

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENTAMİSİN SÜLFAT, AMOKSİSİLİN VE SEFAZOLİN
SODYUM ANTİBİYOTİKLERİNİN FARE KALP DOKUSUNDA
ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ, PROTEİN VE GEN
EKSPRESYON DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

AHMET SAVCI

**KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ**

BİNGÖL-2016

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENTAMİSİN SÜLFAT, AMOKSİSİLİN VE SEFAZOLİN
SODYUM ANTİBİYOTİKLERİNİN FARE KALP DOKUSUNDA
ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ, PROTEİN VE GEN
EKSPRESYON DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

AHMET SAVCI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA ANABİLİMİ

Bu tez 16.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.
Mehmet ÇİFTÇİ
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Abdulkadir ÇOBAN
Üye

Doç. Dr.
Harun BUDAK
Üye

Yrd. Doç. Dr.
Bülent KAYA
Üye

Yrd. Doç. Dr.
Aydın Şükrü BENGÜ
Üye

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim Y. ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını ve bilgi birikimlerini benden esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren hoşgörü ve sabırla her konuda bana yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye ve değerli hocam Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK'a teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmasına desteklerinden dolayı Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne teşekkür ederim. Bu çalışmayı gerçekleştirmemde BAP-718-283-2015 no'lu ve "Gentamisin Sülfat, Amoksisilin ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Kalp Dokusunda Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Protein ve Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı proje ile finansal destek sunan, Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan ve yardımlarından faydalandığım Muş Alparslan Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Enver Fehim KOÇPINAR'a, Atatürk Üniversitesi öğretim elemanı Dr. Pınar Güller'e, Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü doktora öğrencisi Nurdan GÖNÜL'e ve diğer lisansüstü öğrencilerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak bende büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen anne ve babama, tezin hazırlanması sırasında gösterdikleri sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı eşime ve biricik oğluma özellikle teşekkürü bir borç bilirim.

Ahmet SAVCI

Bingöl 2016

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLOLAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	2
1.1.1. Başlıca Reaktif Oksijen Türleri	3
1.1.2. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Reaksiyonları	6
1.1.3. Serbest Radikallerin Kaynakları	7
1.1.4. Serbest Radikallerin Etkileri	7
1.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	11
1.2.1. Glutasyon	12
1.2.2. Glutasyon Redüktaz (GR)	14
1.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	15
1.2.4. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)	16
1.2.5. Katalaz (CAT)	16
1.2.6. Glutasyon S-Transferaz (GST)	17

1.2.7. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)	17
1.3. Kalpte Daha Yoğun Bulunan Antioksidan Enzimler	19
1.4. Antibiyotikler	20
1.5. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler	21
2. LİTERATÜR ÖZETİ	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	31
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	32
3.2. Yöntemler	35
3.2.1. Etik Kurul Raporunun Temini	35
3.2.2. Çalışmada Kullanılacak Farelerin Temin Edilmesi	36
3.2.3. İlaçların Uygulanması ve Dokuların Temin Edilmesi	36
3.2.4. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	36
3.2.5. Toplam Glutasyon (tGSH), Okside Glutasyon (GSSG) ve Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	37
3.2.6. Gen Ekspresyonu	39
3.2.7. Enzim Aktivitelerinin Ölçümü	49
3.2.8. Western Blot analizinin uygulanması	52
3.2.9. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiki analizler	54
4. SONUÇLAR.....	56
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	56
4.2. Redükte Glutasyon (GSH) ve Okside Glutasyon (GSSG) Tayin Sonuçları	56

4.2.1. Glutatyon tayini için hazırlanan standart grafik	56
4.2.2. Okside glutatyon (GSSG) tayini sonucu	57
4.2.3. Redükte glutatyon (GSH) tayini sonucu	58
4.3. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları	59
4.3.1. Glutatyon Redüktaz (GR) Gen Ekspresyonu Sonucu	59
4.3.2. Glutatyon Peroksidaz (Gpx) Gen Ekspresyonu Sonucu	59
4.3.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Gen Ekspresyonu Sonucu	60
4.3.4. Glutatyon S-Transferaz (GST) Gen Ekspresyonu Sonucu	61
4.3.5. Katalaz (CAT) Gen Ekspresyonu Sonucu	61
4.3.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Gen Ekspresyonu Sonucu	62
4.4. Amoksisilin, Gentamisin ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Kalp Dokusunda Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine İn Vivo İnhibisyon Etkilerinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları	63
4.4.1. Glutatyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu ...	63
4.4.2. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu .	64
4.4.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu	65
4.4.4. Glutatyon S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu	65
4.4.5. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu	66
4.4.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu .	67
4.5. Amoksisilin, Gentamisin ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Kalp GPx ve GR Enzimlerinin Protein Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları	67
5. TARTIŞMA	69
KAYNAKLAR	75

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
G6PD	: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
MDA	: Malondialdehit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
LDL	: Low density lipoprotein
ATP	: Adenozin trifosfat
ADP	: Adenozin difosfat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form)
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş form)
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
LOOH	: Lipit hidroperoksit
EDTA	: Etilen daimin tetra asetik asit
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
BSA	: Bovin serum albümin
TCA	: Triklor asetik asit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
RİPA	: Western-Blot homojenat tamponu
TBS	: Tris-NaCl tamponu
TBST	: Tris-NaCl-Tween 20 tampon
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilendiamin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Oksidan- antioksidan denge	2
Şekil 1.2.	Lipid Peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu	9
Şekil 1.3.	Serbest radikallerin DNA üzerindeki etkileri	10
Şekil 1.4.	Hücrede radikal aracılı hasar	11
Şekil 1.5.	GSH'nin moleküler yapısı	13
Şekil 1.6.	Glutatyonun sentezi, geri kazanımı ve kullanımı	13
Şekil 1.7.	Redükte glutatyonun yapısı (GSH)	14
Şekil 1.8.	Okside glutatyonun yapısı (GSSG)	14
Şekil 1.9.	Glutatyonun redoks döngüsü	15
Şekil 1.10.	Pentoz fosfat yolunun oksidatif bölümü	18
Şekil 1.11.	Memeli hücrelerinde antioksidan sistem	19
Şekil 1.12.	Amoksisilin molekülünün yapısal formülü	21
Şekil 1.13.	Sefazolin sodyum molekülünün yapısal formülü	23
Şekil 1.14.	Gentamisin sülfat molekülünün yapısal formülü	24
Şekil 3.1	Primer ve Prob dizayn etmek için kullanılan NCBI ana sayfası	40
Şekil 3.2	NCBI organizma seçim sayfası	41
Şekil 3.3	İlgili genin temel özelliklerini gösteren NCBI sayfası	41
Şekil 3.4	İlgili genin gen ve protein sekansını gösteren NCBI veritabanı	42
Şekil 3.5	Gen sekansının bulunduğu veri tabanı	42
Şekil 3.6	Sod-1 genine ait kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri gösteren veritabanı	42
Şekil 3.7	İlgili genin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği organizma seçim sayfası	43
Şekil 3.8.	Gen sekansının homolojisinin kontrol edildiği blast sayfası	43

Şekil 3.9.	İlgili genin başka genlerle homoloji oranını gösteren sayfa	44
Şekil 3.10.	Dizayn edilen primer ve problemlerin optimum değerlerinin girildiği NCBI sayfası (üst kısım)	45
Şekil 3.11.	Dizayn edilen primer ve problemlerin optimum değerlerinin girildiği NCBI sayfası (alt kısım)	45
Şekil 3.12.	Çoğaltılacak gen bölgesinin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği blastlama sayfası (Üst kısım)	45
Şekil 3.13.	Çoğaltılacak gen bölgesinin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği blastlama sayfası (Alt kısım)	46
Şekil 3.14.	Real-Time PCR cihazındaki sıcaklık döngüsünü gösteren ekranın görüntüsü	46
Şekil 4.1.	Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart	56
Şekil 4.2.	GSSG kullanarak hazırlanan standart grafik	57
Şekil 4.3.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre karaciğer GSSG miktarları	57
Şekil 4.4.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre karaciğer GSH miktarları	58
Şekil 4.5.	Kontrol grubu ile amoksisilin, gentamisin ve sefazolin sodyum uygulanan farelerin kalp dokusunda GSH, GSSG ve GSH/GSSG arasındaki korelasyon	58
Şekil 4.6.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Gr gen ekspresyon sonuçları	59
Şekil 4.7.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Gpx gen ekspresyon sonuçları	60
Şekil 4.8.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp G6pd gen ekspresyon sonuçları	60
Şekil 4.9.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Gst gen ekspresyon sonuçları	61
Şekil 4.10.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Cat gen ekspresyon sonuçları	62
Şekil 4.11.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Sod gen ekspresyon sonuçları	63

Şekil 4.12.	Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer GR enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri	64
Şekil 4.13.	Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer GPx enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri	64
Şekil 4.14.	Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer G6PD enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri	65
Şekil 4.15.	Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer GST enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri	66
Şekil 4.16.	Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer CAT enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri	66
Şekil 4.17.	Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer SOD enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri	67
Şekil 4.18.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp GPx enziminin protein ekspresyon sonuçları	68
Şekil 4.19.	Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp GR enziminin protein ekspresyon sonuçları	68

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1.	Serbest oksijen partikülleri	3
Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan kimyasallar	30
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	31
Tablo 3.3.	Farelere verilen ilaçların dozajları ve uygulama süreleri	36
Tablo 3.4.	Glutasyon tayininde kullanılan standart grafik için küvet içerikleri	38
Tablo 3.5.	Toplam glutasyon tayini küvet içerikleri	38
Tablo 3.6.	cDNA sentezi için hazırlanan PCR bileşimi	40
Tablo 3.7.	Dizayn edilen primer ve problara ait optimum değer aralıkları	44
Tablo 3.8.	Tez kapsamında yapılan mültipleks Real-Time PCR yönteminde kullanılmak üzere sipariş edilen primer ve problemlerin sekansları	46
Tablo 3.9.	Real-Time PCR için hazırlanan tüp içeriği	47
Tablo 3.10.	GR Aktivite Ölçüm Prosedürü	49
Tablo 3.11.	GPx Aktivite Ölçüm Prosedürü	49
Tablo 3.12.	G6PD Aktivite Ölçüm Prosedürü	50
Tablo 3.13.	GST Aktivite Ölçüm Prosedürü	51
Tablo 3.14.	CAT Aktivite Ölçüm Prosedürü	51
Tablo 3.15.	SOD Aktivite Ölçüm Prosedürü	52
Tablo 3.16.	SDS Jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri	53
Tablo 3.17.	SDS Jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri	53

GENTAMİSİN SÜLFAT, AMOKSİSİLİN VE SEFAZOLİN SODYUM ANTİBİYOTİKLERİNİN FARE KALP DOKUSUNDA ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ, PROTEİN VE GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Serbest radikaller organizmada çeşitli organlarda tahribata neden olmaktadır. Bilinçsizce kullanılan antibiyotiklerin serbest radikal oluşumunu artırarak oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir.

Bu tezde gentamisin (aminoglikozid grubu), amoksisilin (penisilin grubu) ve sefazolin sodyum (sefalosporin grubu) antibiyotiklerinin fare kalp dokusu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 20 adet erkek fare ağırlıklarına göre 4 gruba ayrıldı. İlaçların adından yola çıkarak gruplar Amoksisilin grubu, Gentamisin grubu ve Sefazolin Sodyum grubu olmak üzere isimlendirildi. Gruplardaki farelere 6 gün boyunca ilaçlar 100 mg/kg dozlarda intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı yolla fizyolojik serum uygulandı. Çalışmada ilk olarak kalp dokusunda GSH seviyesine bakıldı. Ardından GR, GPx, G6PD, GST, SOD ve CAT antioksidan enzimlerinin gen ekspresyon seviyeleri ve enzim aktiviteleri incelendi. Son olarak da GR ve GPx enzimlerinin kantitatif protein ekspresyonu seviyelerine bakılarak çalışma sonlandırıldı.

Çalışma sonuçlarına bakıldığında gentamisin antibiyotiğinin kalp dokusunda herhangi bir etki oluşturmadığı tespit edildi. Amoksisilin ve sefazolin uygulanan gruplarda ise GSH seviyesinin azaldığı ve bunun yanında GR, CAT ve SOD enzim aktivitelerinde artış olduğu görüldü. Sonuç olarak amoksisilin ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin kalp dokusunda oksidatif stres oluşturduğu ancak gentamisinin herhangi bir etki oluşturmadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, enzim aktivitesi, gen ekspresyonu, protein ekspresyonu, oksidatif stres.

THE INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES OF GENTAMICIN SULFATE, AMOXICILLIN AND CEFAZOLIN SODIUM ANTIBIOTICS AND THEIR EFFECT ON GENE EXPRESSIONS AND PROTEIN LEVELS IN MICE HEART TISSUE

ABSTRACT

It is well known that free radicals can damage various organs in the body. Improper uses of antibiotics increase the formation of free radicals and cause oxidative stress.

In this thesis, we aimed to determine the effects of gentamicin (aminoglycoside group), amoxicillin (penicillin) and cefazolin (cephalosporin group) sodium antibiotics on mouse heart tissue. Twenty male mice were divided into 4 groups according to their weight. Group names were named based on drug name as amoxicillin group, gentamicin group and cefazolin sodium. The 100mg/kg doses of each drugs were applied intraperitoneally to mice for 6 days. The physiological saline solution was applied to the control group in the same way. In this study, firstly, GSH levels were assessed in the heart tissue. Then, activity of following antioxidant enzymes, GR, GPx, G6PD, GST, SOD and CAT, and their gene expression were examined. Finally, quantitative expression of protein levels for GR and GPx were analyzed.

