

Kullanılan Kimyasallar

1. 2,5 N Sodyum Hidroksit: 50 g NaOH tartılıp bir miktar distile su ile çözüldürüldü. Hacmi 1 l'ye tamamlandı.
2. Sodyum Sülfat: 20 g sodyum sülfat tartıldı. Önce bir miktar distile suda çözüldürüldü. Daha sonra hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. Biüret Ayracı: 2,5 g bakır sülfat ve 10 g Na-K tartarat bir miktar distile suda eritildi. 2,5 N NaOH'dan 350 ml üzerine eklendi. Karışımın hacmi distile su ile 1 l'ye tamamlandı.
4. Sığır Serum Albumin (BSA) Standardı : 6g/100 ml olacak şekilde hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Aşağıdaki tabloda belirtilen pipetlemeler ve işlemler sırasıyla gerçekleştirildi.

	Blank	Standart	Numune
Süpernatant	-	-	50µl
BSA standardı	-	50µl	-
Distile Su	50µl	-	-
NaSO ₄	1 ml	1 ml	1 ml
Karıştırıldı			
Büret Ayracı	1 ml	1 ml	1 ml
Karıştırıldı, 5 dakika beklendi.			
505 nm'de absorbanslar okundu.			

Hesaplamalar

Total protein (%g) :

$$(OD_{Numune} \times Standartın\ Konsantrasyonu) / (OD_{standart}) \times F$$

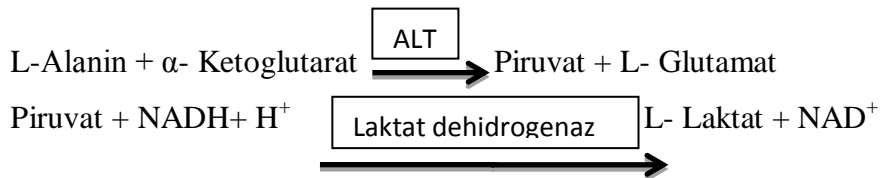
F: seyreltme faktörü = 10

3.2.6. Plazmada ALT, AST ve GGT Enzim Aktivitesinin Ölçümü

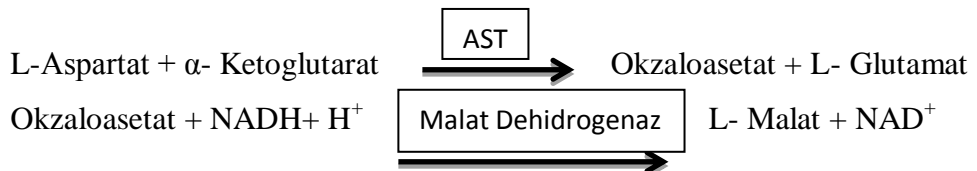
Plazmada enzim aktiviteleri aynı gün otoanalizörde (Autolab AMS) çalışıldı.

ALT, AST ve GGT düzeyleri, ilgili testin kitleri kullanılarak (Audit Diagnostics) enzimatik-kolorimetrik yöntemle belirlendi.

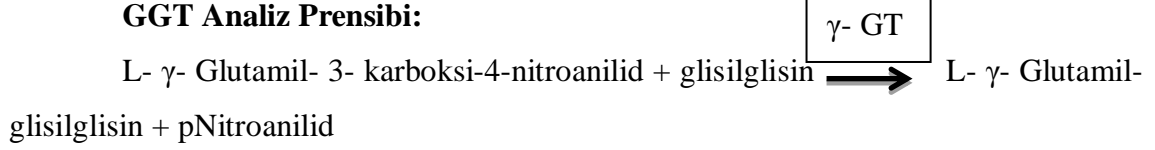
ALT Analiz Prensibi:



AST Analiz Prensibi:



GGT Analiz Prensi:



3.3.Histolojik Metotlar

Karaciğer ve böbrek dokuları, OMÜ Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı tarafından incelendi. Xylasine ve Ketamin anestezisi altında uyutulan ratlardan nekropsi ile alınan böbrek ve karaciğer örnekleri histolojik incelemeler için %10' luk formaldehid solusyonunda tespit edildi. Tespit işleminin sonrasında rutin histolojik doku takibi prosedürlerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5 μ 'luk kesitler alındıktan sonra normal histolojik yapının incelenmesi için Crossmon (1937)'in üçlü boyama tekniği kullanıldı.Elde edilen preparatlar Nikon E-600 araştırma mikroskobu altında ve Nikon digital-sight görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı.

3.4. İstatiksel Analizler

Elde edilen tüm veriler, SPSS 21 v. paket programı kullanılarak, Paired-Sample T testi ile istatistiksel olarak yorumlandı. Sonuçlar ortalama \pm std. deviation olarak sunuldu.

4. BULGULAR

4.1. Plazma Enzim Aktivitelerine İlişkin Bulgular

Tablo 4. Kontrol ve çalışma gruplarına ait plazma ALT, AST ve GGT aktiviteleri

GRUPLAR	PARAMETRELER (U/L)			
	N	ALT	AST	GGT
A.K.A	7	172,571 ± 21,306 ^a	124,142 ± 15,678	3,000 ± 0,816
AK.A + Vit. C	7	108,285 ± 34,335	118,000 ± 13,650	2,928 ± 0,590
A.K.A. + Vit. E	7	48,571 ± 8,100	112,000 ± 25,468	2,332 ± 0,942
A.K.A + Vit. C + Vit. E	7	51,571 ± 17,539	123,428 ± 22,721	2,642 ± 0,626
Vitamin C	7	68,428 ± 27,861	115,142 ± 19,878	2,428 ± 0,786
Vitamin E	7	69,714 ± 30,120	125,571 ± 22,633	3,214 ± 0,466
Kontrol	7	66,857 ± 26,585	117,000 ± 21,393	2,571 ± 0,786

^a: p<0,001, A.K.A: Amoksisilin Klavulanik Asit, Vit C: Vitamin C, Vit. E: Vitamin E. (Veriler mean ± std. deviation olarak hesaplandı)

4.2. Böbrek Dokusuna İlişkin Bulgular

Tablo 5. Böbrek dokusu kontrol ve çalışma gruplarına ait MDA, GSH, CAT, vitamin C ve total protein düzeyleri

GRUPLAR	BÖBREK DOKUSU -PARAMETRELER					
	n	MDA (µmol/g doku)	GSH (µmol/g doku)	CAT (k/g doku)	Vitamin C (mg/100 g doku)	Total Protein (%g)
A.K.A	7	94,858 ± 14,938 ^c	0,412 ± 0,099	2,760 ± 0,300 ^b	702,570 ± 136,52 ^a	0,203 ± 0,027
AK.A + Vit. C	7	69,007 ± 19,263	0,405 ± 0,055 ^c	2,118 ± 0,797	1144 ± 168,81	0,222 ± 0,064
A.K.A. + Vit. E	7	74,740 ± 14,230	0,504 ± 0,115	1,960 ± 0,440	1210,42 ± 182,72	0,211 ± 0,046
A.K.A + Vit. C + Vit. E	7	67,261 ± 15,865	0,411 ± 0,099 ^c	1,670 ± 0,204 ^b	1114,85 ± 168,44	0,221 ± 0,084
Vitamin C	7	78,524 ± 15,841	0,502 ± 0,099	2,121 ± 0,653	1250 ± 181,23	0,210 ± 0,053
Vitamin E	7	81,390 ± 7,773	0,462 ± 0,069	2,348 ± 0,204 ^c	1157,71 ± 152,42	0,188 ± 0,067
Kontrol	7	73,831 ± 13,367	0,521 ± 0,114	2,157 ± 0,349	1179,028 ± 133,17	0,205 ± 0,031

^a: p<0,001, ^b: p<0,01, ^c: p<0,05.

4.3. Karaciğer Dokusuna İlişkin Bulgular

Tablo 6. Karaciğer dokusu kontrol ve çalışma gruplarına ait MDA, GSH, CAT, vitamin C ve total protein düzeyleri

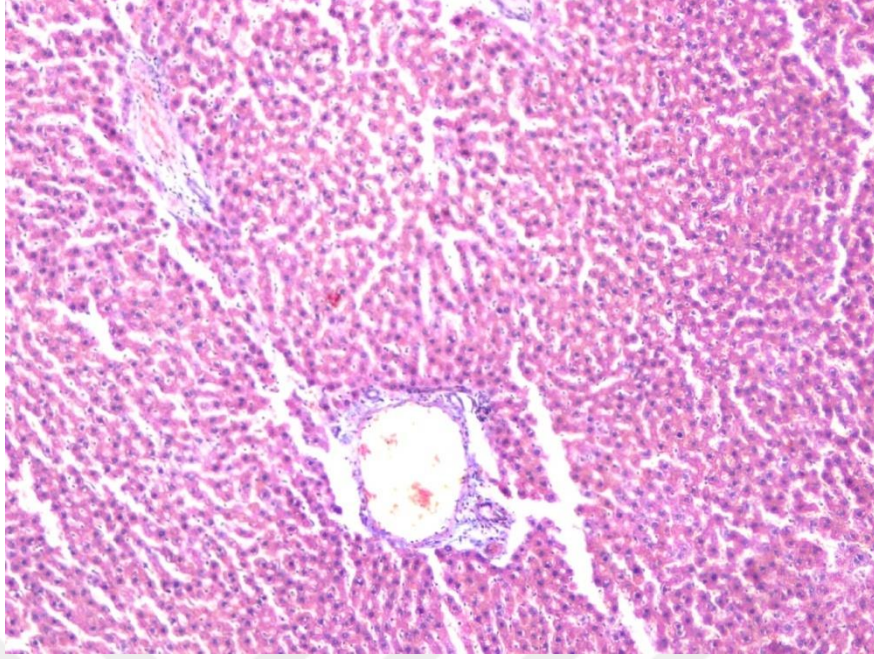
GRUPLAR	KARACİĞER DOKUSU –PARAMETRELER					
	n	MDA ($\mu\text{mol/g}$ doku)	GSH ($\mu\text{mol/g}$ doku)	CAT (k/g doku)	Vitamin C ($\text{mg}/100$ g doku)	Total Protein (%g)
A.K.A	7	34,452 \pm 9,927 ^c	0,271 \pm 0,027	1,198 \pm 0,301 ^b	439,28 \pm 95,77 ^a	0,317 \pm 0,05 7
AK.A + Vit. C	7	33,305 \pm 6,177 ^b	0,245 \pm 0,043	1,468 \pm 0,906 ^b	565,14 \pm 129,82 ^b	0,322 \pm 0,09 6
A.K.A. + Vit. E	7	33,122 \pm 8,570 ^c	0,222 \pm 0,049	2,700 \pm 1,057	792,57 \pm 160,07	0,290 \pm 0,05 1
A.K.A +Vit. C +Vit. E	7	31,302 \pm 3,915 ^b	0,177 \pm 0,047 ^b	3,388 \pm 1,186	1007,42 \pm 196,26	0,247 \pm 0,05 9 ^a
Vitamin C	7	30,867 \pm 5,726 ^c	0,211 \pm 0,040	3,220 \pm 1,143	957,71 \pm 144,11	0,271 \pm 0,02 6
Vitamin E	7	33,122 \pm 5,922 ^b	0,221 \pm 0,047	1,804 \pm 0,777 ^c	918,00 \pm 131,27	0,328 \pm 0,07 7
Kontrol	7	23,130 \pm 6,473	0,252 \pm 0,041	3,641 \pm 1,474	864,57 \pm 174,78	0,338 \pm 0,08 1

^a: p<0,001, ^b: p<0,01, ^c: p<0,05. Veriler mean \pm std. deviation olarak hesaplandı.