As a result, no significant effect of gentamicin antibiotics was observed on heart tissue. We found decreased levels of GSH enzyme and increased enzyme activity of GR, CAT and SOD in the amoxicillin and cefazolin group. In conclusion, our results showed that amoxicillin and cefazolin sodium antibiotics created oxidative stress in heart tissue yet gentamicin had no effect.

Keywords: Antibiotics, enzyme activity, gene expression, protein expression, oxidative stress.

1. GİRİŞ

Geçtiğimiz yüzyılın en önemli buluşlarından biri olan antibiyotiklerin keşfedilmesiyle beraber çok çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisi mümkün hale gelmiştir. Bu yüzden gerek dünyada ve gerekse de ülkemizde antibiyotikler günlük kullanılan ve reçete edilen ilaçların başında gelmektedir. Ancak antibiyotiklerin akılcı ve istenilen dozlarda kullanılmaması, uygun olmayan bir şekilde ve çok yaygın olarak kullanılması, bakteriyel direnç gösterilmesine neden olmaktadır ve bundan dolayı bir çok hastalığa davetiye çıkarmaktadır. Ayrıca bu durum ülke ekonomisine de çok büyük zarar vermektedir. 'IMS Health (Information Medical Statistics)' in 2002'deki verilerine göre Türkiye'de en fazla kullanılan antibiyotiklerin başında %16'lık paya sahip olan Sefazolin, hemen ardından %15'lik paya sahip olan Amoksisilin gelmektedir. Ayrıca bunları %8'lik paya sahip olan Gentamisin izlemektedir.

Ampisilin, kanamisin, norfloksazin gibi bakteriyel antibiyotikler reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırlar (Kohanski et al. 2007). Bu antibiyotikler Trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne girerek nikotinamid adenin dinükleotit (NADH)'ın hızla tükenmesine ve böylece süperoksit (O_2^-) radikallerinin artmasına neden olurlar. Süperoksit radikalleri Fe-S kümelenmelerini azaltarak Fenton reaksiyonuyla ($Fe^{+2} + 2H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$) OH^{\cdot} radikallerinin üremesine neden olurlar.

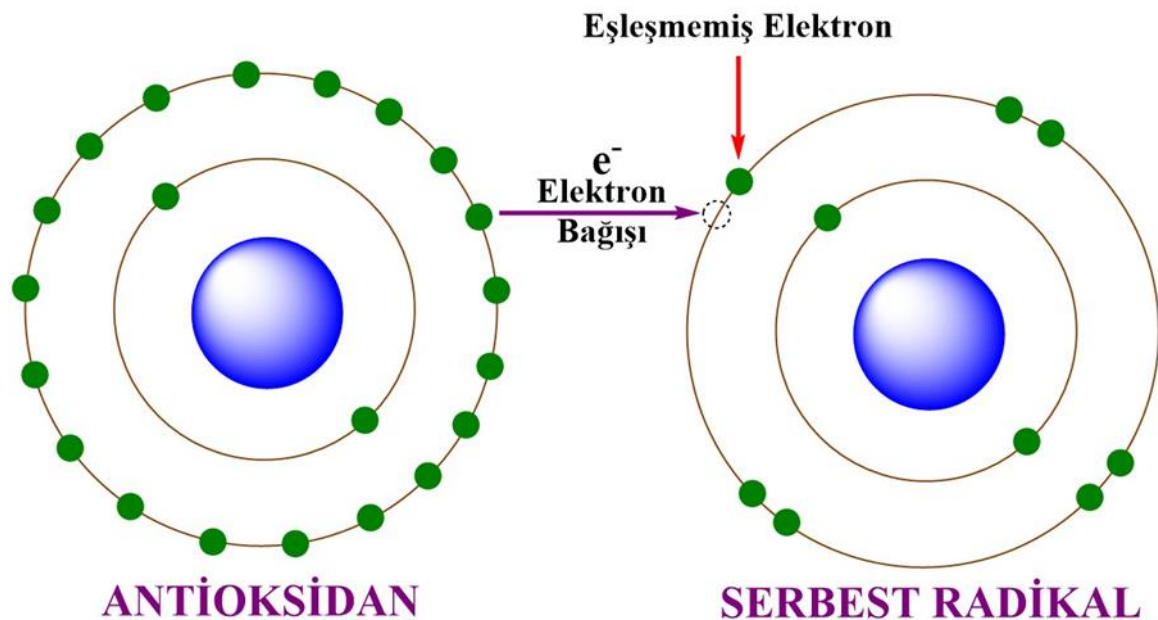
β -laktam antibiyotiklerin karnitin/açilkarnitin taşıyıcı sistemiyle etkileşime geçmesi gibi, antibiyotiklerin ökaryotik hücrelerde mitokondriyal bileşikleri hedef aldığı belirtilmiştir (Pochini, Galluccio et al. 2008). Mitokondriyal elektron taşıma zinciri elektronların sızması nedeniyle ökaryotik hücrelerde reaktif oksijen türlerinin ana kaynağıdır. Kalghatgi ve arkadaşları ökaryotik hücrelerde antibiyotiklerin mitokondriyal fonksiyonları bozarak serbest radikallerin üremesine ve oksidatif hasarın meydana gelmesine neden olduklarını rapor etmişlerdir (Kalghatgi et al. 2013).

Bu tez çalışmasında Sefazolin, Amoksisilin ve Gentamisin antibiyotiklerinin fare kalp

dokusundaki süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz G6PD antioksidan sisteme etkisi gen ve protein seviyesinde *in vivo* olarak araştırıldı.

1.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküller olarak karakterize edilir (Şekil 1.1) (Çakır 2012) . Son orbitallerindeki bu ortaklanmamış elektronlar kararlı hale gelmek için başka elektronlara ihtiyaç duyarlar. Bu durum serbest radikalleri oldukça reaktif hale getirir (Willcox et al. 2004). Oksijenli solunum yapan canlılarda yaşam için gerekli olan oksijen molekülü aynı zamanda serbest radikal oluşumunun da kaynağıdır. Serbest radikaller bu şekilde normal metabolik süreçte oluştuğu gibi aynı zamanda çok çeşitli dış uyarıcılar yoluyla da oluşur. Aslında bu tür atom ya da moleküllerin ömürleri çok kısadır. Ama çok aktif olan bu radikaller (Tablo 1.1) çok kısa sürede vücuttaki çeşitli atom ve moleküllerle reaksiyona girerek hemen hemen bütün dokularda hasara neden olurlar (Uysal 1998).



Şekil 1.1. Oksidan- antioksidan denge [<https://resifmarket.wordpress.com/tag/antioksidan/>]

Metabolik süreçler ya da çevresel etmenler dolayısıyla oluşan serbest radikallerin hasar oluşturmaması için bu radikallerin nötralize edilmesi gerekir. Bu sebeple organizmada sürekli bir oksidan-antioksidan denge mevcuttur. Bu denge halinin bozulması durumunda çeşitli hastalıklara neden olacak olan ‘oksidatif stres’ diye adlandırılan bir durum oluşmaktadır (Dündar ve Aslan 1999).

Tablo 1.1. Serbest Oksijen Partikülleri (Tsang 2004)

<i>Radikaller</i>	<i>Radikal Olmayanlar</i>
Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil (OH^{\cdot})	Singlet oksijen (1O_2)
Peroksil (ROO^{\cdot})	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^{\cdot})	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Nitrik Oksit (NO^{\cdot})	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Semikinon Radikali (HQ^{\cdot})	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)
Organik radikaller (R^{\cdot})	N-Halojenli aminler ($R-NH-X$)
Organik peroksit radikali ($RCOO^{\cdot}$)	Hipohalöz asit (HOX)

1.1.1. Başlıca Reaktif Oksijen Türleri

1.1.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

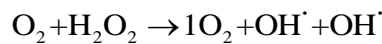
Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit radikali hemen hemen tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde gerçekleşir. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu ile süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikalının kendisi doğrudan zarar vermez. Hidroksil radikaline göre aktifliği düşük olan süperoksit radikali membranları aşamaz ve hücrelere az zarar verir. Düşük pH değerlerinde daha reaktif olan bu radikal anyonun tehlikeli olmasının iki asıl nedeni bulunmaktadır:

- 1- Hidrojen peroksit kaynağı olması
- 2- Geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması (Özdamar 2008).

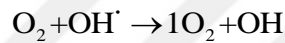
Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilave edilmesi ile oluşur ve süperoksit dismutaz enzimi aracılığı ile hidrojen peroksite indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal bir molekül değildir (Şener ve Yeğen 2009). Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir (Cheeseman and Slater 1993, Sarı 2008).

1. Oksidan perhidroksi radikali (HO_2^\bullet) oluşturmak üzere protonlanır.

2. H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali (OH^\bullet) ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturabilir.

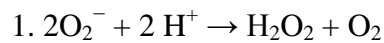


3. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olur.

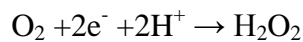


1.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesi veya yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesiyle oluşan hidrojen peroksit yapısı itibariyle radikal olmamasına rağmen etkilerinden dolayı serbest radikal kaynağı olarak tanımlanabilir (Cheeseman and Slater 1993). Biyolojik organizmalardaki asıl üretim kaynağı süperoksidin dismutasyonudur.



2. Oksijenin iki elektronla indirgenmesi sonucu H_2O_2 ortaya çıkar.



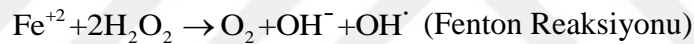
Bu reaksiyon sonucunda radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden, dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya kendiliğinden gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. H_2O_2 yüksüz bir molekül olmasından dolayı hücre içerisine kolaylıkla girebilir ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. H_2O_2 özellikle demir ve bakır gibi geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla yıkılır. Bu yıkım sonucu en reaktif serbest radikal olan hidroksil radikali oluşur (Fang, Yang et al. 2002). H_2O_2 'nin

diğer önemli bir görevi de hücre içi sinyal molekülü olarak görev almasıdır. Katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler tarafından uzaklaştırılırlar (Sarı 2008).

1.1.1.3. Hidroksil Radikali (OH[•])

Reaktif oksijen türleri içerisinde en radikal olanı hidroksil radikalidir. Yarılanma ömrü bir nanosaniye kadar olan bu radikal organik moleküllerle gelişigüzel reaksiyona girerek etki ettiği yerlerde çok büyük hasarlar meydana getirir (Pastor et al. 2000). Oluşan hasarlar; protein ve lipitler arası çapraz bağlar oluşturma, proton çıkarma ve elektron transferi yapma şeklinde gerçekleşirler. Hidroksil radikalinin oluşum kaynakları çok çeşitlidir. Bu oluşum şekillerini aşağıdaki gibi gösterebiliriz:

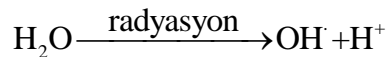
1. OH[•] radikali toksik organizmada toksik etki gösterirler ve bunun için de bazı metal iyonlarına (demir, bakır gibi) ihtiyaç duyarlar. Asıl olarak Fe⁺² molekülünün de katıldığı Fenton reaksiyonu ile oluşur (Agarwal and Chase 2002).



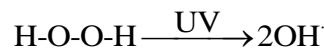
2. Ferrik demir katalizörlüğünde, süperoksit radikalinin hidrojen peroksitle etkileşmesi sonucu hidroksil radikali oluşur. Bu reaksiyona Haber –Weiss reaksiyonu denir (Liochev and Fridovich 2002).



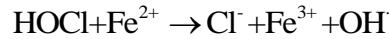
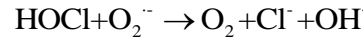
3. Yüksek enerjili iyonize radyasyon ile suyun radyolizi sonucu hidroksil radikali oluşabilmektedir (Hussein 2011).



4. Başka bir hidroksil radikali oluşum şekli, UV ile indüklenen hidrojen peroksidin O-O bağlarının homolitik kırılmasıdır (Gutteridge and Halliwell 1992).



5. Hidroksil radikali hipokloröz asitin süperoksit veya bir demir kompleksi ile reaksiyona girmesiyle de oluşabilmektedir (Radak 1998).



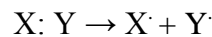
Yarılanma ömrü çok kısa olan bu radikalin proteinler, karbohidratlar, nükleik asitlere zarar vermesinin yanında sebep olduğu en önemli hasar, lipit peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama et al. 1998). Aminoasit rezidülerini schiff bazı oluşturmak üzere oksitler. DNA molekülünde pürin ve pirimidin bazlarında kimyasal değişikliklere ve kırılmalara neden olur (Tamer vd. 2000).

1.1.2. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Reaksiyonları

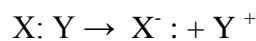
Serbest radikaller başlıca üç mekanizma ile oluşmaktadır:

1. Kovalent bağların hemolitik kırılması ile:

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklığa maruz kalan moleküller arasındaki kimyasal bağlar kırılarak radikal atomlar oluşur (Kılınç ve Kılınç 2002, Scandalios 2002).



2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi ile: Radikal özelliği olmayan bir molekül elektron kaybettiğinde dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikallik kazanır (Akkuş 1995, Kılınç ve Kılınç 2002).



3. Normal bir moleküle elektron transferi ile:

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Moleküler oksijenden süperoksit radikali oluşumu buna örnektir (Şahin 2011).

Serbest radikal reaksiyonları üç adımda incelenebilir:

- 1.Adım. Başlama aşaması: Radikallerin oluşumu
- 2.Adım. Yayılma aşaması: Seri zincir reaksiyonlarıyla yeni radikallerin oluşumu
- 3.Adım. Sona erme aşaması: Radikallerin yıkımı (Kehrer and Klotz 2015).

1.1.3. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikal oluşumunu arttıran faktörler eksojen ve endojen olmak üzere iki grupta toplanabilir (Chopineau et al. 1994, Uysal 1998). Serbest radikal oluşumu aşağıdaki gibi listelenebilir:

- a. UV radyasyonları, X-ray, gama ışınları ve mikrodalga radyasyonları
- b. Metal-kataliz reaksiyonları
- c. Çevre kirleticiler
- d. Elektron taşıma zinciri
- e. Mitokondriyal sitokrom oksidaz, ksantin oksidaz ve lipit peroksidasyonu
- f. Araşidonik asit, trombositler, makrofajlar ve düz kas hücrelerinin metabolizması sonucu
- g. Kimyasallarla etkileşim, egzoz dumanı, sigara ve alkol
- h. Organik atık yakımı, orman yangınları, volkanik faaliyetler
- i. Endüstriyel atıklar, bazı ilaçlar ve ksenobiyotikler, pestisit ve herbisitler, bazı metal iyonları (Kehrer and Klotz 2015).

1.1.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller proteinleri, karbonhidratları, lipitleri ve nükleik asitleri içine alan bütün hücrel makro moleküllere zarar verebilir. Organizmaya vereceği zararlar aşağıdaki gibidir:

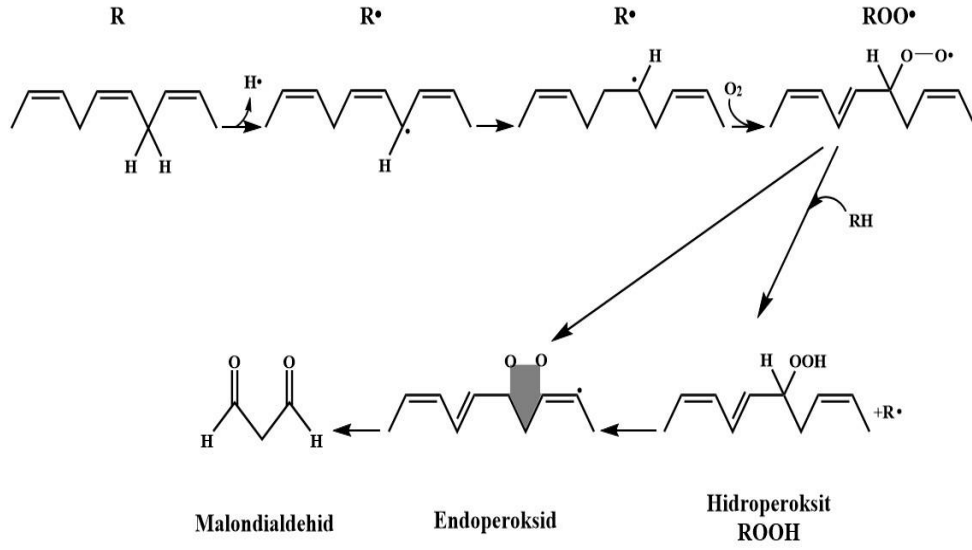
1. Hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürürler,
2. Hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellerler,
3. Nükleer membranı yararak çekirdekdeki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirirler,

4. Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlarlar ve enzimleri aktifleştirip pasif hale getirebilirler
5. Ayrıca mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller geçirgenliği bozup, hücrenin potasyum kaybını ve kan pulcuklarını artırır (Cadet 1988).

1.1.4.1. Lipitlere Etkileri

Biyolojik moleküllerin hepsi serbest radikallerden etkilenirler, fakat serbest radikal hasarından en fazla etkilenen biyomoleküller lipitlerdir. Çoklu doymamış yağ asitleri içerisinde bulunan çift bağlar serbest radikal aracılı reaksiyonlar için çok uygundur. Bu bağlar, kolaylıkla serbest radikallerle reaksiyona girerler ve bunun sonucunda peroksidasyon ürünleri oluşur. ‘Lipit peroksidasyonu’ diye adlandırılan çoklu doymamış yağ asitlerinin ve kolesterolün oksidatif hasara uğraması sonucu oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Ceylan 2006).

Hücre membranlarında lipit peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleridir. Membrana yakın yerlerde bulunan hidroksil radikali çoklu doymamış yağ asitlerine saldırır ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla lipit peroksidasyonu başlar. Lipit radikali ($R\bullet$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit radikallerinin ($R\bullet$) moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri ($ROO\bullet$) oluşur. Lipit peroksit radikalleri membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($ROOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Şekil 1.2) (Özdamar 2008).



Şekil 1.2. Lipid Peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu (Kır 2012).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehitler (MDA) meydana gelir. Malondialdehit, lipid peroksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle endirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (Slater 1984, Akkuş 1995).

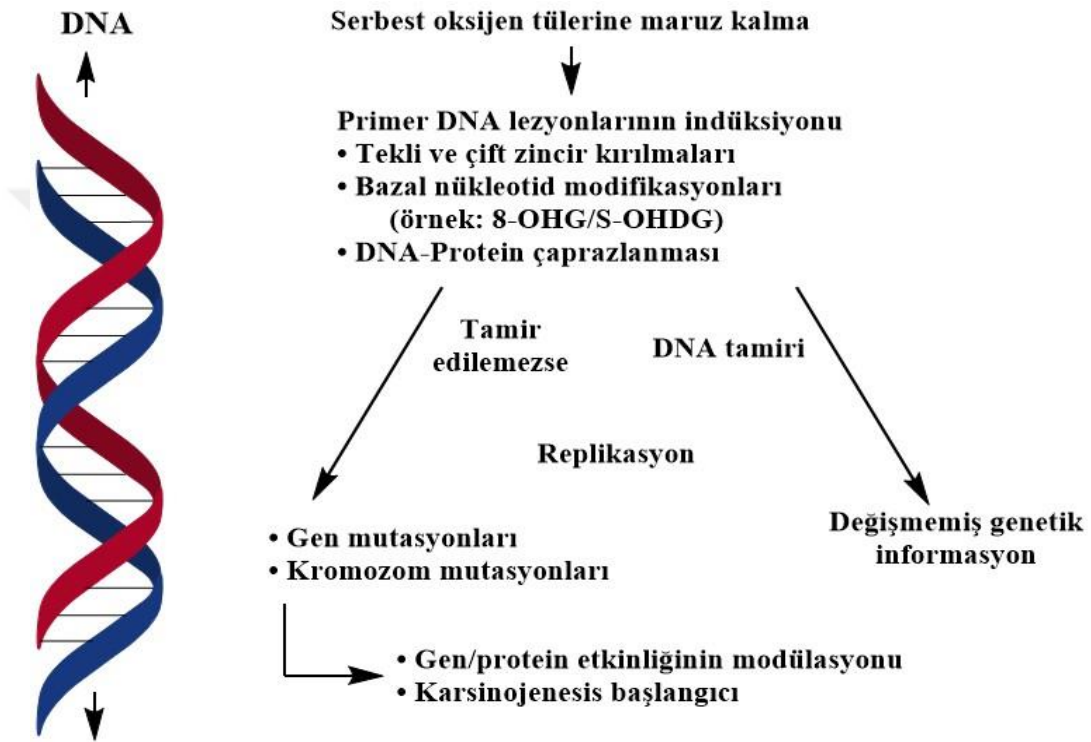
Lipit Peroksidasyonunun Organizmadaki Bazı Etkileri;

1. Membran akışkanlığı azalır ve maddelerin hücre içine girişleri artar.
2. Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri de lipit peroksidasyonunda hasar görürler.
3. Protein yapısını bozarak hasar meydana getirirler.
4. Bazı aldehitler biyolojik sıvılarda kemotatik etki gösterirler.
5. MDA gibi aldehitler, kötü kolesterol olarak bilinen düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'i modifiye ederek metabolik yolu değiştirebilirler (Baykal ve Kocabalkan 2000).

1.1.4.2. Nükleik Asitlere Etkileri

Serbest radikaller hücre içerisine girerek DNA'da kalıcı hasarlar meydana getirir (Şekil 1.3). DNA onarım işlemlerinin yetersiz kalması durumunda kalıcı DNA hasarları (Hücre

ölümüne kadar gidebilir), sürekli değişen DNA dizileri (mutasyon) ve transkripsiyon hataları meydana gelebilir. Peroksit-aracılı DNA hasarı poli (ADP-riboz) polimerazı etkinleştirebilir. Bu durumda enzim bu durumu onarmak için çok fazla miktarda nikotinamid adenin dinükleotid NAD^{+} 'e ihtiyaç duyacaktır (Kehrer and Klotz 2015). Süperoksit ve hidrojen peroksitin enzimatik toplayıcıları hidroksil radikali prekürsörlerinin konsantrasyonunu azaltarak DNA'yı korur (Blake et al. 1987).

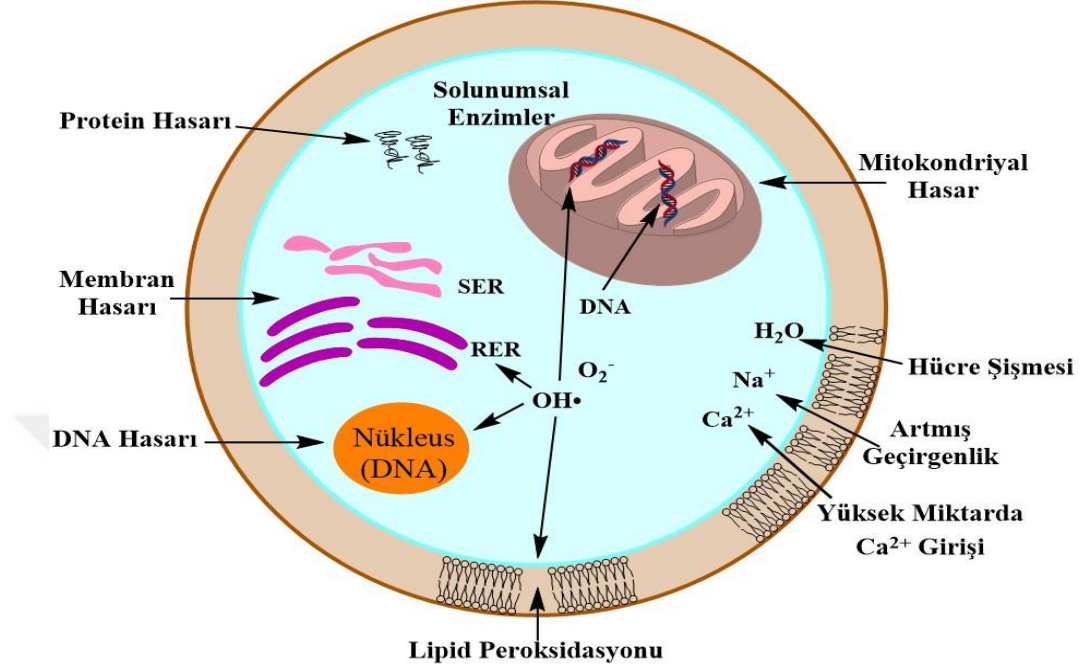


Şekil 1. 3. Serbest radikallerin DNA üzerindeki etkileri (Chandan 2000)

1.1.4.3. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin yapı taşı olan amino asitler serbest radikallerin hedefleridir (Şekil 1.4). Bu amino asitlerin oksidasyonu sonucu basit bir tiyol oksidasyonu ile kritik sülfhidril gruplarının kaybı, karışık disülfidlerin oluşmasına ya da metiyonin kalıntılarının oksidasyonuna neden olabilir. Buna ek olarak, amino asit modifikasyonları sonucu aldehitler veya ketonlar (örneğin karbonil), hidroperoksitler ve bunların indirgenmiş hidroksi türler veya histidin ve triptofan rezidülerinde halka bölünmeleri oluşabilir (Kehrer and Klotz 2015). Doymamış ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere karşı duyarlılığı en fazla olduğundan: sistin, sistein, histidin, metiyonin, triptofan ve

trozin içeren proteinler oksidasyona karşı en duyarlı olanlardır (Kavas 1989, Stadtman and Levine 2000).



Şekil 1.4. Hücrede radikal aracılı hasar (Tokaç 2007)

1.1.4.4. Karbohidratlara Etkileri

Hücreler serbest radikallerin saldırıları için çok uygun şekerler bulundurlar. Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etki eder ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler (Meram ve Aktaran 2002).

Serbest oksijen radikalleri bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyalüronik asit gibi karbohidratların parçalanmalarına da yol açabilirler (Kurutaş vd. 2004).

1.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

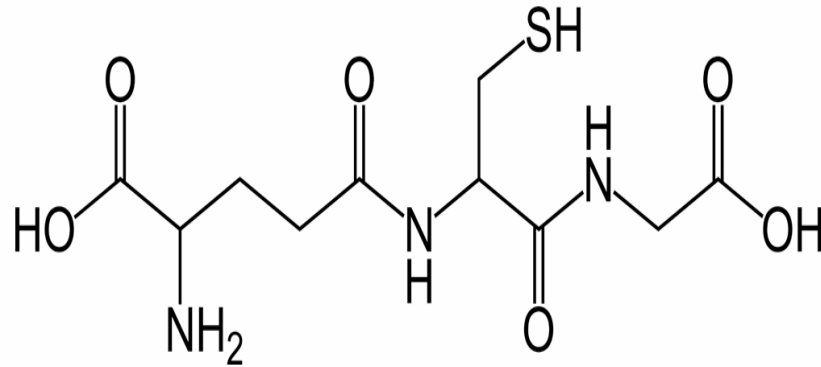
Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu temel biyokimyasal olayların normal bir sonucudur. Bununla birlikte aşırı ROS oluşumu kanser ve çeşitli karaciğer hastalıklarını

da içeren bir dizi farklı kronik patolojik durumları meydana getiren oksidatif stresi tetikler. Organizmada hücreyi ROS'un yıkıcı etkilerinden koruyan enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bunlar; birincil antioksidan enzimler [(süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px)], ikincil antioksidan enzimler [glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST), glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)] ve nonenzimatik antioksidan sistemler (glutatyon, ısı şoku proteinleri, vitamin A, C, E) ve diğer moleküllerdir.