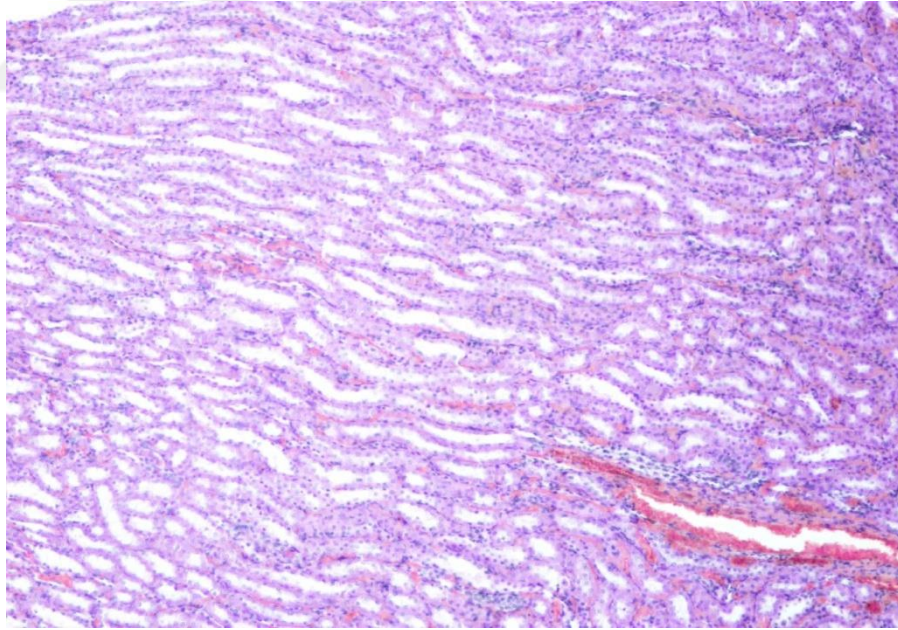
4.4. Histopatolojik Bulgular

Böbrek: Genel olarak böbrek dokuları değerlendirildiğinde, organın bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrili olduğu gözlemlendi. Korteks ve medulla bölgeleri ve bu bölgelerdeki oluşumlar ayrıntılı olarak incelendiğinde gruplar arasında çok belirgin farklılıklara rastlanılmadı. Ancak 2., 4. ve 6. gruplardaki ratların böbrek tubullerinin lumenlerinde hafif genişlemeler ve tubul epitellerinde hafif dejenerasyonların olduğu belirlendi.

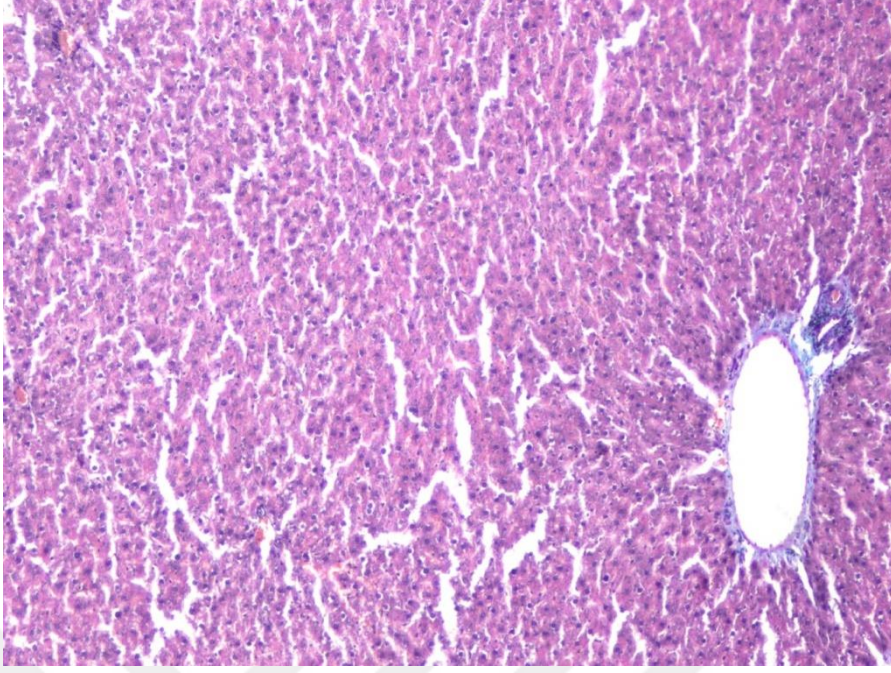
Karaciğer: Karaciğerin fibröz bir kapsülle sarılı olduğu gözlemlenmiştir. *Vena interlobularis*, *arteria hepatica* ve *duktus biliferus*'dan oluşan portal alanlar net olarak görülmekteydi. Karaciğer epitel hücrelerinin oluşturduğu remark kordon yapıları ve bol miktarda sinüzoidler dokuya hakimdi. Gruplar kendi aralarında ayrıntılı olarak incelendiğinde gruplar arasında histolojik olarak çok belirgin farklılıklar gözlenmese de 1., 2. ve 6. gruptaki ratların karaciğer epitel hücrelerinde dejenerasyon ve piknotik görüntüler tespit edilmedi.



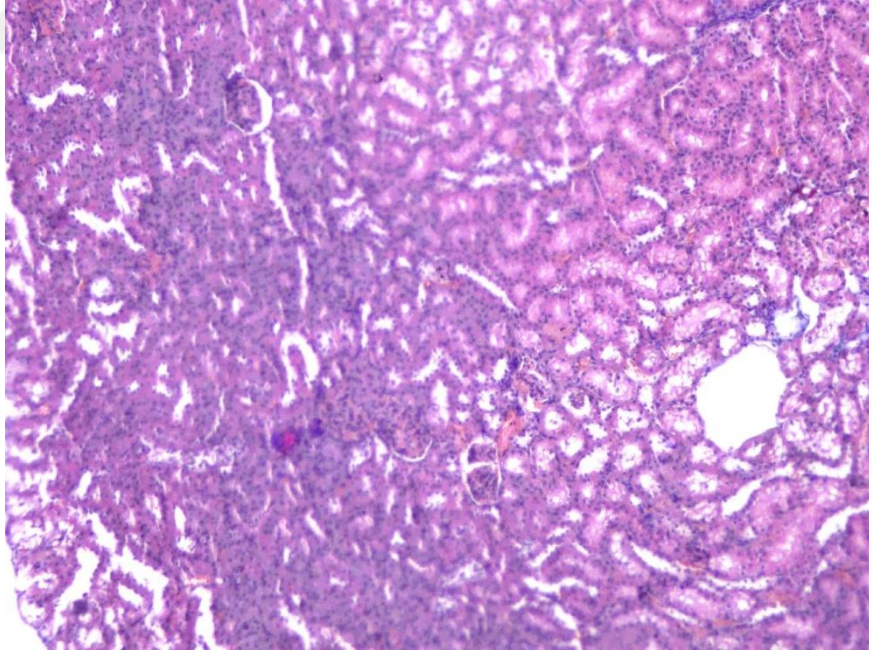
Şekil 14. Amoksisilin Klavulanik asit uygulanan grupta karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



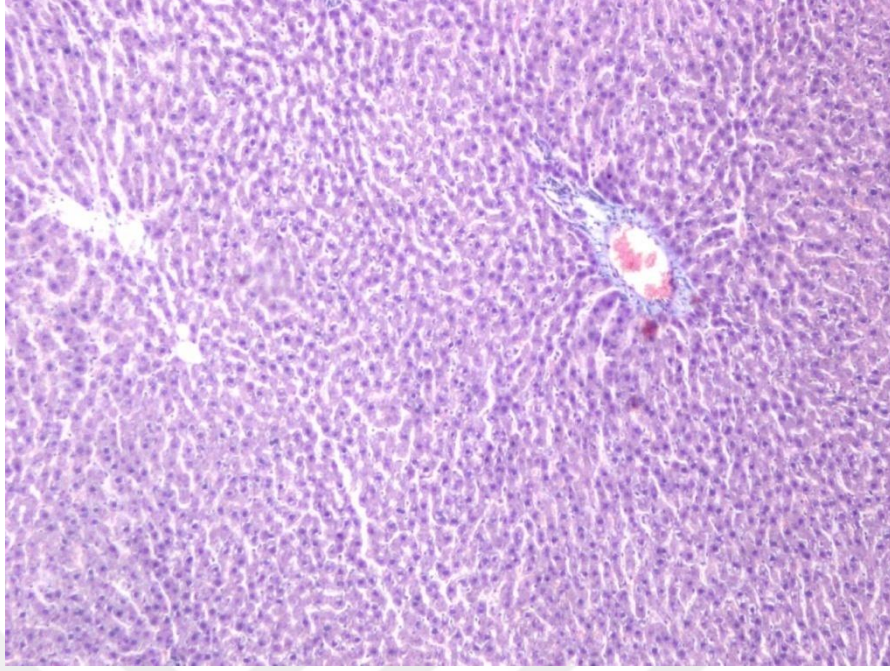
Şekil 15. Amoksisilin Klavulanik asit uygulanan grupta böbrek dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