Glutatyon ve glutatyon bağımlı enzimler (GST gibi) ROS'lara karşı hücre savunma hattında görev alırlar. Glutatyon sistemi sadece antioksidan savunma sisteminde görev almakla kalmaz; aynı zamanda moleküler, hücresel ve organizma düzeyinde birçok süreçlerde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, glutatyon sisteminin işleyişindeki bir bozukluk kanser ve karaciğer hastalıklarını da içeren çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olabilir (Baltruskeviciene et al. 2016).

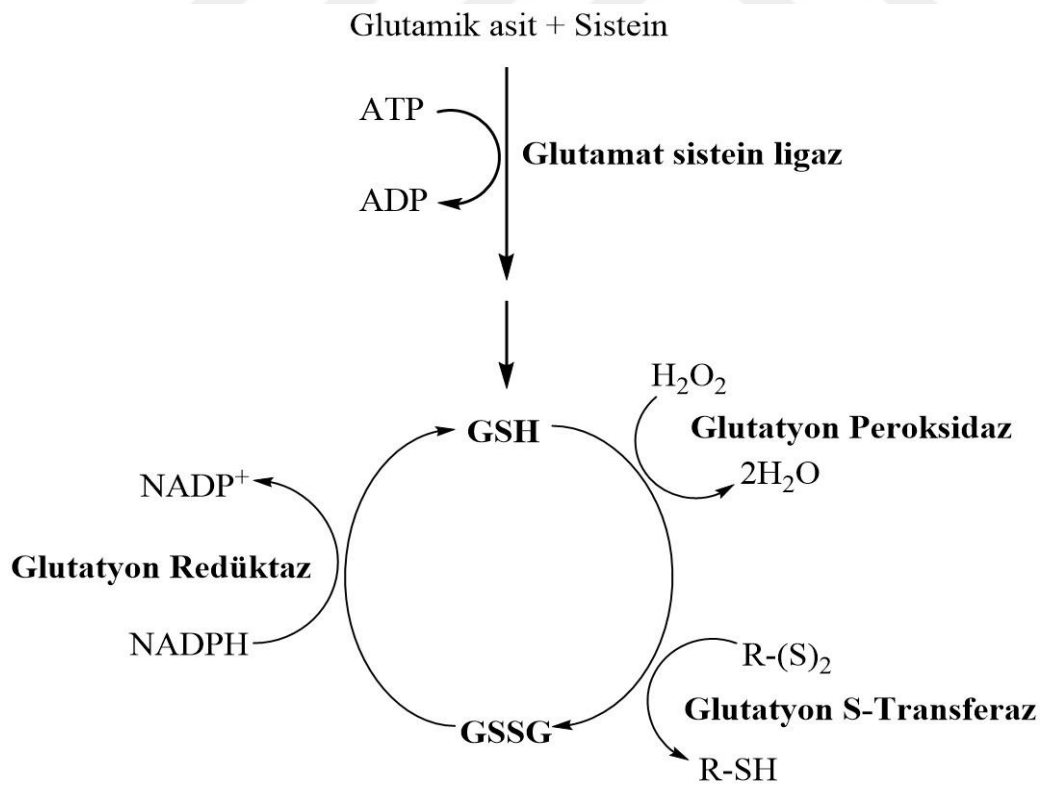
1.2.1. Glutatyon

Hücrenin antioksidan savunmasında görev yapan glutatyonun (GSH) aktif grubu, sistein kalıntısındaki tiyol (-SH) grubudur (Şekil 1.5). Glutatyon (L-γ-glutamil-L-cysteinylglycine, GSH) en önemli hücresel antioksidan sistemlerinden birinin kalbidir. Glutatyonun indirgenmiş formu (GSH) reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin etkilerini gidererek redoks homeostazının kontrolünü sağlamaya katkıda bulunur. Birçok sistein içeren molekül gibi glutatyon da kolayca oksitlenir (Şekil 1.6). İki glutatyon arasında bir disülfit köprüsü meydana gelerek yükseltgenmiş formu olan okside glutatyon (GSSG) meydana gelir. ROS bir GSH molekülüne bir elektron bağışladığı zaman dimer oluşumu meydana gelir, glutatyon özellikle tiyollere karşı reaktif hale gelir. GSH/GSSG oranı organizma için çok önemlidir ve bu oran 30:1 ile 100:1 arasında değişiklik gösterebilir. Glutatyonun -SH grubu çok güçlü nükleofilik özellik gösterir ve çok değişik moleküllerle konjuge olabilir. Kükürt çok farklı oksidasyon hallerinde bulunabilir (-2,-1,0,+2,+4 ve +6) ve GSH'a kirleticiler, karsinojenler ve ilaçlarla konjuge olabilmesi için nükleofilik esneklik sağlar. GSH Glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz ve Gliyoksalaz gibi antioksidan enzimler için bir elektron vericisi (kofaktör) olarak hizmet edebilir . GSH, tek başına ya da vitamin C ve E gibi diğer antioksidan moleküllerle birlikte ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu sağlar (Baltruskevicien et al. 2016).



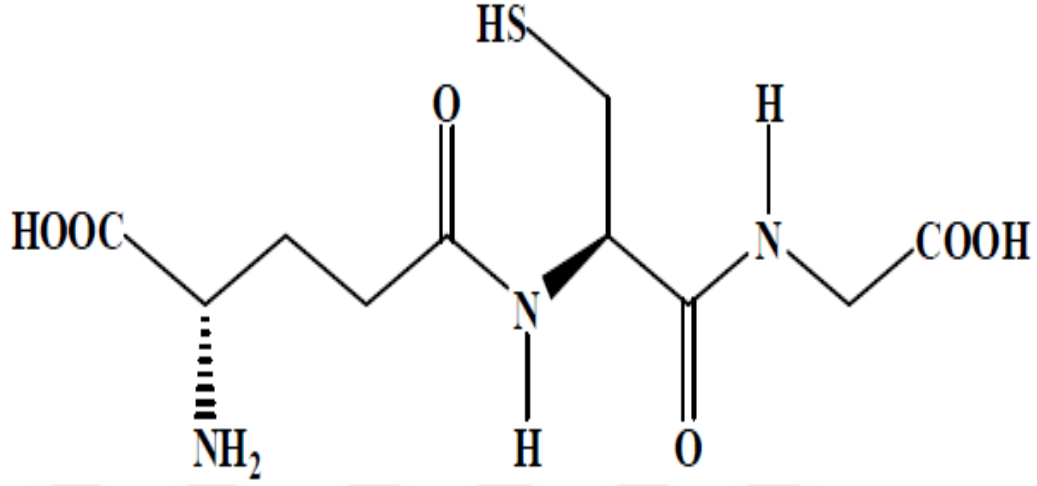
Şekil 1.5. GSH'nin moleküler yapısı (Champe and Harvey 1997)

GSH'daki sistein rezidüsü DNA ve histonların metilasyonu için bir kofaktör olarak görev yapan S-adenosilmetiyoninin sentezi için kullanılan aynı homosistein havuzundan sentezlenir (Hitchler and Domann 2007).

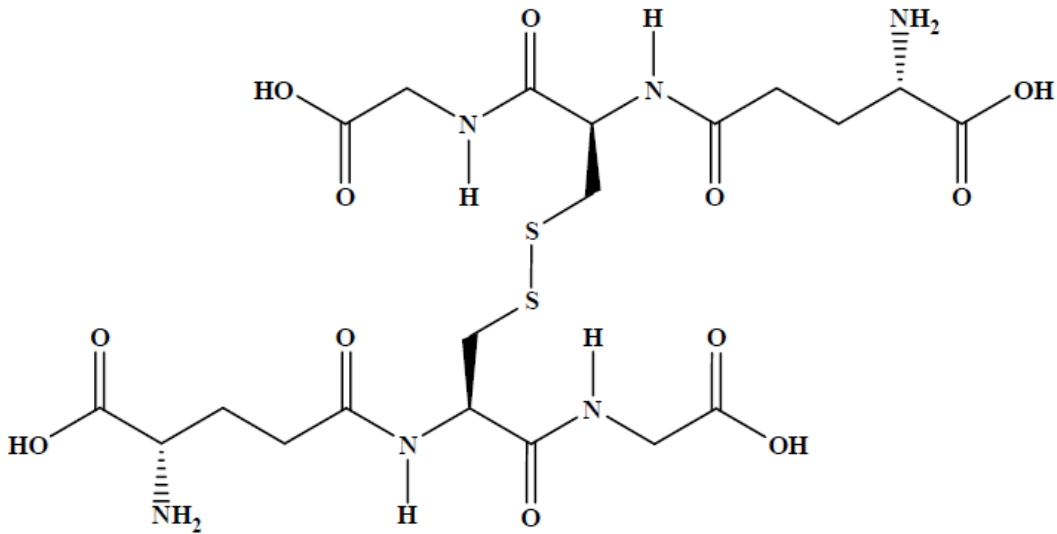


Şekil 1.6. Glutatyonun sentezi, geri kazanımı ve kullanımı (Liang, Sheng et al. 2011)

Glutatyon hücrede indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) olmak üzere iki formda bulunur (Şekil 1.7 ve Şekil 1.8).



Şekil 1.7. Redükte Glutatyonun Yapısı (GSH)

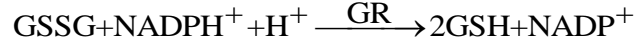


Şekil 1.8. Okside Glutatyonun Yapısı (GSSG).

1.2.2. Glutatyon Redüktaz (GR)

Glutatyon redüktaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında oksitlenmiş glutatyonu (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüştürür. Yüksek GSH konsantrasyonu ve düşük GSSG konsantrasyonu organizmanın yaşamı için

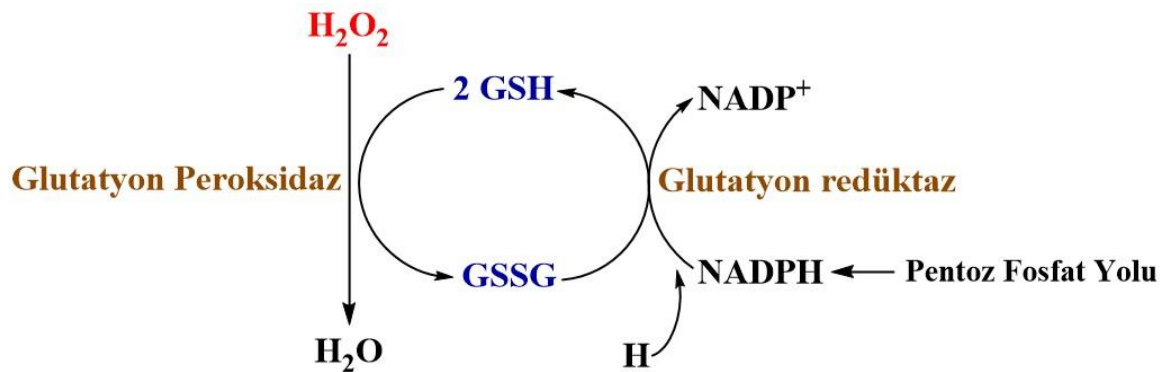
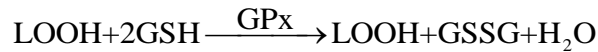
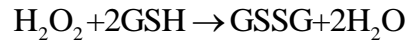
gereklidir. GSH, protein sülfidrillerinin oksidasyonunu geri yönlendirir. Yüksek GSSG düzeyleri protein sülfidrilleriyle reaksiyona girer ve proteinleri inaktive eden karışık GSH-protein sülfidrilleri oluşturur. Glutasyon redüktaz sitoplazmada ve mitokondride yerleşmiştir (Saygılı 1997).



NADPH/NADP⁺ ve GSH/GSSG oranlarındaki değişiklikler akut prooksidan stres ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin belirtisidir (Nordberg and Arner 2001).

1.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin glutasyon tarafından indirgenmesini katalizleyen enzimdir (şekil 1.9). Selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki tipi vardır. Selenyum bağımlı olan GPx hem H₂O₂'yi hem de lipid hidroperoksitlerini (LOOH) metabolize ettiği halde, selenyumdan bağımsız GPx ise yalnızca LOOH'lerini metabolize edebilmektedir (Yalçın 1998).



Şekil 1.9. Glutasyonun Redoks Döngüsü (Antmen 2005)

1.2.4. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)

Süperoksit radikalinin hücrelere verdiği zarar göz önüne alınırsa en temel hücresel savunma hatlarından biri süperoksit dismutaz enzimidir. Prokaryotlarda Fe ve Mn-SOD bulunurken, ökaryotlarda üç formu mevcuttur:

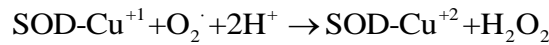
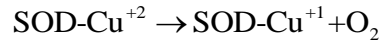
-SOD1 (CuZnSOD)

-SOD2 (MnSOD)

-SOD3 ekstrasellüler SOD (ec-SOD) (Oberley 1982).