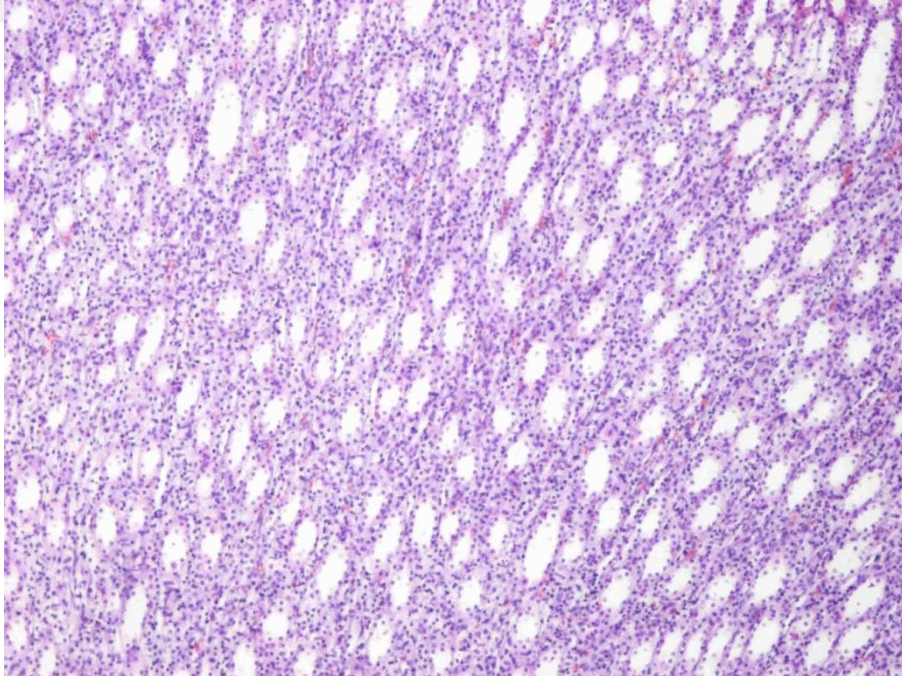
Şekil 16. Amoksisilin klavulanik asit+vitamin C uygulaması yapılan grupta karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



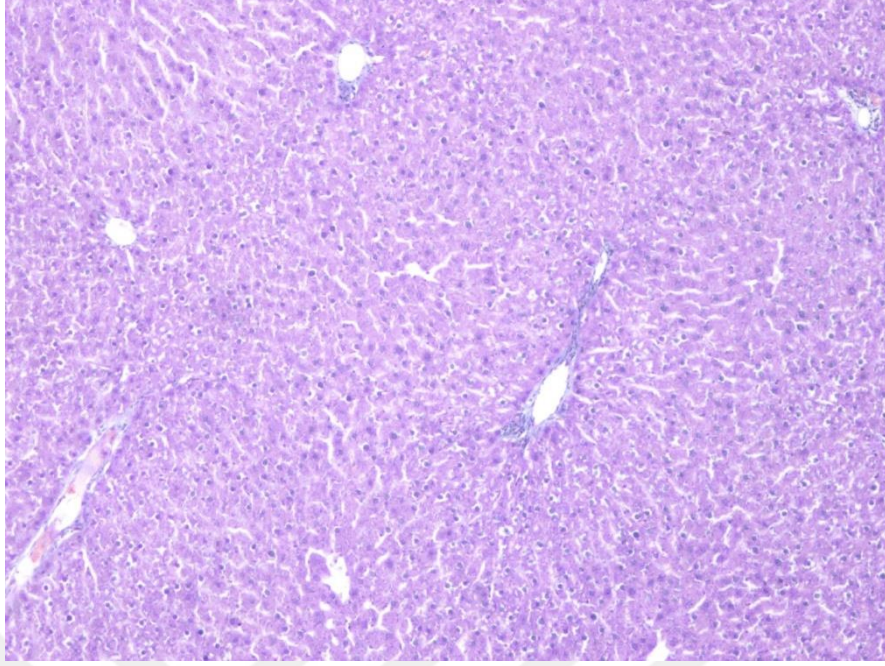
Şekil 17. Amoksisilin klavulanik asit+vitamin C uygulaması yapılan grupta böbrek dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



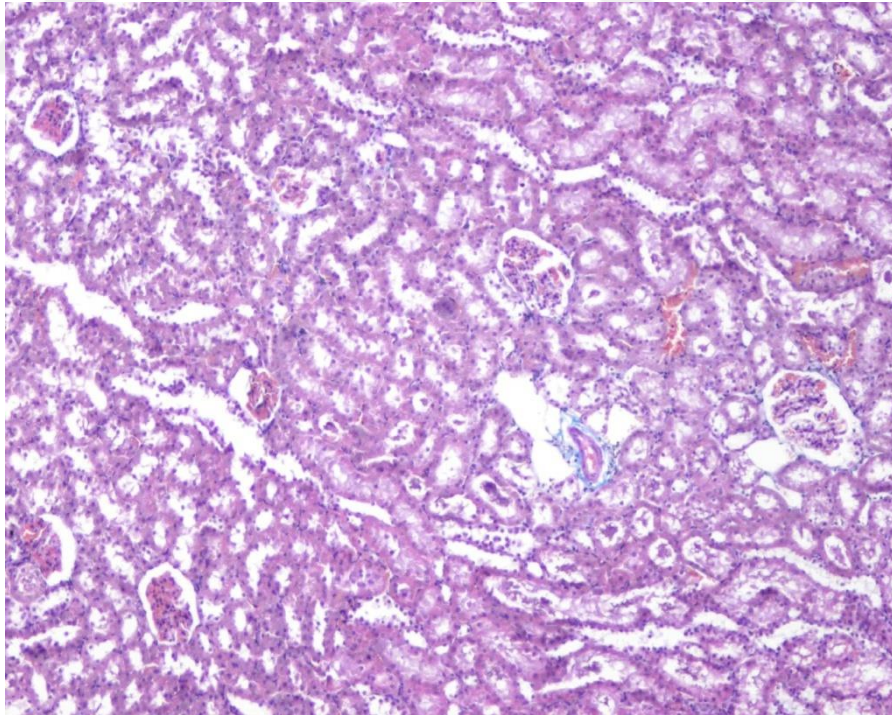
Şekil 18. Amoksisilin klavulanik asit + vitamin E uygulaması yapılan grupta karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



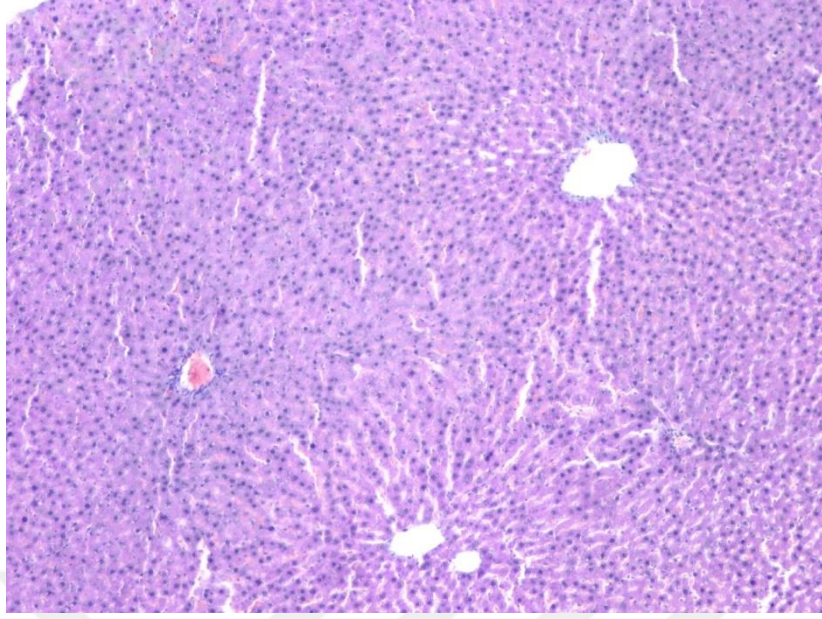
Şekil 19. Amoksisilin klavulanik asit + vitamin E uygulaması yapılan grupta böbrek dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



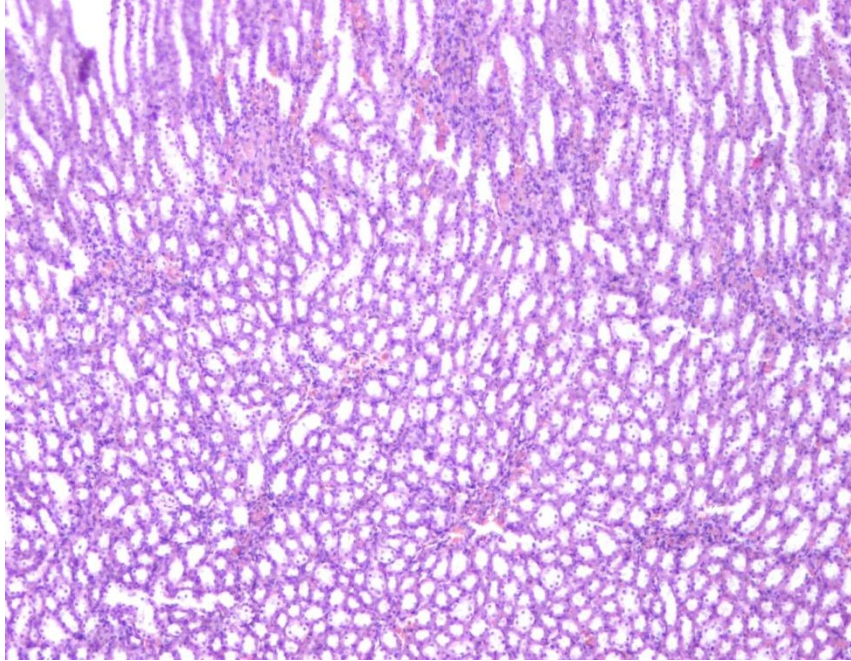
Şekil 20. Amoksisilin klavulanik asit vitamin C+ vitamin E uygulaması yapılan grupta karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



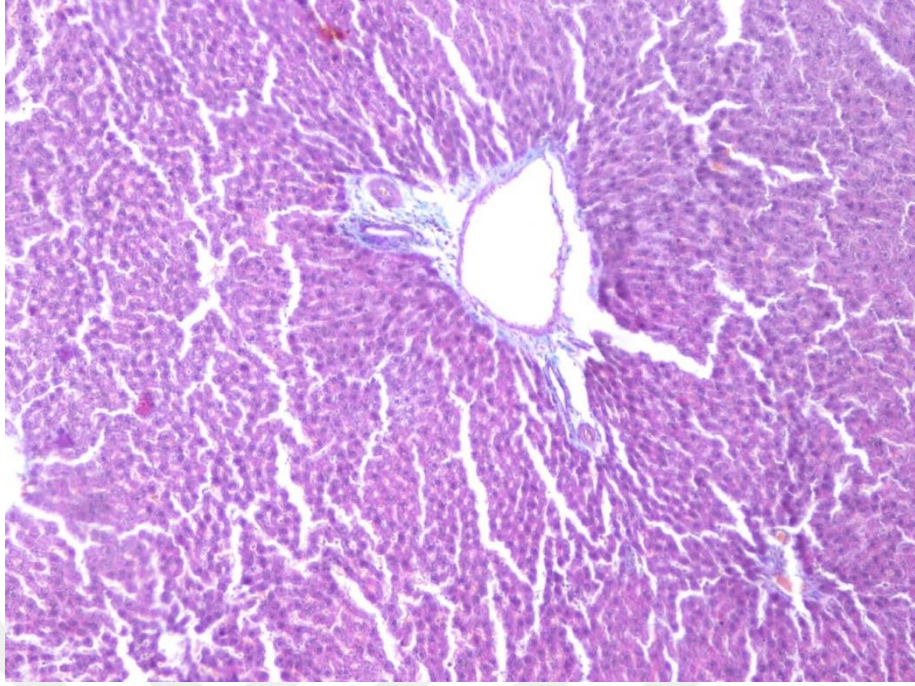
Şekil 21. Amoksisilin klavulanik asit vitamin C+ vitamin E uygulaması yapılan grupta böbrek dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



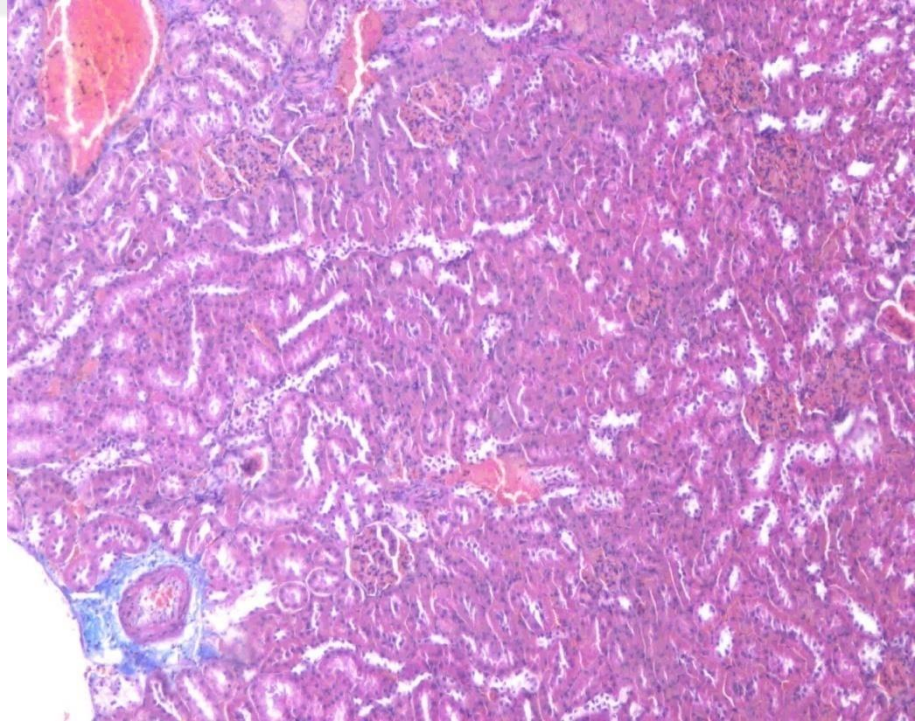
Şekil 22. Vitamin C uygulaması yapılan grupta karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



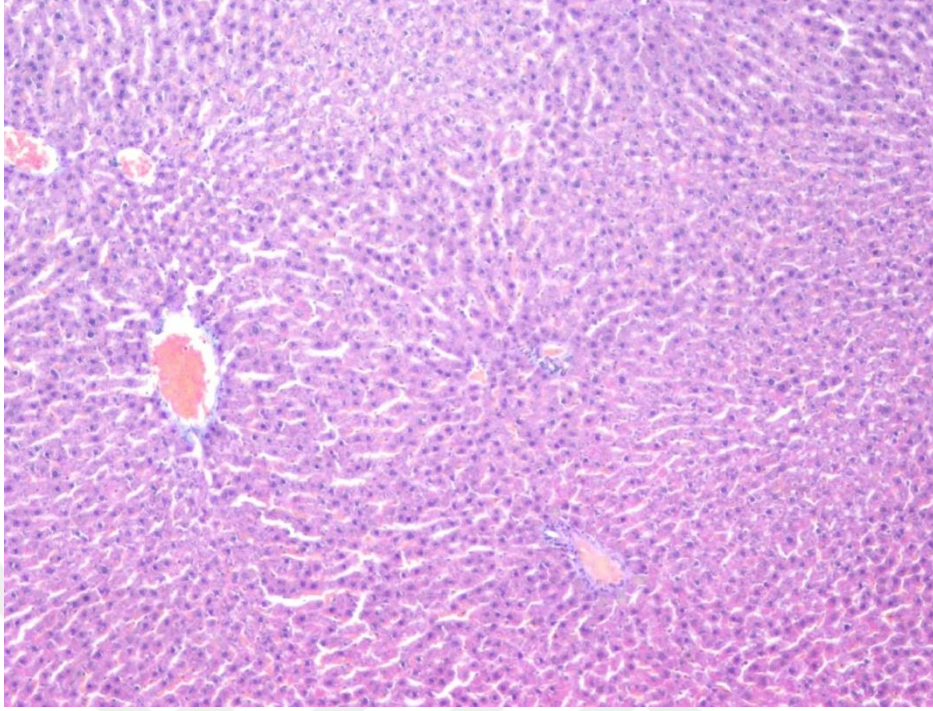
Şekil 23. Vitamin C uygulaması yapılan grupta böbrek dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



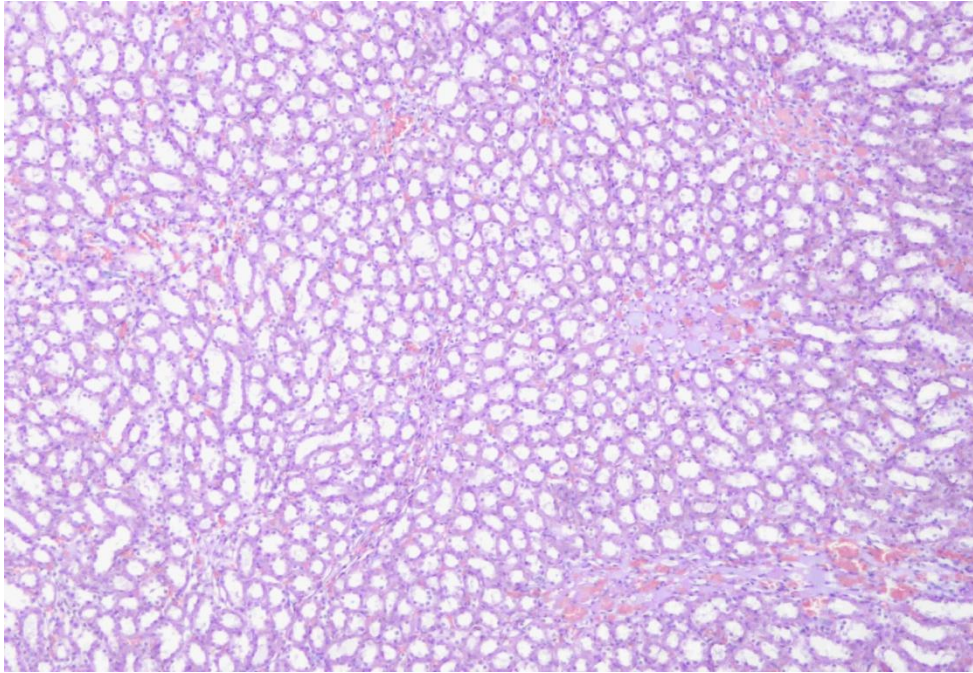
Şekil 24. Vitamin E uygulaması yapılan grupta karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



Şekil 25. Vitamin E uygulaması yapılan grupta böbrek dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



Şekil 26. Kontrol grubu karaciğer dokusunun histopatolojik görünümü (X10)



Şekil 27. Kontrol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü (X10)

5. TARTIŞMA

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardır. Antibiyotik kullanımına bağlı olarak görülen yan etkiler, ilaç tedavisinin kesilmesine gereksinim duyulmayacak derecede basit olabileceği gibi; yaşamı tehdit edebilecek kadar ciddi sonuçlar doğurabilir (Öncü, 2013). Ateş, ishal, alerji, anafaksi, anemi, lökopeni, trombositopeni, elektrolit anomalileri, nörotoksisite nefrotoksisite, kardiyotoksisite, hepatoksisite ve kas-iskelet toksisitesi antibiyotik kullanımına bağlı olarak görülen yan etkilerden bazılarıdır (Granowitz ve Brown., 2008).

Bir dönem vitamin-antibiyotik kombinasyonunun kullanım gerekliliği üzerinde özellikle durulmasına rağmen; bu durum günümüzde pek kabul gören bir anlayış değildir. Vitaminler çoğunlukla hastanın isteği üzerine verilirken, bazen de sadece reçetenin süsü olarak yazılmaktadır. Üstelik ülkemizde vitamin eksikliği olan hasta sayısı da çok azdır (Gökalp ve Mollaoğlu, 2003).