Yapılarına bakıldığında; Mn-SOD homotetramer yapıdadır ve kalp, beyin, karaciğer, böbrek dokularında daha fazla iken, daha hafif olan CuZn-SOD memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. Ec-SOD ise en çok akciğer, uterus ve tiroid bezlerinde yoğunlaşmıştır (Kinnula and Crapo 2004, Kinnula et al. 2004).

SOD, süperoksit radikalini indirgeyerek hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşturur (Akkuş 1995, Nordberg and Arner 2001, Young and Woodside 2001).



1.2.5. Katalaz (CAT)

Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan hem enzimi olup %20 oranında sitoplazmada ve %80 oranında peroksizomlarda bulunur. Hidrojen peroksitin O_2 ve H_2O 'ya indirgenmesini katalizler (Kılınç 1985, Reiter et al. 1997).



1.2.6. Glutasyon S-Transferaz (GST)

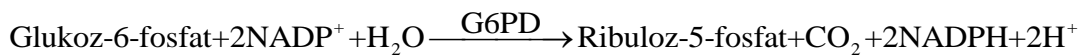
GST'ler indirgenmiş glutasyonu (GSH) çeşitli endojen ve eksojen bileşiklere katalizleyerek onların biyolojik aktivitesini azaltan, suda daha çok çözünür hale getirerek vücuttan atılmasını kolaylaştıran detoksifikasyon enzim ailesinin bir üyesidir. Bu nedenle, GST'ler yağ oksidasyonu ve oksidatif stres üretimi sonucu oluşan toksik ürünlerin kontrol edilmesinde çok önemlidir. GST, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GPx aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması gösterir. GST'ler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler GPx aktivitesi gösterirler.

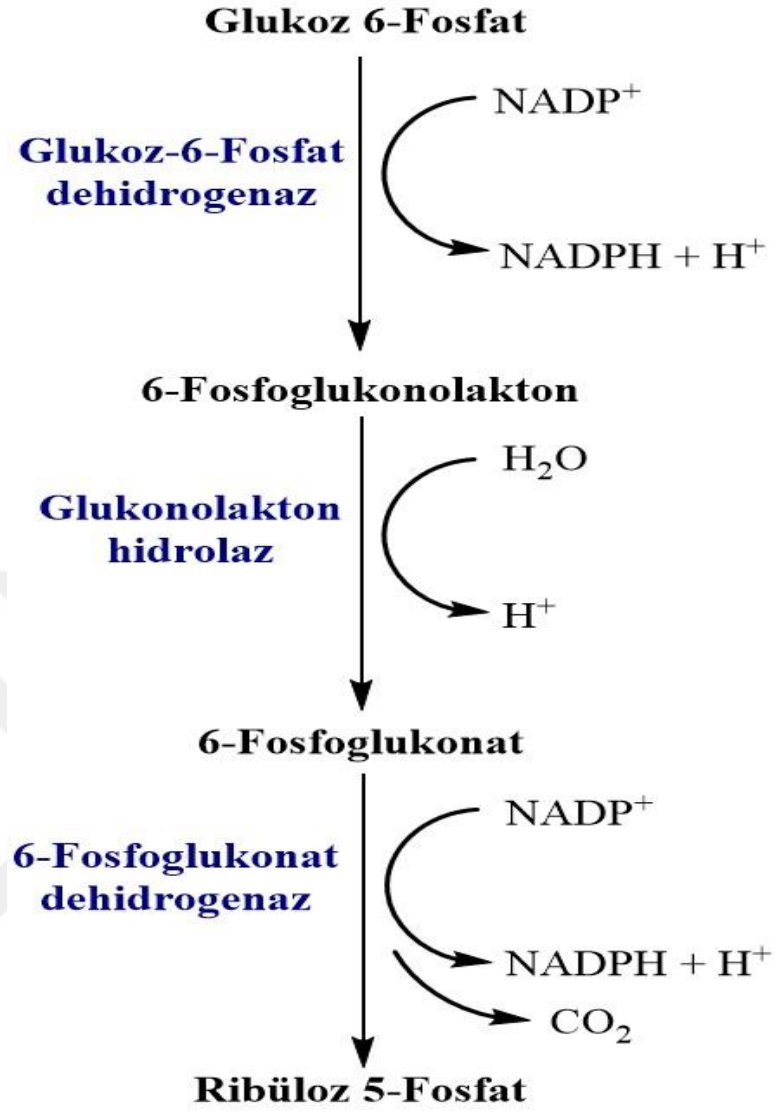


Glutasyon-S-transferazlar, glutasyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlarlar (Atlı 2009).

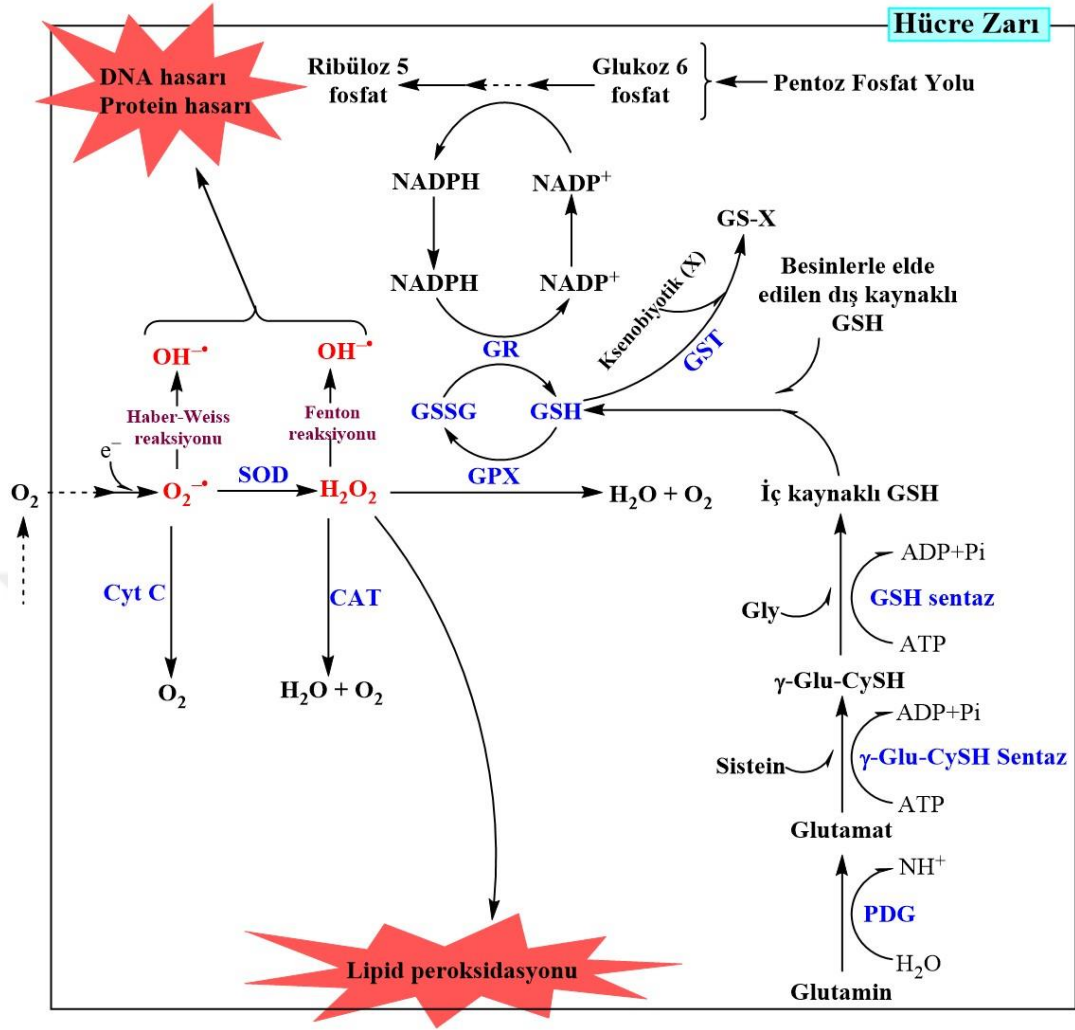
1.2.7. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

Pentoz fosfat yolunun ilk basamağını katalizleyen Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) (1.1.1.49) enzimi, pentoz fosfat metabolik yolunda sentezlenir. NADPH'ın önemli bir kısmı bu enzim tarafından sentezlenir (Şekil 1.10). Glutasyon redüktaz enziminin okside glutasyonun (GSH) indirgemesi için NADPH şarttır. Glutasyonun indirgenmiş formu (GSSH), serbest tiyol grubu ihtiva eden bir tripeptittir. Serbest tiyol grubu, hemoglobin ve eritrosit proteinlerini indirgenmiş halde tutarak sülfidril tamponu görevi görür; aynı zamanda hidrojen peroksit ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek detoksifikasyon olaylarında rol alır (Pençe vd. 2000).





Şekil 1.10. Pentoz Fosfat Yolunun Oksidatif Bölümü (Telören 2008)



Şekil 1.11. Memeli hücrelerinde antioksidan sistem (Jacob 1986) (modifiye edilmiş)

1.3. Kalpte Daha Yoğun Bulunan Antioksidan Enzimler

A- Süperoksit dismutaz (SOD)

Bu enzim serbest radikal saldırılarına karşı ilk savunma hattıdır. Kalpteki SOD oranı karaciğerdekine göre önemli ölçüde daha azdır (Ferrari et al. 1985, Ferrari et al. 1998). Organizmada iki formu bulunmaktadır: CuZnSOD ve MnSOD. Ayrıca bazı bakterilerde Fe ve Ni formlarına da rastlanılmıştır.

B- Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Selenyum bağımlı olan bu enzim serbest radikalleri önlemede görevli ikinci savunma hattıdır. Redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüşümünü katalizler. Bu sırada H_2O_2 , H_2O 'ya dönüşür. Bu enzimin insan kalbinde yoğun olduğu rapor edilmiştir (Ferrari et al. 1985; Kaul et al. 1993, Ferrari et al. 1998).

C- Katalaz (CAT)

Kalpdeki oranı düşük oranlarda olan bu enzim H_2O_2 'in H_2O 'ya dönüşümünü katalizler. GPx'ten farklı tarafı şudur ki GPx, H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonlarında etkiliyken CAT yüksek konsantrasyonlarında daha etkilidir (Freeman and Crapo 1982, Kaul et al. 1993, Singh et al. 1995).

1.4. Antibiyotikler

Mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından üretilmekle birlikte günümüzde laboratuvar koşullarında da sentezlenebilen antibiyotikler mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan, bakteriler üzerinde çoğalmalarını engelleyici ya da yok edici özelliklere sahip maddelerdir. Bu özelliklerine göre bakteriyostatik yada bakterisit antibiyotikler olarak sınıflandırılırlar (Rose et al. 2000).

Bakteriyostatik antibiyotiklerin etki spektrumu dardır, bakteriyi doğrudan doğruya öldürmez, bakteri hücrelerinin gelişmesini ve üremesini önlerler. Metronidazol, eritromisin, tetrasiklinler ve sülfonamidler bu tip antibiyotiklerdendir. Bakterisit antibiyotikler ise çok etkilidir, bakteri hücrelerini dolaysız olarak öldürürler. Penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozidler, vankomisin ve fluorokinolonlar böyle antibiyotiklere örnek olarak gösterilebilirler (Ciancio and Bourgault 1989).

Belirli bir antibiyotiğe duyarlı olan mikroorganizma türlerinin tümüne o ilacın "antimikrobiyal spektrumu" denmektedir. Sadece bir ya da birkaç bakteri türüne karşı etkili olan antibiyotiklere dar spektrumlu antibiyotikler; birden fazla sayıda bakteri ve mikroorganizma türlerine karşı etkili olanlara ise geniş spektrumlu antibiyotikler denilmektedir (Dumitrescu 2011).

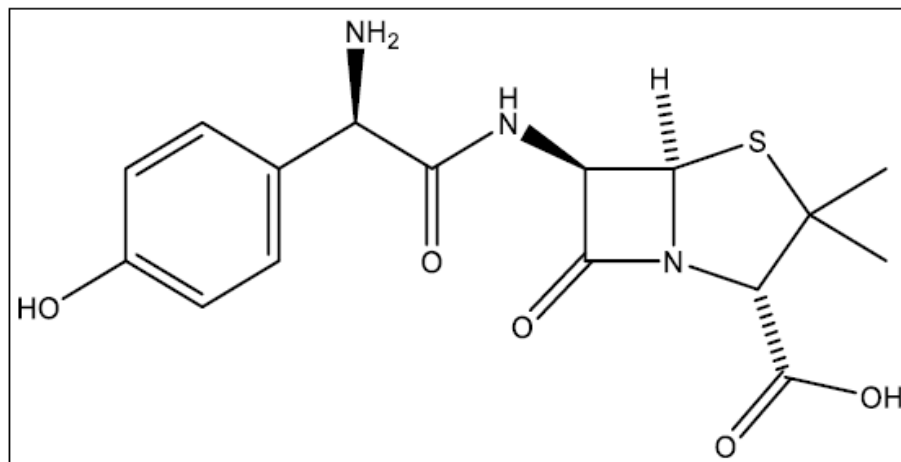
Gün geçtikçe özellikle kimyasal yollarla çeşitli antibiyotikler sentezlenmektedir. Ancak sentezlenen antibiyotiklerin faydalarının yanında çeşitli yan etkileri de bulunmakta ve bu yan etkiler organizmada hasarlar meydana getirebilmektedir. İdeal bir antibiyotikte bulunması gereken özellikleri kısaca aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

- Seçici olmalıdır, mikroorganizmalar üzerinde etkili olurken aynı zamanda konakta hasara neden olmamalıdır.
- Daha çok bakterisit etki göstermelidir.
- Bakteriyel direnç sonucunda etkisini yitirmemelidir.
- Enzimler, plazma proteinleri ya da vücut sıvıları nedeniyle etkinliğini yitirmemelidir.
- Vücutta kısa sürede biyoyararlanım göstermeli ve uzun süre etkisini sürdürebilmelidir.
- Diğer ilaçlarla etkileşimi en asgari düzeyde olmalı ve yan etki göstermemelidir (Rose et al. 2000).