Yarı sentetik penisilinler klavulanik asit ile kombine edildiğinde sıklıkla hepatoksisiteye neden olmaktadır (Granowitz ve Brown., 2008). Amoksisilin klavulanik asit, karaciğer hasarı ile ilişkili olan antibiyotiklerden biridir. Karaciğer hasarı, genellikle kolestatik hepatit olarak ortaya çıkar; karışık kolestatik ve hepatosellüler patternler de oluşabilir. Başlaması, genellikle tedavinin başlamasının ardından birkaç günden birkaç haftaya kadar gecikebilir (ortalama olarak ilk ilaç alınımının ardından 8-9 gün sonra, 1-48 gün aralığında). Aynı zamanda ilaç alınımının sonlandırılmasından sonra, 8 haftaya kadar olan süreçte de oluşabilir (Salvo ve ark., 2009). Lucena ve ark. (2006)'nın yaptığı bir çalışmada genç bireylerde kısa süreli amoksisilin klavulanik asit tedavisinde sitolitik hasar görülürken, yaşlı bireylerde daha uzun süreli tedavide kolestatik/karışık tip hasar gözlemlenmiştir. İlerleyen yaşa bağlı olarak görülen yavaşlamış ilaç eliminasyonu ve buna eşlik eden vücutta tutulumu, dolayısıyla safra kanalı hücrelerinin kanalikül salgısı yoluyla ilaç metabolitlerine uzun süre maruz kalması, haptenik kanal hücresi proteinleri ve periduktural enflamasyon reaksiyonuna karşı bir immün yanıtı tetiklemiş olabilir (Kaplowitz, 2005). Genel olarak bakıldığında, ilerlemiş yaş ve erkek cinsiyeti amoksisilin klavulanik asit uyarımlı karaciğer hasarında kabul görmüş iki risk faktörüdür (Berg ve Hahn, 2001; Nathani ve ark., 1998; Hautekeete ve ark., 1995). İlerlemiş yaş ve uzun süreli tedavi (>10gün) kombinasyonunda akut karaciğer hasarı riskinin geliştiği görülmüştür (>1/1000 hasta)

(Garcia Rodriguez ve ark., 1996; Larrey ve ark., 1992). Bununla birlikte Thomson ve ark., (1995)'nin yaptığı çalışmada tedavi süresi ile hepatit arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Amoksisilin klavulanik asit uyarımlı hepatitin mekanizması henüz bilinmemesine rağmen; sık görülen aşırı duyarlılık belirtileri (cilt döküntüsü, hipereozinofili gibi), insan lökosit antijen (HLA) haplotipleri ile ilgili immunoalerjik mekanizmayı düşündürmektedir (Hautekeete ve ark., 1999).

Bakterisidal antibiyotikler bir yandan bakterileri öldürürken bir yandan da zararlı reaktif türlerin üretimini uyarırlar. Bakterisidal antibiyotikler oksijen tüketimini artırarak bakteriyel redoks fizyolojisi üzerine önemli değişiklikler gösterirler. Farklı sınıflardaki bakterisidal antibiyotiklerin, ilaç-hedef etkileşimi gözetilmeksizin hücre ölümünde katkısı olan zararlı reaktif oksijen türlerini değişen seviyelerde ürettiği ileri sürülmüştür. Dwyer ve ark., (2014), antibiyotiklerin dinamik olarak hücre solunumu değiştirdiğini ve intraselüler hidrojen peroksidin ölümcül seviyelere ulaşmasını indüklediğini belirtmişlerdir. Moleküler oksijen varlığında yüksek ölçüde hassas olan, oksidatif stres savunma proteinlerini de içeren antioksidanlar, antibiyotikler tarafından bakterilerin öldürülmesi üzerine azaltıcı etki göstermiştir. Kohanski ve ark. (2007)'nin yaptıkları çalışmada 3 ana sınıf bakterisidal antibiyotiğin (aminoglikozit, kinolon, β -laktam), dahili demir-sülfür kümelerini kullanarak, Fenton tepkimesi yoluyla hidroksil radikalinin lethal doz üretimini uyardığını ve hücre ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, bakterisidal antibiyotiklerin reaktif oksijen türleri (ROS)'ni içeren ortak bir mekanizmayla hücreleri öldürdüğüne dair fikirler ileri sürülmüştür. İki farklı araştırma grubu bu hipotezi test etmek için; oksijen (veya nitrat) varlığında ve yokluğunda benzer öldürücü etki gösteren, kinolon, laktam ve aminoglikozid türü antibiyotiklerle çeşitli deneyler yapmışlardır. Liu ve Imlay (2013)'ün yaptığı çalışmada, antibiyotik tedavisinin *E. coli*'de hidrojen peroksit oluşumunu hızlandırmadığını ve ölümcül hasarın oluşması için esansiyel reaktant olan, intraselüler serbest demir miktarını yükseltmediğini belirtmişlerdir. Letalitenin daha büyük olasılıkla hücre duvarı bütünlüğünün, protein sentezinin ve DNA replikasyonunun doğrudan inhibisyonu nedeniyle gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Keren ve ark. (2013), antibiyotik etkinliğini aerobik ve anaerobik koşullar altında incelemişlerdir. Antibiyotiklerin üretimini arttırdığı ileri sürülen ROS miktarı,

hidroksifenil fluoresein (HPF) boyasının artmış floresan miktarı ile ölçülmüştür. Aerobik veya anaerobik koşullar altında çeşitli antibiyotikler ile tedavide bakterilerin sağkalımları üzerinde esasen hiçbir fark olmadığı belirtilmiştir. Bir ROS söndürücüsü olan tiyoürenin, düşük konsantrasyonlardaki antibiyotik varlığında hücreleri koruduğu, bu etkinin anerobik koşullarda da kendini gösterdiği bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki antibiyotik varlığında ise bu etkinin ortadan kaybolduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar bakterisidal antibiyotiklerle reaktif oksijen türlerinin ortak bir etki mekanizmasının olduğu fikrini desteklemektedir.

Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelen en önemli üründür. Yüksek derecede toksik olan bu aldehit molekülü, oksidatif hasarın biyobelirteçi olarak kabul edilmektedir. Genotoksik, mutajenik ve karsinojenik özellikler gösteren MDA, birçok fizyolojik mekanizmayı bozabilmektedir (Del Rio ve ark., 2005).

Böbrek dokusu MDA düzeyi kontrol grubuna kıyasla, sadece amoksisilin klavulanik asit uygulanan 1. grupta önemli bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Amoksisilin klavulanik asit + C vitamini, amoksisilin klavulanik asit + C vitamini+ E vitamini verilen gruplarda da MDA düzeyinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu fakat istatistiksel olarak önemsiz olduğu saptanmıştır. 3., 5. ve 6. grupta da MDA düzeylerinde istatistiki açıdan önemsiz artışlar gözlenmiştir. Böbrek dokusunda MDA düzeylerine bakıldığında, amoksisilin klavulanik asit kullanımının anlamlı derecede ($p<0,05$) arttırdığı; amoksisilin klavulanik asit + vitamin C, amoksisilin klavulanik asit + vitamin C + vitamin E kullanımının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmasa da MDA düzeylerinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Karaciğer dokusu MDA düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna göre diğer uygulama gruplarının tamamında istatistiksel olarak önemli miktarda artış gözlenmiştir. Bu artışlardan en fazlası amoksisilin klavulanik asit verilen grupta saptandı.

Böbrek dokusu GSH düzeyleri incelendiğinde; amoksisilin klavulanik asit + C vitamini uygulanan 2. grupta ve amoksisilin klavulanik asit + C vitamini + E vitamini uygulanan 4. grupta kontrol grubuna kıyasla GSH düzeylerinde önemli miktarda azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Diğer gruplarda da GSH düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük olmakla beraber, istatistiksel olarak önem saptanmamıştır. Karaciğer dokusu GSH düzeylerinde sadece amoksisilin klavulanik asit + C vitamini + E vitamini

uygulanan 4. grupta kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,01$). Diğer uygulama gruplarında ölçülen değerlerde gözlenen değişimler istatistik olarak herhangi bir önem arz etmemektedir.

Kadkhodae ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmada erkek Sprague-Dawley ratlarda aminoglikozit sınıfı bir antibiyotik olan gentamisin ile nefrotoksisite oluşturulmuş olup; gentamisin + vitamin C'nin birlikte verildiği grupta, renal doku GSH değerleri üzerinde belirgin bir etki gözlemlenmemiştir. Gentamisin + vitamin E verilen grupta, vitamin E'nin gentamisin kaynaklı GSH düzeyindeki azalmayı önlediği, gentamisin + vitamin C + vitamin E grubunda ise GSH seviyelerinin korunduğu bildirilmiştir. Vitamin C ve E kombinasyonunun orta düzey dozlarda gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede, böbrek korunması üzerine yararlı etkileri olduğu belirtilmiştir.

Olayinka ve Olukowade (2010)'nin yaptığı çalışmada 2 gruba ayrılan 20 tane erkek Wistar albino ratın kontrol grubuna ilaç verilmezken; 2. gruptaki ratlara günde iki kez olmak üzere 7 gün boyunca amoksisilin/klavulanik asit (Augmentin 625®) verilmiştir. İlaç uygulanan grupta plazma AST ve ALT değerleri kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %42,6 ve %44,4 oranında artış göstermiştir. Bununla birlikte ilaç uygulaması, karaciğer glutatyon (GSH), C vitamini değerlerinde sırasıyla %51 ve %44 oranında belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Hepatik CAT aktivitesinde de %33'lük bir azalma gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda ratlarda amoksisilin/klavulanik asit (Augmentin 625®)'in akuz dozu enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemi değiştirerek oksidatif stresi uyardığı belirtilmiştir.

El-Sherbiny ve ark. (2009)'nin erkek Sprague-Dawley ratlarda yaptığı çalışmada, amoksisilin klavulanik asit (Co-amoxyclov) verilen grupta, fizyolojik tuzlu su verilen kontrol grubuna göre serum ALT ve AST değerlerinin daha yüksek olduğu, hepatik GSH düzeyinin daha düşük, hepatik MDA düzeyinin ise daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Böbrek dokusu CAT aktiviteleri; kontrole kıyasla, amoksisilin klavulanik asit uygulanan 1. grupta önemli bir artış gösterdi ($p<0,01$). Amoksisilin klavulanik asit + C vitamini + E vitamini uygulanan 4. grupta ise kontrole göre azalma gösterdi ($p<0,01$). E vitamini verilen 6. grupta da kontrole kıyasla CAT düzeylerinde önemli bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Diğer gruplarda gözlenen CAT aktivitelerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamsızdı. Karaciğer dokusu CAT aktiviteleri kontrol grubuna göre

diğer bütün gruplarda azalmış olup, bu azalmalar 1., 2. grupta ($p<0,01$) ve 6. grupta ($p<0,05$) istatistik olarak bir önem arz ederken diğer gruplarda herhangi bir önem gözlenmedi.