1.5. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler

1.5.1. Amoksisilin

Amoksisilin, beta-laktam grubunda yer alan, ampisiline benzeyen, oral, yarı sentetik bir aminopenisilindir. Mide asidine karşı penisilinden daha dayanıklıdır. Ampisiline göre daha yüksek biyoyararlanım gösterir, kandaki en yüksek seviyesine 1-2,5 saatte ulaşır ve 8 saat etkili yoğunlukta kalır (Katzung et al. 2012).



Şekil 1.12. Amoksisilin molekülünün yapısal formülü

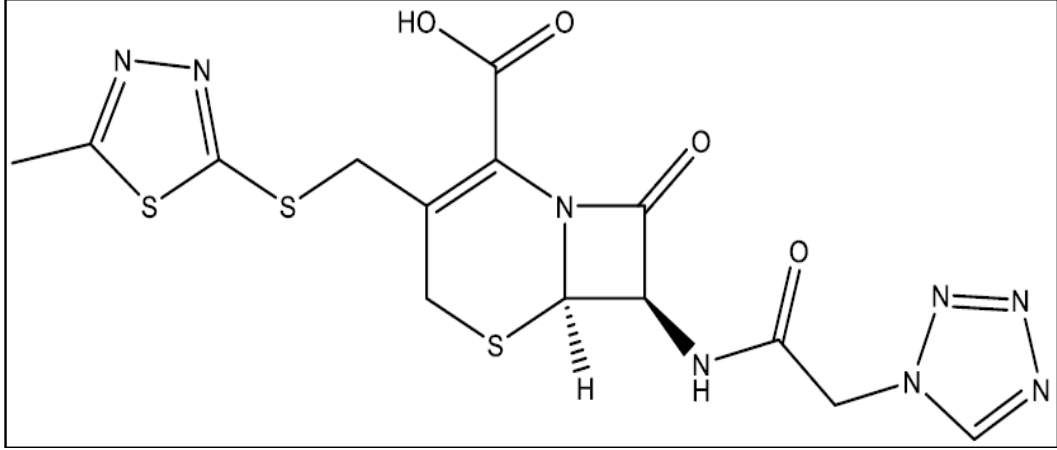
Gram (+) bakterilerin büyük bir kısmına ve Gram (-) bakterilerin bir kısmına karşı etkili bir penisilin olan amoksisilin, bakterisit etkiye sahip geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Amoksisilin, bakteri hücre duvarı içerisinde lokalize olmuş özel penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak, hücre duvarı sentezinin üçüncü ve son aşamasını engeller (Katzung et al. 2012).

Amoksisilin kullanımı sonucu alerjik reaksiyonların meydana gelebilmesi ve antibiyotiğin etkinliğini bozan bakteriyel β -laktamaza karşı gösterdiği yüksek duyarlılık diyebileceğimiz iki problem yaşanmaktadır (Horz and Conrads 2007).

1.5.2. Sefazolin Sodyum

Sefalosporin ailesinin bir üyesi olan sefazolin sodyum kimyasal yapısı, antibakteriyel etki mekanizması ve spektrumu yönünden penisiline benzeyen, onun gibi beta laktam bir antibiyotiktir (Kayaalp 2002). Etki mekanizması olarak; bakteri hücre duvarının peptidoglikan tabakasının sentezinin son basamağını (transpeptidaz reaksiyonunu) inhibe ve otolitik enzimleri aktive ederek bakterisid etki oluştururlar. Sitoplazmik membran üzerine yerleşmiş bulunan transpeptidazlara ve diğer penisilin bağlayan proteinlere karşı (PBP'lere) yüksek afinite gösterirler. Etki spektrumu içerisinde olan bakteriler arasında; esas olarak Gr (+) bakterilere karşı güçlü, Gr (-) bakterilere karşı ise orta düzeyde etkilidir. Etki spektrumundaki bakterilerden dolayı tedavi alanı çok geniştir. Aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- solunum yolu enfeksiyonları,
- safra yolu enfeksiyonları,
- idrar yolu enfeksiyonları,
- kemik ve eklem enfeksiyonları,
- yara enfeksiyonları,
- deri ve yumuşak doku enfeksiyonları,
- doğum sonrası enfeksiyonları,
- jinekolojik enfeksiyonlar,
- göz enfeksiyonları (Kemaloğlu 2011).

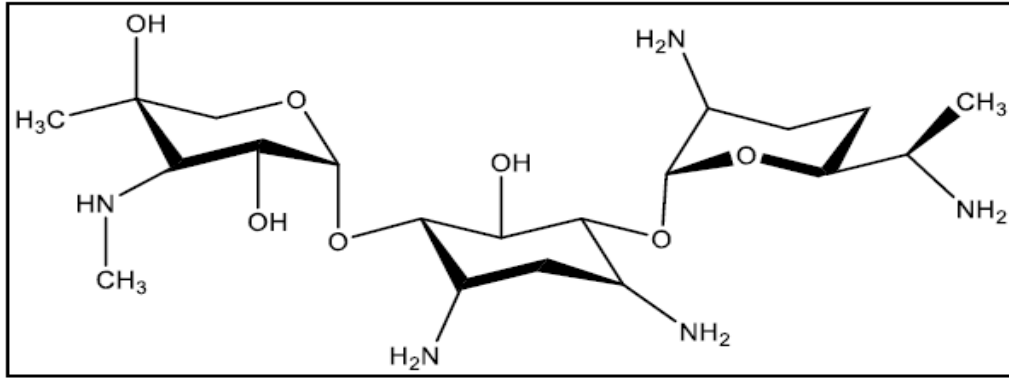


Şekil 1.13. Sefazolin sodyum molekülünün yapısal formülü

1.5.3. Gentamisin Sülfat

Gentamisin Sülfat (GM), *Micromonospora purpurea*'dan elde edilen aminoglikozid grubu antibiyotiklerin en çok kullanılan üyesidir. Aminoglikozid ilaçlar içinde, amikasinin sonra spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olanıdır (Gören 2011). Plazma proteinlerine hemen hemen hiç bağlanmaz. Toksikitesinin fazlalığı ve terapötik indeksinin düşük olması nedeniyle böbrek yetmezliği olan hastalarda dozunun ayarlanması ve mümkünse serumdaki düzeyinin izlenmesi gerekir (Başhan 2009).

Gentamisinler gram-pozitif bakterilere karşı etkili olmakla beraber genellikle hayatı tehdit edici Gram-negatif bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Kimyasal stabilite ve hızlı bakterisidal etkilerinden ötürü çeşitli klinik durumlarda ilk basamak ilaç olarak sıklıkla kullanılırlar (Walker and Shah 1988, Ali 1995, Paterson et al. 1998, Maldonado et al. 2003). Bununla birlikte, bu antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonları nefrotoksiktir ve akut böbrek yetmezlikli olguların %10-20'sinden sorumludur (Walker and Shah 1988, Ali 1995, Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999, Erdem vd. 2000).



Şekil 1.14. Gentamisin sülfat molekülünün yapısal formülü



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Antibiyotiklerin enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri ile ilgili literatürde *in vivo* ve *in vitro* çeşitli çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda kullandığımız antibiyotiklerle ilgili kalp dokusunda yapılan bir çalışmaya rastlayamasak da diğer dokularda çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar daha çok enzim aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar olup kantitatif gen ve protein ekspresyonu çalışmaları bu ilaçlarla pek yapılmamıştır.

Yapılan bir tez çalışmasında sıçan akciğer ve kalp dokularından saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaçların *in vivo* ve *in vitro* etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları şu şekildedir: furosemid, gentamisin, levofloksasin, sefazolin, seftazidim, sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin ilaçları akciğer dokusu G6PD, 6PGD ve GR enzimlerini inhibe etmiştir. Kotininin yüksek konsantrasyonlarda G6PD ve 6PGD enzimlerini aktive ederken, GR enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Sıçan kalp dokusundan saflaştırılan G6PD, 6PGD ve GR enzimlerin aktivitesi üzerine de digoksin, dopamin, furosemidin inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. Adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl ilaçlarının inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Levofloksasin ilacının her iki dokudaki üç enzimin aktiviteleri üzerinde *in vivo* etkisi araştırılmış ve ilacın enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkisi tespit edilmemiştir. Furosemidin kalpte üç enzim üzerinde *in vivo* olarak etkisi gözlenmezken, akciğerde G6PD enzimini aktive ettiği, GR enzimini de inhibe ettiği, 6PGD enzimi üzerinde de herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir (Adem 2011).

Bir makrolid grubu antibiyotik olan azitromisin yaygın olarak solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve cinsel yolla bulaşan hastalıkların ayakta tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir (Gowtham et al. 2014). Eritromisin ve klaritromisin kardiyal aritmi riskini arttıran başlıca makrolid antibiyotiklerdir (Bril et al. 2010). 2012 yılında Ray ve arkadaşları (Ray et al. 2012), yetişkinler, ağırlıklı olarak kadınlar ve medicaid hastalar arasında yaptıkları bir çalışmada; amoksisilin ile birlikte kullanılan azitromisinin kardiyovasküler ve tüm sebeplere bağlı ölümlerdeki risk oranını

arttırdığını rapor etmişlerdir (Wynn 2013). Genç ve orta yaşlı bireyler arasında yapılan başka bir çalışmada ise Danimarkalı araştırmacılar penicilin V ile birlikte alınan azitromisinin kardiyovasküler sebeplerden kaynaklanan ölümlerde risk oluşturmadığını kaydetmişlerdir (Svanstrom et al. 2013).

Pei-Yi Li ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada amoksisilinin DNA üzerindeki etkilerini incelemek maksadıyla tek hücre jel elektroforezi metodunu kullanmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre; ilaç uygulanmasından sonra 30 dakika içerisinde serbest radikallerin hızlı bir şekilde arttığını ve oksidatif stres meydana geldiğini rapor etmişlerdir (Li et al. 2007).

Siklofosfamid bazı kötü huylu tümörlerin tedavisinde intravenöz ya da ağızdan tablet şeklinde uygulanan nitrojen mustard grubu antineoplastik bir ilaçtır. Çetik ve arkadaşları (Çetik vd. 2015), siklofosfamid uyguladıkları sıçan kalp dokusunda oluşan oksidatif strese karşı karvakrolun koruyucu etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda sıçan kalp dokusunda total glutatyon oranının azaldığını ve MDA oranının arttığını gözlemlemişlerdir.

Dokсорubisin (Adriamisin) kemoterapide kullanılan güçlü bir antibiyotik olmasıyla birlikte kalp dokusunda oksidatif stres oluşturduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. sıçan kalp dokusunda dokсорubisin uygulamasının yaptığı hasara karşı Centella asiatica'nın koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre; kontrole kıyasla ilaç uygulanan grupta GSH seviyesi ile CAT, SOD, GPx ve GST düzeyinde anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Gnanapragasam et al. 2004). Diğer bir çalışmada dokсорubisin uygulanan sıçan kalp dokularındaki toksisiteye karşı üzüm çekirdeği ekstraktının ve vitamin E'nin iyileştirici etkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre Dokсорubisin uygulanan gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında lipit peroksidasyon oranında (MDA) önemli derece yükselme olurken, antioksidan enzimler olan CAT, SOD, GPx ve GST düzeylerinde ve GSH seviyesinde anlamlı derecede azalma olduğu tespit edilmiştir (Al-Sowayan 2014). Dokсорubisin ile yapılan başka bir çalışmada fare kalp dokularında oluşan oksidatif strese karşı doksisiklinin koruyucu etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre dokсорubisin uygulanan grup kontrol grubu ile kıyaslandığında SOD ve GPx enzim seviyelerinde anlamlı bir şekilde düşüş gözlemlenmiştir (Lai et al. 2010).

Yin ve arkadaşları fare kalp dokusunda adriamisin'in etkilerini inceledikleri çalışmada şu sonuçları kaydetmişlerdir: Adriamisin uygulaması Cu-Sod, Zn-Sod, Gpx, katalaz ve g-glutamilsistein sentetaz (g-GCS) m-RNA seviyelerinde artışa neden olmuştur. Diğer yandan katalaz ve (g-GCS) enzim seviyelerinde artış meydana gelirken toplam GSH seviyesinde azalma meydana gelmiştir. Bu sonuçlar da göstermektedir ki gen ekspresyonunun artışı bütün antioksidan enzimlerde artışa neden olmamıştır. Cu, Zn-süperoksit dismutaz, Mn-süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerinde ise önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir (Yin et al. 1998).

Cisplatin kemoterapide kullanılan çok güçlü bir antitümör ilaçtır. Çeşitli kanserlerin (Kuhlmann et al. 1997, Weijl et al. 1997) tedavisindeki yararlı etkilerinin yanında yüksek dozda kullanımı vücutta çeşitli organlarda toksisiteye neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada cisplatinle indüklenen sıçan kalp ve karaciğer dokularında meydana gelen oksidatif strese karşı ellagic asidin koruyucu etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre kalp ve karaciğer dokularında cisplatin kullanımına bağlı olarak MDA seviyesi yükselirken GPx, SOD ve CAT seviyelerinde düşüş gözlenmiştir (Yuce vd. 2007).