Değişmiş CAT aktivitesi birçok hastalıkta görülebilmektedir. Diabetes mellitus (DM)'da, malign hastalıklarda, down sendromunda, nefrotoksisitenin deneysel koşullarında ve yenilenmekte olan dokularda azalmış katalaz aktivitesi gösterilmiştir (Djordjević ve ark., 2000).

Böbrek dokusu vitamin C miktarı; kontrol grubuna kıyasla, amoksisilin klavulanik asit verilen 1. grupta önemli derecede düşük bulundu ($p<0,001$). Diğer gruplarda saptanan miktarlarda gözlenen azalmalar ve artmalarda istatistiki bakımdan bir önem gözlenmedi. Karaciğer dokusu C vitamini miktarlarında yapılan ölçümlerde 1. ve 2. grupta saptanan azalmalar istatistik olarak bir önem arz ederken (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,01$) diğer gruplarda gözlenen değişimlerin istatistiki açıdan herhangi bir önem arz etmedi.

Çalışmalar hücre içi C vitamini redoks durumunun intraselüler GSH düzeyi tarafından kontrol edildiğini göstermiştir. C vitamini antioksidan savunmanın birinci basamağında olan serbest radikal oksidasyonuna karşı çok duyarlı bir bileşiktir. Kimyasal özellikleri sayesinde iyi bir serbest radikal temizleyicisidir (Olayinka ve Olukowade, 2010). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, C vitamininin hem endojen lipit peroksidasyonunun ölçümüyle hem de ekzojen oksitleyici maddelerin uygulanmasıyla indüklenen lipit peroksidasyonu üzerindeki koruyucu etkisi gösterilmiştir. Endojen lipit peroksidasyonunun ölçüldüğü çoğu çalışmalarda C vitamininin peroksidasyon miktarını düşürdüğü gözlenirken (Barja ve ark., 1994; Tanaka ve ark., 1997), bazı çalışmalarda bu durum gözlemlenmemiştir (Cadenas ve ark., 1996). C vitamini sentezleyemeyen guinea pig ve osteodistrofi sendromlu (ODS) ratlarda yapılan çalışmalarda karbontetraklorür (Kunert ve Tappel, 1983) ve endotoksin (Cadenas ve ark., 1998) ile uyarılan endojen lipit peroksidasyonunda C vitamininin koruyucu etkisi gözlemlenmiştir. Sigara dumanına maruz kalan ratlarda da C vitaminin koruyucu etkisi görülmüştür (Helen ve Vijayammal, 1997). Dillard ve ark. (1982)'nin yaptığı çalışmada okside edici ajan olarak allokstan kullanıldığında, C vitamini takviyesinin ratlarda oksidan stresi artırdığı bildirilmiştir. Kang ve ark., (1998), askorbik asidin okside edici ajan parakuattan önce uygulanmasının koruyucu etki

gösterdiğini, parakuat verilmesinden sonra C vitamini uygulanmasının oksidatif stresi artırdığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar askorbik asidin konsantrasyonuna, uygulanan okside edici ajana ve uygulama şekline bağlı olarak oksidan veya prooksidan olarak görev yaptığını göstermektedir.

Daş (2009)'ın yaptığı çalışmada, enzootik pneumonili kuzulara antibiyotik olarak %10' luk enrofloksasin çözeltisi ve amoksisilin parenteral olarak verilmiştir. Ayrıca bir gruba antibiyotiğe ilave olarak E vitamini parenteral olarak uygulanmış olup; bu grupta ilave E vitamini tedavisinin total antioksidan kapasite seviyesi üzerine herhangi bir değişikliğe yol açmadığı hatta total antioksidan kapasite düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir.

Acharya ve ark. (2012), Wistar albino ratlarda gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede oksidatif stresi ve C vitamininin önleyici etkilerini araştırmışlardır. Gentamisin ile birlikte, C vitamini uygulamasının, C vitamininin antioksidan etkisi sayesinde nefrotoksisitesiyi önemli ölçüde engellediğini belirtmişlerdir.

E vitamini serbest radikal zincir reaksiyonlarını önlemek için oksijen radikalleriyle reaksiyona giren ana endojen antioksidandır. E vitamini gibi endojen antioksidanların miktarı serbest radikallerle etkileşimleri sonucu azalmaktadır. Vitamin C'nin E vitamininin geri kazanılması yönünde katkısı bulunduğu için; C vitamini uygulaması E vitamini depolarının dolmasına yardımcı olur (Paolini ve ark., 1999).

Sezikli ve ark. (2012)'nin yaptığı çalışmada *Helicobacter pylori*'nin standart üçlü tedavisine (proton pompa inhibitörü + klaritromisin + amoksisilin) ek olarak, tedaviye C ve E vitamininin eklenmesiyle *H. pylori*'nin eradikasyon oranının artırdığını; bunun nedeni olarak da vitaminlerin gastrik mukozada oksidatif stesi azaltarak antibiyotik etkinliğini artırdığını ileri sürmüşlerdir.

Böbrek dokusu total protein miktarları incelendiğinde; kontrole göre 1. ve 6. gruplarda azalma gözlenirken, 2., 3., 4. ve 5. gruplarda artış gözlenmiştir. Fakat bu azalma ve artışlarda istatistiksel olarak bir önem saptanmadı. Karaciğer dokusu total protein miktarları sadece amoksisilin klavulanik asit + C vitamini + E vitamini uygulanan 4. grupta kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde ($p < 0,001$) azalmıştır. Diğer gruplarda da total protein miktarı azalmış olup, bu azalmalar istatistiksel olarak önemli görülmedi.

Plazma enzim düzeyleri incelendiğinde; sadece amoksisilin klavulanik asit verilen 1. grupta ALT enzim düzeyi, kontrol grubuna göre önemli düzeyde bir artış gösterdi ($p<0,001$). Amoksisilin klavulanik asit + C vitamini uygulanan 2. gruptaki ALT enzim düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği fakat istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptandı. Amoksisilin Klavulanik asit + E vitamini uygulanan 3. grupta ALT enzim düzeyi kontrol grubuna göre azalma göstermesine rağmen istatistiksel olarak önem arz etmedi. Amoksisilin klavulanik asit + C vitamini + E vitamininin kombine kullanıldığı 4. grupta da kontrol grubuna göre ALT düzeylerinde azalma görülsede istatistiksel olarak önemsizdi. Sadece C vitamini ve sadece E vitamini verilen 5. ve 6. gruplarda ALT düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olmayan bir artış gözlemlendi.

AST enzim düzeylerine bakıldığında, kontrol grubuna göre hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi. 1., 2., 4. ve 6. grupta kontrol grubuna göre AST düzeylerinde bir miktar artış gözlemlendi. GGT enzim düzeyleri de kontrol grubu referans alındığında hiçbir grupta istatistiksel olarak önem arz etmedi. AST enzim düzeylerinde olduğu gibi, GGT enzim düzeyleri de 1., 2., 4. ve 6. grupta kontrole kıyasla daha yüksek olduğu saptandı. Yaptığımız çalışmada amoksisilin klavulanik asit, amoksisilin klavulanik asit + C vitamini ve Vitamin E verilen grupların plazma ALT, AST ve GGT değerlerinin tamamı, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. Amoksisilin klavulanik asit + E vitamini verilen grubun plazma ALT, AST ve GGT değerlerinin tamamı yine aynı şekilde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur.

İlaç uygulaması kontrol grubuna kıyasla, belirgin bir şekilde plazma ALT ($p<0.001$) düzeylerini artırmıştır. Bu artış AST ve GGT düzeylerinde de gözlemlenmiş olup istatistiksel olarak önem bulunamamıştır. Antibiyotik uygulanmasıyla plazmada bu enzimlerin yükselmesi hasar gören dokuların enzimlerinin salınmasının sonucu olabilir. Plazma ALT ve AST düzeylerinin artması, hepatositlerin nekroze olduğu koşullarda görülmektedir (Macfarlane ve ark., 2000). GGT; kolestaz, tıkanma sarılığı, siroz, primer biliyer siroz, akut veya kronik hepatit durumlarında artış gösterir (Tuzcu, 2003).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İstatiksel açıdan, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olan sonuçlar değerlendirildiğinde;

1. Amoksisilin klavulanik asit kullanımının plazmada ALT miktarında artışa sebep olduğu,
2. Böbrek dokusunda; amoksisilin klavulanik asit kullanımının doku MDA düzeyinde artışa neden olduğu,
3. Böbrek dokusunda; amoksisilin klavulanik asit + vitamin C + vitamin E kullanımının CAT aktivitesinde azalmaya neden olduğu,
4. Böbrek dokusunda; amoksisilin klavulanik asit uygulanan ve vitamin E uygulanan gruplarda CAT aktivitesinde artış meydana geldiği,
5. Böbrek dokusunda; amoksisilin klavulanik asit kullanımının C vitamini düzeyini anlamlı bir şekilde azalttığı,
6. Karaciğer dokusunda; bütün gruplarda kontrole kıyasla MDA düzeyinde anlamlı bir artış olduğu,
7. Karaciğer dokusunda; amoksisilin klavulanik asit + vitamin C + vitamin E kullanımının GSH düzeylerinde belirgin bir azalmaya neden olduğu,
8. Karaciğer dokusunda; amoksisilin klavulanik asit, amoksisilin klavulanik asit+ vitamin C ve sadece E vitamini verilen grupların CAT aktivitesinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu,
9. Karaciğer dokusunda; amoksisilin klavulanik asit, amoksisilin klavulanik asit + vitamin C uygulanan grupların C vitamini miktarlarında anlamlı bir azalma olduğu,
10. Karaciğer dokusunda; amoksisilin klavulanik asit + vitamin C + vitamin E uygulanan grubun total protein miktarında azalma olduğu gözlenmiştir.