Ghoneim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (Ghoneim et al. 2016) İsoptererenol uyguladıkları sıçan kalp dokusundaki oksidatif strese karşı *Adansonia digitata*'nın koruyucu etkilerini incelemişlerdir. İsoptererenol, adrenalin gibi güçlü bronş genişletici etkili olan ancak damarlarda genişlemeye neden olan sentetik bir ilaçtır. Çalışmanın sonucunda kontrol grubuna kıyasla ilaç uygulanan grupta GPx enzim seviyesinde ve GSH düzeyinde anlamlı ölçüde ($P < 0,05$) azalma tespit etmişlerdir. Selçuk ve arkadaşlarının Vareniclin ile yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre; Vareniclin uygulanan sıçan kalp dokularında kontrol grubuna göre MDA seviyesi anlamlı şekilde yükselirken CAT ve GPx düzeylerinde ve GSH seviyesinde anlamlı derecede azalma olduğu tespit edilmiştir (Selcuk vd. 2015).

Bleomisin potansiyel antitümör aktivitesi nedeniyle kemoterapide kullanılan güçlü bir antibiyotiktir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada bleomisin ile indüklenen sıçanlarda akciğer fibroza bağlı akut kalp yetmezliği tedavisinde Levosimendan'ın etkileri incelenmiştir. Sıçanlar; kontrol grubu (C) Bleomisin grubu (BL) ve Bleomisin+Levosimendan (BL+L1, BL+L2 ve BL+L3) olarak gruplara ayrılmıştır.

Çalışmanın sonuçları şu şekilde gerçekleşmiştir: BL uygulanan grupta C grubuna kıyasla GR, G6PD, 6PGD ve CAT enzimlerinin aktivitelerinde anlamlı şekilde düşüş yaşanmıştır ($p < 0,05$). Bununla birlikte BL+L1, BL+L2 ve BL+L3 grupları BL grubuna kıyaslandığında bu enzim aktivitelerinin miktarlarında doza bağlı olarak genellikle anlamlı olarak artış olduğu görülmüştür ($p > 0,05$) (Gurbuzel vd. 2016).

Çalışmada kullandığımız antibiyotiklerle ilgili yaptığımız literatür taramasında kalp dokusu üzerindeki enzim aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalara rastlayamadık. Bununla birlikte özellikle gentamisin sülfat ile ilgili çeşitli çalışmalar yapıldığını gördük.

Böbrek dokusunda gentamisinin neden olduğu oksidatif strese karşı likopenin koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre; böbrek dokusunda kontrole kıyasla ilaç uygulanan gruplarda MDA seviyesi hızla yükselirken GPx ve CAT düzeylerinde anlamlı bir şekilde azalma meydana gelmiştir. Bununla beraber kontrol grubu ile kıyaslandığında GSH seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Karahana vd. 2005).

Sıçan böbrek dokusunda yapılan başka bir çalışmada ise gentamisinin neden olduğu oksidatif strese karşı rosmarinic asidin koruyucu etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında kontrol grubuna kıyasla gentamisin uygulanan gruplarda MDA seviyesinde düşüş gözlenirken GPx, SOD ve CAT seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir (Tavafi and Ahmadvand 2011).

Normal insan melanositleri (Hemn-DP) hücrelerindeki antioksidan enzim aktiviteleri üzerine gentamisinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada kontrol grubuna kıyasla gentamisin uygulanan gruplarda konsantrasyona bağlı olarak SOD aktivitesinde anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir ($p < 0,005$). Bununla birlikte; CAT enzim aktivitesinde gentamisin uygulanan gruplarda kontrole kıyasla konsantrasyona bağlı olarak düşüş gözlenmiştir ($p < 0,05$). GPx enziminde ise gentamisin uygulanan grupta artan konsantrasyona bağlı olarak önce artış gözlenirken daha sonra anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir ($p < 0,005$) (Wrzesniok et al. 2015).

Karahana ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise; cisplatin ve gentamisinin kan ile karaciğerde oluşturabilecekleri oksidatif stresi belirlemek ve likopenin iyileştirici bir etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılmıştır. Tek doz cisplatin uygulanan

sıçanlarda plazma MDA ve kan GSH ile karaciğer MDA düzeylerinde önemli artışların olduğu, buna karşın cisplatin uygulamasını takiben likopen verilen grupta bu değerlerin kontrol değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir. Karaciğer GSH düzeylerinde ise kontrol grubuna göre bir farklılık olmadığı görülmüştür. Gentamisin uygulaması yapılan sıçanlarda ise yalnızca plazma MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre bir artış belirlenirken, karaciğer MDA ve GSH ile kan GSH düzeylerinin değişmediği tespit edilmiştir. Diğer yandan, likopenle birlikte gentamisin uygulanan grupta ise plazma MDA düzeylerinin kontrol değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, sıçanlarda gentamisin uygulamasının kan ve karaciğerde oksidatif stres oluşumunu önemli ölçüde etkilemediği, buna karşın cisplatin uygulamasının ise oksidatif stresi artırdığı ve likopen uygulamasının ise artan oksidatif stresi engelleyebileceği kanaatine varılmıştır (Karahan vd. 2006).

Antibiyotiklerin dokulardaki gen ve protein ekspresyonu ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Yapılan bir çalışmada Streptozotocin ile indüklenen diyabetik farelerin kalp dokularında gen ekspresyonu sonuçlarına göre GPx-3 seviyesinde anlamlı bir şekilde artış olduğu gözlemlenmiştir (Iwata et al. 2006).

Başka bir çalışmada isoproterenol uygulanan sıçan kalp dokusunda bis (aspirinato) zinc (II) [Zn(ASA)₂]'nın koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmada yapılan gen ekspresyonu sonuçlarına göre; katalaz ve sitokrom c oksidazın mRNA seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bununla beraber Sod-1, GPx-4 ve Na⁺/K⁺/ATPase mRNA seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Korkmaz-Icoz vd. 2016).

Doksorubisin ile yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre ise ilaç uygulanan farelerin kalp dokularında kontrol grubuna göre GPx-1 geninin baskılandığını gözlemlemiştirlerdir (Xiong et al. 2006).

Literatür taramamız sonucunda çeşitli antibiyotiklerin gerek kalp gerekse diğer dokular üzerindeki etkileri özellikle enzim aktiviteleri açısından çokça çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız antibiyotiklerle ilgili de özellikle böbrek dokusundaki nefrotoksisiteleri ile ilgili çalışmalar olsa da kalp dokusu üzerindeki etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlayamadık. Bu bakımdan çalışmamızın özgün bir değer taşıdığını ve literatüre önemli bir katkı sunacağını düşünmekteyiz.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Temin Edildiği Firma
Amonyum sülfat	E.Merck AG
Antikorlar	Santa Cruz Biyoteknoloji
Asetik asit	E.Merck AG
Coommassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Etanol	Sigma
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Fluka
FastStart TaqMan Probe Master	Roche
Gliserol	Sigma
Glisin	E.Merck AG
Glutaraldehit	Sigma
Hidroklorik Asit	E.Merck AG
İzopropanol	E.Merck AG
L-Glutamat	Sigma
Metanol	E.Merck AG
N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)	Sigma
N,N'- metilen bisakrilamid	Sigma
Okside glutatyon (GSSG)	Sigma
Poliviniliden diflorüd membran (PVDF)	Macherey-Nagle
Potasyum fosfat	E.Merck AG
Primerler	Metabion
Protein marker	BioRad 0375
Protein marker V	peqGOLD/peqlab
QIAzol lysis Reagent 50 ml	Qiagen
Redükte glutatyon (GSH)	Sigma
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50)	Qiagen
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	E.Merck AG
Sodyum fosfat	E.Merck AG
Sodyum hidroksit	Riedel de Haen
Sodyum klorür	E.Merck AG

Çalışmamızda kullanılan diğer kimyasallar Sigma Chemical Comp.'den veya E. Merck AG'den temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

CİHAZ	MARKA ve MODEL
Buzdolapları	Siemens
Derin dondurucu(-85°C'ye kadar)	New Brunswick Premium U410
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	Sanyo Madical Freezer
Elektroforez tankı	Bio Rad (dikey)
Görüntüleme cihazı	Chemiluminescence/Fluorescence - Fusion-FX
Güç kaynağı	1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Hassas terazi	Gec Avery
Homojenizatör	TissueLyser II
Kar makinesi	Scotsman AF-20
Karıştırıcı(Shaker)	GFL 3025
Karıştırıcı(Vorteks)	Fisons Whirlimixer
Magnetik karıştırıcı	Chilten Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Mikrodalga Fırın	Beko MD 1500
Nanodrop	Thermo Scientific, Multiskan GO, USA
Otoklav	HMC Hirayama
Otomatik pipet	Eppendorf
PCR	Bio Rad C1000 thermal Cyclers
pH metre	Thermo Scientific Orion Star A211
Qiacube (RNA İzolasyon Robotu)	Qiagene 31
Real-Time PCR	Stratagene
Saf su cihazı	Barnstead Easy Pure UV/UF
Soğutmalı satrifüj	Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	Beckman Coulter
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio Rad
Vorteks	Wisd WiseMix VM-10

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

3.1.3.1. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

3.1.3.1.a. Glutatyon Redüktaz (GR)

- 1- 0,1 M Potasyum fosfat çözeltisi (pH: 7,5): 50 ml için 0,68 gr K-Fosfat (mono bazik) 40 ml saf suda çözüldü pH'sı 7,5'e ayarlandı. Son hacim 50 ml'ye tamamlandı.
- 2- 2 mM NADPH: 0,0083 gr NADPH alındı ve hacmi saf su ile 5 ml'ye tamamlandı.
- 3- 20 mM GSSG: 0,122 gr GSSG alındı, hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.1.b. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

- 1- Aktivite ölçüm tamponu: 5 mM EDTA içeren 1M Tris/HCl (pH:8) 0,0935 gr EDTA ve 6,05 gr Tris 40 mL saf suda çözüldü. pH'sı HCl ile 8'e ayarlandı. Son hacim 50 ml'ye tamamlandı.
- 2- 20 mM GSH: 0,061 gr GSH alındı ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 3- 2mM NADPH: 0,0083 gr NADPH alındı, hacmi saf su ile 5 ml'ye tamamlandı.
- 4- 10 EÜ/mL GR: 500 EÜ/mL kullanıldı.50 kat seyreltildi. 20 µL alınıp 1000 µL'ye tamamlandı.
- 5- 7 mM t-bütil hidroperoksid: 9,61 µL alınıp 10 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.1.c. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

- 1- 50 mM Tris/HCl (pH:8): 0,3 gr Tris alındı 40 mL saf suda çözüldü pH'sı HCl ile 8,0'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
- 2- 6 mM G6P: 0,091 gr G6P alındı ve hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
- 3- 2 mM NADP⁺ : 0,0153 gr NADP⁺ alındı ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.1.d. Glutatyon S-Transferaz (GST)

- 1- 100mM K-Fosfat pH:6,5: 1,36 gr K-fosfat (mono bazik) alındı, 80 ml saf suda çözüldü. pH 6,5'e ayarlandıktan sonra saf suyla son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
- 2- 20 mM GSH: 0,061 gr GSH alındı ve hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 3- 25 mM CDNB: 0,0506 gr CDNB alındı ve hacmi etil alkol ile 10 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.1.e. Katalaz (CAT)

- 1- 50 mM K-Fosfat (pH:7) : 0,68 gr KH_2PO_4 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH 7'ye ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
- 2- HPx çözeltisi: 7 μL %30'luk H_2O_2 toplam hacmi 5 ml olacak şekilde saf su ile hazırlandı.

3.1.3.1.f. Süperoksit Dismutaz (SOD)

- 1- Ksantin stok çözeltisi (3mmol/L) : 0,046 gr ksantin alındı ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 2- EDTA (0,10mmol/L): 0,022 gr EDTA hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 3- NBT: 12,3 mg NBT hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 4- Na_2CO_3 : 4,24 gr Na_2CO_3 hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 5- BSA: 25 mg BSA alındı ve son hacim 25 ml olacak şekilde saf suda çözüldü.
- 6- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2,643 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alındı ve son hacim 10 mL olacak şekilde suda çözüldü.
- 7- Ksantin oksidaz çözeltisi: Ksantin oksidaz enziminin son konsantrasyonu 167 EU/L olacak şekilde (0,167 EU/ml) soğuk (buzlu) amonyum sülfat (2M) ile seyreltildi.
- 8- CuCl_2 (0,8 mM): 0,85 gr CuCl_2 20 ml suda çözüldü.

Reaktif karışımı:

5mL ksantin çözeltisi,45 ml saf su,25 ml EDTA, 25 ml NBT, 15 ml Na_2CO_3 , 7,5 ml BSA.