Bu bağlamda sunulan tez çalışmasında, amoksisilin klavulanik asit kullanımında MDA, antioksidan maddeler, vitaminler ve enzim düzeylerinde gözlenen değişimler, karaciğer ve böbrek hücrelerinde oksidatif hasardan kaynaklı kısmen yıkımlanmanın şekillenmiş olabileceğini göstermektedir. Hastalığın radikal tedavisi süresince kullanılan ilaçlardan kaynaklanabilecek olası oksidatif hasarlara karşı antibiyotige ek olarak antioksidanların da kullanılmasının faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abouzari A, Fakheri BA. Reactive Oxygen Species: Generation, oxidative damage, and signal transduction. *Int J Life Sci* 2015; 9(5):3-17.
- Acharya C, Thakar H, Vajpeyee SK. A study of oxidative stress in gentamicin induced nephrotoxicity and effect of antioxidant vitamin C in Wistar rats. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol*. 2013; 3(1):14–20.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Enzymol* 1984; 105:121-126.
- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya, Mimoza Yayınları. 1995.
- Aktuğlu Y. Klinikte antibiotik kullanımı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayını, Final Ofset Matbaacılık, İstanbul, 1989; 126,201.
- Alpaslan C. Diş hekimliğinde sık kullanılan ilaçlar, Atlas Kitapçılık, 2. Baskı, 2008; 74-75.
- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 2014;5:84-95.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelle S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 1-31.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 1999; 77:658-665.
- Barja G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic Biol Med* 1994; 17:105–115.
- Berg P, Hahn EG. Hepatotoxic reactions induced by beta-lactamase inhibitors. *Eur J Med Res* 2001; 6:535-542.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J Biol Chem* 1997; 272(33):20313–20316.
- Bielski BH, Richter HW, Chan PC. Some properties of the ascorbate free radical. *Ann NY Acad Sci* 1975; 258:231–237.
- Birben E, Şahiner UM, Saçkesen C, Erzurum S, Kalaycı Ö. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* 2012; 5:9–19.

- Blakely SR, Slaughter L, Adkins J, Knight EV. Effects of β -carotene and retinyl palmitate on corn oil-induced superoxidodismutase and catalase in rats. *J Nutr* 1988; 118:152–158.
- Bradley-Whitman MA, Lovell MA. Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. *Arch Toxicol* 2015; 89:1035–1044.
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli, Çev. Ed. Süzer Ö, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009; 1133,1151-1152.
- Buettner GR, Moseley PL. EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate. *Free Radic Res Commun* 1993; 19:89–93.
- Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94(3):407-411.
- Burton GW, Doba T, Gabe EJ, Hughes L, Lee FL, Prasad L, Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *J Am Chem Soc* 1985; 107:7053–7065.
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chainbreaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 1983; 221:281–290.
- Cadenas S, Lertsiri S, Otsuka M, Barja G, Miyazawa T. Phospholipid hydroperoxides and lipid peroxidation in liver and plasma of ODS rats supplemented with α -tocopherol and ascorbic acid. *Free Radic Res* 1996; 24:485–493.
- Cadenas S, Rojas C, Barja G Endotoxin increases oxidative injury to proteins in guinea pig liver: protection by dietary vitamin C. *Pharmacol Toxicol* 1998; 82:11–18.
- Chatterjee IB, Majumder AK, Nandi BK, Subramanian N. Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1975; 258:24–47.
- Crossmon G. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved, *The Anatomical Record* 1937; 69(1):33-38.
- Cully D, Simon C, Langely G. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proceeding of the nutrition society* 2002; 16(1):137-143.
- Çakatay U, Kayalı R. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2006; 37:162-167.
- Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4:92-95.

- Çaylak E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Tıp Araştırmaları Dergisi 2011; 9(1);73-83.
- Das NP. Effects of vitamin A and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. J Neurochem 1989; 52:585–588.
- Daş A. Enzootik pneumoni besi kuzularında tedaviye selenyum ve vitamin E eklenmesinin total oksidan ile antioksidan seviyeleri üzerine etkilerinin araştırılması. Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Vet.) Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Yüksek Lisans Tezi, 2009; 30.
- Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. Journal of Biological Chemistry 1987; 262:9895–9901.
- Devasagayam TPA, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. JAPI 2004; 52:794-804.
- Dillard CJ, Kunert KJ, Tappel AL. Effects of vitamin E, ascorbic acid and mannitol on alloxan-induced lipid peroxidation in rats. Arch Biochem Biophys 1982; 216:204–212.
- Diplock AT, Rice-Evans AC, Burton RH. Is there a significant role of lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention? Cancer Res 1994; 54:1952-1956.
- Djordjević BV, Ćosić V, Pavlović D, Vlahović P, Jevtović T, Kocić G, Savić V. Does captopril change oxidative stress in puromycin aminonucleoside nephropathy Renal Fail 2000; 22:535-544.
- Dökmeci İ, Farmakoloji temel kavramlar. Nobel Tıp Kitabevleri, 2000; 863-865.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82:47-95.
- Dunn WA, Rettura G, Seifter E, England S. Carnitine biosynthesis from gamma-butyrobetaine and from exogenous protein-bound 6-N-trimethyl-L-lysine by the perfused guinea pig liver. Effect of ascorbate deficiency on the in situ activity of gamma-butyrobetaine hydroxylase. J Biol Chem 1984; 259:10764–10770.
- Durmuş AS, Ünsaldı E. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve kırık iyileşmesi. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 2005.
- Eaton JW, Ma M. Acatlasemia. In the metabolic bases of inherited disease. 7th ed. Scriver C, Beudet A, Sly W, Valle DL, Eds. New York, McGraw-Hill, 1995; 2371–2383.

- Eipper BA, Milgram SL, Husten EJ, Yun HY, Mains RE. Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. *Protein Sci* 1993; 2:489–497.
- Eipper BA, Stoffers DA, Mains RE. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu Rev Neurosci* 1992; 15:57– 85.
- El-Agamey A, Lowe GM, David J, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004; 430:37–48.
- Englard S, Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr* 1986; 6:365–406.
- Erenel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi* 1992; 3:243-250.
- Evans HM, Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 1922; 56:650–651.
- Everett S.A, Dennis MF, Patel KB, Maddix S, Kundu SC, Wilson RL. Scavenging of nitrogen dioxide; thiyl and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant β -carotene. *J Biol Chem* 1996; 271:3988–3994.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18:872–879.
- Food and Nutrition Board Institute of Medicine. Dietary reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. National Academy Press, Washington, DC, 2000; p. 529.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47(5):412.
- El-Sherbiny GA, Ashraf Taye A, Abdel-Raheem IT. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of hepatotoxicity caused by amoxicillin-clavulanic acid in rats. *Annals of Hepatology* 2009; 8(2):134-14.
- Garcia Rodriguez LA, Stricker BH, Zimmerman HJ. Risk of acute liver injury associated with the combination of amoxicillin and clavulanic acid. *Arch Int Med* 1996; 156:1327-1332.
- Gardner PR, Fridovich I. Superoxide sensitivity of the Escherichia coli 6-phosphogluconate dehydratase. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:1478–1483.
- George J. Ascorbic acid concentrations in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Clinica Chimica Acta* 2003; 335:39–47.

- Gökalp O, Mollaoğlu H. Uygunuz ila kullanımı. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2003; 10(2):17-20.
- Gönenç S. Egzersiz ve oksidan stres. BESBD 1997;2(4):26-38.
- Granowitz EV, Brown RB. Antibiotic Adverse Reactions and Drug Interactions. Crit Care Clin 2008; 24:421–442.
- Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Garcia GSSC, Pomblum VJ, Rocha JBT, Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quim Nova 2009; 32(1):169-174.
- Guo RF, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis. Antioxi Redox Signal 2007; 9:1991-2002.
- Hackbarth S, Schlothauer J, Preuß A, Röder B. New insights to primary photodynamic effects—singlet oxygen kinetics in living cells. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2010; 98(3):173–179.
- Hallberg L. Iron and vitamins. Bibl Nutr Dieta 1995; 52:20–29.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57(5):715–724.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Second Ed. Clarendon Press. Oxford.1996; 237-245.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans 2007; 35:1147-1150.
- Hautekeete ML, Brenard R, Horsmans Y, Henriond J, Verbist L, Derued G, Druetz P, Omar M, Kockx M, Hubens H, Haber I, Rahier J, Geubel AP. Liver injury related to amoxicillin-clavulanic acid: interlobular bile-duct lesions and extrahepatic manifestations. J Hepatol 1995; 22:71-77.
- Hautekeete ML, Horsmans Y, van Waeyenberge C, Demanet C, Henrion J, Verbist L, Brenard R, Sempoux C, Michielsen PP, Yap PSH, Rahier J, Geubel AP. HLA association of amoxicillin-clavulanate-induced hepatitis. Gastroenterology 1999; 117:1181-1186.
- Helen A, Vijayammal PL. Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. J Appl Toxicol 1997; 17:289–295.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med 1990; 9(6):515-540.

- Jialal I, Fuller CJ. Effect of vitamin E, vitamin C and beta carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. *Can J Cardiol* 1995; 11:97–103.
- Jialal I, Vega GL, Grundy SM. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 82:185–191.
- Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes. *Cardiovas Diabetol* 2005; 4:1-11.
- Kabel AM. Free radicals and antioxidants: Role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health* 2014; 2(3):35-38.
- Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol* 2005; 90(4):571–576.
- Kang SA, Jang YJ, Park H. In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic Res* 1998; 28:93–107.
- Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:489 - 499.
- Karaca İ, Çankal DU. *Diş hekimliğinde antibiyotik ve antimikrobiyal kullanımı*. Ed. Newman MG, van Winkelhoff AJ, 2. Baskı, İstanbul, Quintessence Yayıncılık Ltd. Şti. 2008; 121.
- Kaufman S. Dopamine-beta-hydroxylase. *J Psychiatr Res* 1974; 11:303–316.
- Kaya S. *Veteriner Farmokoloji*. 4. Baskı, Cilt 2, Ankara, Medisan Yayınları, 2007; 361-362,368.
- Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Crit Rev Toxicol* 2015; 45(9):765–798.
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1): 21-48.
- Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science* 2013; 339(6124):1213-1216.
- Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Critical review of malondialdehyde analysis in biological samples. *Current Pharmaceutical Analysis* 2016; 12(1):4-17.
- Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33(2):110-118.

- Kivirikko KI, Myllylä R. Post-translational processing of procollagens. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 460:187–201.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 2007; 130:797–810.
- Koltaş İS, Bilgin R. Catalase levels in human fascioliasis: Antioxidant enzymes against toxic reactive oxygen species in human fascioliasis. 6th Annual International Conference on Advanced in Biotechnology (BIOTECH), 2016.
- Konukoğlu D, Akçay T. Glutasyon Metabolizması Ve Klinik Önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1995;15(4):214-218.
- Kum C, Sekkin S. Antibiyotiklere alternatif yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci* 2012; 3(3):84-116.
- Kumar SV, Saritha G, Fareedullah MD. Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Annals of biomedical Res* 2010; 1(3):158-173.
- Kunert KJ, Tappel AL. The effect of vitamin C on in vivo lipid peroxidation in guinea pigs as measured by pentane and ethane production. *Lipids* 1983; 18:271–274.
- Larrey D, Vial T, Micaleff A, Babany G, Morichau-Beauchant M, Michel H, Benhamou JP. Hepatitis associated with amoxicillin-clavulanic acid combination: reports of 15 cases. *Gut* 1992; 33:368 -371.
- Lebold KM, Traber MG. Interactions between α -tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. *Free Radic Biol Med* 2014; 66:13–19.
- Levine M, Dhariwal KR, Washko P, Welch R, Wang YH, Cantilena CC, Yu R. Ascorbic acid and reaction kinetics in situ: a new approach to vitamin requirements. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1992; Spec No:169–172.
- Lindblad B, Lindstedt G, Lindstedt S. The mechanism of enzymic formation of homogentisate from p-hydroxyphenylpyruvate. *J Am Chem Soc* 1970; 92:7446–7449.
- Liras P, Rodríguez-García A. Clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 54(4):467-475.
- Liu B, Hou X, Zhou Q, Tian J, Zhu P, Xu J, Hou F, Fu H. Detection of advanced oxidation protein products in patients with chronic kidney disease by a novel monoclonal antibody. *Free Radic Res* 2011; 45:662-671.
- Liu Y, Imlay JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science* 2013; 339(6124):1210-1213.

- Lloyd D. Sensitivity to antibiotics amongst cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic staphylococci in the UK, 1980 - 1996. *Vet Dermatol* 1996; 7:171.
- Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1830:3143–3153.
- Lucena MI, Andrade RJ, Fernández MC, Pachkoria K, Pelaez G, Duran JA, Villar M, Rodrigo L, Romero-Gomez M, Planas R, Barriocanal A, Costa J, Guarner C, Blanco S, Navarro JM, Pons F, Castiella A, Avila S. Determinants of the clinical expression of amoxicillin-clavulanate hepatotoxicity: a prospective series from Spain. *Hepatology* 2006; 44:850-856.
- Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014; 224:164–175.
- Macfarlane I, Bomford A, Sherwood RA. Liver diseases and laboratory medicine. ACB ventures publications London. 2000.
- Malle E, Buch T, Grone HJ. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int* 2003; 64:1956-67.
- Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* 2004; 15(1-2):91-96.
- Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J. Biol. Chem* 1996; 271:40-47.
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007; 58:459-481.
- Nakamura YK, Marsha H, Read MH, Elias JW, Omaye ST. Oxidation of serum low-density lipoprotein (LDL) and antioxidant status in young and elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42:265–276.
- Nathani MG, Mutchnick MG, Tynes DJ, Ehrinpreis MN. An unusual case of amoxicillin/clavulanic acid-related hepatotoxicity. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:1363 -1365.
- Neuzil J, Thomas SR, Stocker R. Requirement for, promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 57–71.
- Nicholls SJ, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15:212-219.
- Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono-gamma-

- lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem* 1994; 269:13685–13688.
- Nishikimi M, Yagi K. Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell Biochem* 1996; 25:17–39.
- Olayinka ET, Olukowade IL. Effect of amoxicillin/clavulanic acid (Augmentin 625®) on antioxidant indices and markers of renal and hepatic damage in rats. *J Toxicol Environ Health Sci* 2010; 2(6):85-92.
- Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. In: McCormick DB, Wright LD, editors. *Methods in enzymology*, vol. 62. New York: Academic Press; 1979. p. 3–11.
- Öncü S. Antibiyotiklerin istenmeyen etkilerinin izlemi-yönetimi. *ANKEM Derg* 2013; 27(Ek 2):82-84.
- Özcan O, Erdal H, Çakırcal G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Invest* 2015; 6(3):331-336.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 315–424.
- Packer L. Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci Am Sci Med* 1994; 1:54–63.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(1):18-35.
- Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:746–761.
- Paolini M, Pozzetti L, Pedulli GF, Marchesi E, Cantelli-Forti G. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci* 1999; 64:273–278.
- Pellerin J, Bourdeau P, Sebbag H, Person J. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *S. intermedium* clinical isolates from canine pyodermas. *Comp. Immun. Microbiol Infect Dis* 1998; 21(2); 115.
- Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:1135–1140.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008; 4(2):89-96.

- Pozzi SP, Ben-David Z. Review: Use of amoxicillin + clavulanic acid combination in veterinary medicine and possible antibiotic resistance of human pathogens. *Israel J Vet Med* 2002; 57(3):95.
- Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:403– 434.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 2007; 1:3159–3165.
- Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:1147–1152.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269:26066-26075.
- Salvo F, De Sarro A, Caputi AP, Polimeni G. Amoxicillin and amoxicillin plus clavulanate: A safety review. *Expert Opin Drug Saf* 2009; 8(1):111-118.
- Salvo F, Polimeni G, Moretti U, Conforti A, Leone R, Leoni O, Motola D, Dusi G, Caputi AP. Adverse drug reactions related to amoxicillin alone and in association with clavulanic acid: data from spontaneous reporting in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:121– 126.
- Schreck R, Baeuerle DA. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol* 1991; 1:39-42.
- Sezer K, Keskin M. Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *FÜ Sağ Bil Vet Derg* 2014; 28(1):49-56.
- Sezikli M, Çetinkaya ZA, Güzelbulut F, Yeşil A, S. Coşgun S, Kurdaş OÖ. Supplementing Vitamins C and E to standard triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pharm Ther* 2012; 37:282–285.
- Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: A Review. *J Dent Allied Sci* 2012;1(2):63-66.
- Simic MG, Taylor KA. Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. In: *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. New York: Plenum Press. 1986; 813-847.
- Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem Journal* 1985; 222: 1-15.
- Speakman A, Dawson S, Corkill J, Binns S, Hart C, Gaskell R. Antibiotic susceptibility of canine *B. bronchiseptica* isolates. *Vet Microbiol* 2000; 71(3-4); 193.

- Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:321–336.
- Stone I. The healing factor, "VITAMIN C" Against Disease. The Putnam Publishing Group, New York, 1982.
- Sushil JK, Mcvie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989; 38:1539-1543.
- Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2003; 140-141:105-112.
- Tabakoğlu E, Durgut R. Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg* 2013;3(1), 69-75.
- Tanaka K, Hashimoto T, Tokumaru S, Iguchi H, Kojo S. Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J Nutr* 1997; 127:2060–2064.
- Tandon V, Gupta BM, Tandon R. Free radicals/reactive oxygen species. *JK- Practitioner* 2005; 12:143-148.
- Tesoriere L, Ciaccio M, Bongiorno A, Riccio A, Pintaudi AM, Livrea MA. Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogeneous solution and in phosphatidylcholine liposomes. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307:217–223.
- Thomson JA, Fairley CK, Ugoni AM, Forbes AB, Purcell PM, Desmond PV, Smallwood RA, McNeil JJ. Risk factors for the development of amoxicillin-clavulanic acid associate jaundice. *MJA* 1995; 162:638-640.
- Tiftik AM. Biüret metoduyla total protein tayini, *Klinik Biyokimya, Mimoza Yayınları, Konya*, 1996; 291-292.
- Trevor AJ, Katzung BG, Kruidering-Hall M, Masters SB, Katzung & Trevor's *Pharmacology: Examination & Board Review*, 10. Baskı, McGraw Hill Companies, Inc. 2013; 384,448.
- Tuzcu S. Tanıda laboratuvar testleri. 7. Baskı, İstanbul, Yüce Yayınları. 2003;58.
- Ünal K, Palabıyık İM, Karacan E, Onur F. Spectrophotometric determination of amoxicillin in pharmaceutical formulations. *Turk J Pharm. Sci* 2008; 5(1)1-16.
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* 2016; 90:1–37.

- Valko M, Leibfritz D, Jan Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Tels J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44–84.
- Vašková J, Vaško L, Kron I. Oxidative processes and antioxidative metalloenzymes. Chapter 2, *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology" Antioxidant Enzyme"*, Prof. Mohammed Amr El-Missiry (Ed.), InTech 2012; 29.
- Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 2003; 140-141:113-124.
- Voziyan PA, Yazlovitskaya EM. Reactive oxygen species. *J Bioequiv Availab* 2014; 6(6):1-3.
- Washko PW, Wang Y, Levine M. Ascorbic acid recycling in human neutrophils. *J Biol Chem* 1993; 268:15531–15535.
- Weller R, Pattullo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N. Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol* 1996; 107:327-331.
- Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18:642-660.
- Xu J, Xie Z, Reece R, Pimental D, Zou MH. Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2688-2695.
- Yadav SB, Suryakar AN, Huddedar AD, Durgawale PP, Shukla PS. Antioxidant treatment a new therapeutic approach to reversible male infertility. *Biomed Res* 2006; 17(3):175-178.
- Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 2011; 111(10):5944–5972.
- Yüzüak H, Akbulut KG, Yüzüak S. Yaşlanma sürecinde melatoninin pankreas dokusundaki oksidan ve antioksidanlara etkisi. *J Clin Exp Inves* 2014; 5(4):583-588.
- Zhang C, Yang J, Jennings LK. Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose-induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose-stimulated, vascular non-leukocyte-derived reactive oxygen species. *Diabetes* 2004; 53:2950-2959.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014; 94:909–950.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emine ALTIN

Doğum Yeri: Kdz. Ereğli

Doğum Tarihi: 15.09.1985

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce, Almanca

Mezun Olduğu Üniversite: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü
(Lisans-2009)

Çalıştığı Kurum: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı (2013- Halen)

İletişim Bilgileri: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı, Samsun

Tel: (362) 312-1919 / 3957

Eposta: emine.altin@omu.edu.tr