3.1.3.1.g. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

1. Coomassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlıkta muhafaza edildi.

3.1.3.1.h. Glutasyon Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

1. %5'lik TCA: 5 gr TCA alındı ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı

2. 1,25 M Na₂CO₃: 0,1325 g Na₂CO₃ 8 ml saf suda çözüldü ve son hacmi 10 ml'ye tamamlandı.
3. 200 mM KH₂PO₄/50 mM EDTA (pH:7,5): 2,72 g KH₂PO₄, 1,46 g EDTA alınıp 80 ml saf suda çözüldü. pH'sı NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
4. 2 mM NADPH Çözeltisi: 8,3 mg NADPH alınarak bir miktar saf suda çözüldü. Saf suyla 5 ml'ye tamamlandı.
5. 6 mM DTNB: 0,0172 g DTNB alınarak 10 ml 200 mM KH₂PO₄/50 mM EDTA (pH: 7,5) tamponunda çözüldü.
6. 0,5 EÜ/ml GR (mayadan saflaştırılmış): 100 EÜ/ml'lik GR'dan 5 µL alınıp saf suyla 1000 µl'ye tamamlandı.
7. 2 mM GSSG Çözeltisi (standart grafik hazırlamak için): 6,188 mg okside glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözüldü, toplam hacim saf suyla 5 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.1.1. Western-Blot Analizi için kullanılan çözeltiler

1. RIPA Tamponu: 5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,876 g NaCl, 0,5 g sodyum deoksikolat, 0,1 g SDS, 0,2 ml 0,5 M EDTA, 0,042 g NaF, 0,0174 gr PMSF karıştırılarak son hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.
2. 5xSDS-PAGE Yükleme Çözeltisi (western blot için): 2,5 ml Tris/HCl çözeltisi, 0,771 g DDT, 0,05 g brom fenol mavisi, 5 ml %50 gliserol, 1 g SDS alınıp hacim destile su ile 10 ml'ye tamamlandı. -20°C'de saklandı.
3. 1xTransfer Çözeltisi: 10x transfer çözeltisinden 100 ml alındı ve 700 ml destile su ve 200 ml metanol ilave edilerek toplam hacim 1 litreye tamamlandı.
4. 10xTBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris 900 ml destile su içinde çözüldü. 1M HCl ile pH: 7,4 e ayarlandı ve hacim destile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklav edildi.
5. 10xTransfer Çözeltisi: 29 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS 900 ml destile suda çözüldü ve pH 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
6. TBST: 10xTBS den 100ml alındı ve 900 ml destile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra 1 ml Tween-20 ilave edildi.
7. %5'lik yağsız süt tozu (skim milk powder): 5 gr süt tozu alınarak 95 ml saf suda çözüldü.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Etik Kurul Raporunun Temini

Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nca onaylanan etik kurulu raporu temin edildi.



Sayı : 36643897-70
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

T.C. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ Fen Fakültesi Dekanlığı	
Tarih :	26.03.2014
Kayıt No :	74
Dotyz No :	7891

20.03.2014
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 18.03.2014 tarih ve 55885869-406 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Melda ŞİŞECİOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında ve Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarında yürütülecek olan "Gentamisin, Fenoksimetil Penisilin ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Karaciğer ve Böbrek Glutasyon Redüktaz Enziminin Aktivite, Protein ve Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 19.03.2014 tarih ve 2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 55 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

M.Şişeci
Mol. Biy. ve Gen. Bşl. Boda:na
24 Mart 2014

Doç. Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ
Başkan Vekili

Toplantı Tarihi : 19.03.2014

Toplantı Sayısı : 2

KARAR NO : 55- Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Melda ŞİŞECİOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında ve Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarında yürütülecek olan "Gentamisin, Fenoksimetil Penisilin ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Karaciğer ve Böbrek Glutasyon Redüktaz Enziminin Aktivite, Protein ve Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Fen Fakültesi Dekanlığının 18.03.2014 tarih ve 55885869-406 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-231 47 30 Fax : 0-442-231 55 63 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr

26 Mart 2014

3.2.2. Çalışmada Kullanılacak Farelerin Temin Edilmesi

Çalışmalarda kullanmak üzere toplam 20 adet C57BL/6 erkek fare Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

3.2.3. İlaçların Uygulanması ve Dokuların Temin Edilmesi

Çalışmalar için temin edilen 20 adet fare ağırlıklarına göre 4 gruba ayrıldı. İlaçların adından yola çıkarak gruplar amoksisilin grubu, gentamisin grubu ve sefazolin sodyum grubu olmak üzere isimlendirildi. Gruplardaki farelere 6 gün boyunca ilaçlar 100 mg/kg dozlarda Tablo 3.3'de verildiği şekilde ayarlanarak intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı yolla fizyolojik serum uygulandı.

Tablo 3.3. Farelere verilen ilaçların dozajları ve uygulama süreleri

Grubun Adı	Uygulanan ilaç	Farelerin ortalama ağırlıkları (gram)	Dozaj (mg/kg)	Enjekte edilen miktar (µl)	Uygulama süresi (gün)
Kontrol	Fizyolojik serum	37	100	500	6
G	Gentamisin (8 mg/1 ml)	30	100	421,5	6
A	Amoksisilin (5 mg/1 ml)	33	100	600	6
S	Sefazolin sodyum (5 mg/1 ml)	27	100	540	6

Çalışma için 6 gün boyunca ilaç uygulanan fareler eter ile anestezi edildi, eksanguinasyon ile sakrifiye edilerek, karın boşlukları abdominal insizyon ile açıldı ve kalpleri alındı. Kalp dokularının bir kısmı mRNA izolasyonunda kullanmak üzere derin dondurucuda (-86°C) saklandı.

3.2.4. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Kantitatif protein miktarı (Bradford 1976) metoduna göre belirlendi.

Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 4900 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbens değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 4900 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbens değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Numune çalışmaları için, 100 kat seyreltilmiş kalp homojenatı tüpe 100 µl alınarak üzerine 4900 µl renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbens değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi.

3.2.5. Toplam Glutasyon (tGSH), Okside Glutasyon (GSSG) ve Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

Glutasyon tayini GSH'ın DTNB tarafından okside edilmesi sonucu oluşan sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asidin absorbensinin 412 nm'de ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. GR enzimi varlığında ortamda bulunan GSSG ise NADPH'ın indirgenmesi ile GSH'a dönüştürülmektedir (Griffith 1980; Anderson 1985).

3.2.5.a. Glutasyon Tayini İçin Standart Grafik

Glutasyon tayini için GSSG kullanarak standart grafik hazırlandı. Standart grafiğin hazırlanması için çalışma tamponu ile 0,2 µM'lık GSSG stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden küvet içeriği 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12 ve 0,14 µmol GSSG olacak şekilde seyreltmeler yapıldı. Küvet içerikleri Tablo 3.4'te verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3.4. Glutatyon tayininde kullanılan standart grafik için küvet içerikleri

Çözeltiler	Kör (µL)	Numune (µL)
200 mM fosfat tamponu (50 mM EDTA içeren)	770	670
NADPH	100	100
DTNB	100	100
GSSG	-	100
200 mM fosfat tamponu (50 mM EDTA içeren)	770	670

Çalkalanır ve 30°C'de 3 dakika inkübe edilir

Glutatyon Redüktaz	30	30
---------------------------	----	----

Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C'de, 3 dakika boyunca absorbans artışı ölçüldü.

3.2.5.b. Toplam Glutatyon (tGSH) Tayini

Total GSH miktarının belirlenmesinde önce homojenat hazırlandı. Değişik miktarlardaki doku %5'lik TCA ile 1:10 oranında homojenize edilerek 10 000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. 0,3 ml süpernatant alınarak üzerine 38,7 µL K₂CO₃ çözeltisi eklenip karıştırıldı ve 10 000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kullanılarak tGSH miktarı Tablo 3.5'de verilen küvet içeriklerine göre ölçüldü.

Tablo 3.5. Toplam glutatyon tayini küvet içerikleri

Çözeltiler	Kör (µL)	Numune (µL)
200 mM fosfat tamponu (50 mM EDTA içeren)	770	670
NADPH	100	100
DTNB	100	100
Süpernatant	-	100
200 mM fosfat tamponu (50 mM EDTA içeren)	770	670

Çalkalanır ve 30°C'de 3 dakika inkübe edilir

Glutatyon Redüktaz	30	30
---------------------------	----	----

Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C’de, 3 dakika boyunca absorbans artışı ölçülür.

3.2.5.c. Okside Glutasyon (GSSG) Tayini

Okside glutasyon miktarı, tGSH miktarının ölçülmesinde kullanılan yöntem ile belirlenmektedir. tGSH tayininde hazırlanan süpernatanttan 400 µL alındı üzerine GSH’ın türevlendirilmesi için 8 µL 2-vinilpiridin eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. GSSG miktarını ölçmek için çözeltiler kör ve numune olmak üzere farklı küvetlere Tablo 3.4’teki gibi hazırlandı.

3.2.6. Gen Ekspresyonu

3.2.6.a. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Budak ve arkadaşlarının (Budak vd. 2014) metoduna göre gerçekleştirildi. Steril ependorf tüpüne dondurulmuş örnekten 50 mg koyuldu. 1 ml QIAzol reagent eklendi ve homojenizatör ile parçalandı. Homojenat üzerine 200 µL soğuk kloroform ilave edildi. 15 sn. vortekslendi ve 2-3 dk. düz bir zeminde bekletildi. 12 000 g de +4°C’de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernetantlardan 500’er µL alınarak steril ependorf tüplerine aktarıldı. Alınan üst faz RNA izolasyon robotuna yerleştirilerek RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ile izole edildi. Elde edilen RNA örneklerinde konsantrasyon belirlemek için NanoDrop spektrofotometre kullanıldı. Bir kuyuya kör olarak 2 µL RNase free water, diğer kuyulara 2 µL numune RNA’ları koyuldu. 260/280 nm dalga boyunda DNA-RNA konsantrasyonu ng/µL olarak belirlendi.

3.2.6.b. cDNA Kütüphanelerinin Hazırlanması

cDNA kütüphanelerinin hazırlanmasında SuperScript III First-Strand cDNA sentez kit’i kullanıldı (Invitrogen). Öncelikle RNA’lar konsantrasyonları 500 ng/µL olacak şekilde ddH₂O kullanılarak seyreltildi. cDNA sentezi için takip edilen prosedür Tablo 3.6’da verilmiştir.

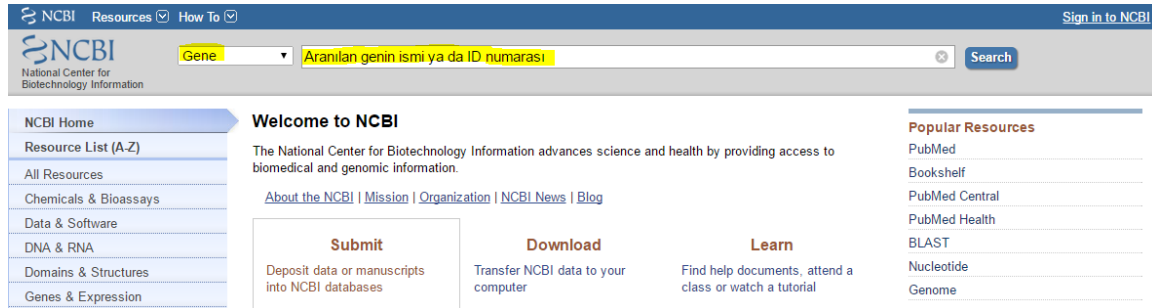
Tablo 3.6. cDNA sentezi için hazırlanan PCR bileşimi

Bileşen	Eklene Miktar
RNA (500ng/μl)	8 μl
Primer (50ng/μl randomhexamer)	1 μl
dNTP (10 mM)	1 μl
Bu karışım nazıkçe vortekslenir, 65°C’de 5 dk. inkübe edilir ve 1 dk. buzda bekletilir.	
10x RT buffer	2 μl
20 mM MgCl ₂	4 μl
0,1 M DTT	2 μl
RNase Out (40 U/μl)	1 μl
Super Script III (200 U/μl)	1 μl
PCR tüplerinde hazırlanan karışım, nazıkçe vortekslenir ve spiner kullanarak minisantrifüj yapılır.	

Karışım PCR cihazına konuldu. Cihaz 10 dk. 25°C’ye, 50 dk. 90°C’ye ve 5 dk. 85°C’ye ayarlanarak cDNA’lar sentezlendi. Hazırlanan cDNA’lar -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.6.c. Real-Time PCR İçin Primer ve Prob Dizaynı

Çalışmada kullanılan primer ve prob dizaynı için (Koçpınar 2015)’in belirttiği şekilde National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazı kullanıldı ve spesifik PCR primerleri ve probları dizayn edildi. İşlem için NCBI ana sayfası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)’na gidilerek Şekil 3.1’deki gibi ‘All databases’ bölümünden ‘Gene’ bölümü seçildi ve arama kutucuğuna gen bilgisi (kısa-uzun adı veya ID numarası) girilerek Şekil 3.2’deki organizma seçim sayfasına ulaşıldı.



Şekil 3.1. Primer ve Prob dizayn etmek için kullanılan NCBI ana sayfası

Şekil 3.2’de ilgili gen için çalışılacak organizma seçimi yapıldı. Bizim çalışmamızda fare kullanıldığından ‘Mus musculus’ seçeneği tıklanarak Şekil 3.3’deki organizmamıza ait gen bilgilerini içeren sayfaya ulaşıldı.

Gene Search

Create alert Advanced

Tabular 20 per page Sort by Relevance Send to:

Search results

Items: 1 to 20 of 5104

<< First < Prev Page 1 of 256 Next > Last >>

See also 4016 discontinued or replaced items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input type="checkbox"/> SOD1 ID: 6647	superoxide dismutase 1, soluble [Homo sapiens]	Chromosome 21, NC_000021.9 (31659622..31668931)	ALS, ALS1, HEL-S-44, IPOA, SOD, hSod1, homodimer	147450

Filters: [Manage Filters](#)

Results by taxon

Top Organisms [Tree](#)

- Homo sapiens (83)
- Mus musculus (75)**
- Rattus norvegicus (45)
- Elaeis guineensis (41)
- Camelina sativa (37)
- All other taxa (4823)
- More...

Şekil 3.2. NCBI organizma seçim sayfası

Şekil 3.3’deki sayfada aradığımız gen tıklanarak ilgili genin organik baz ve protein sekansını içeren Şekil 3.4’deki sayfaya ulaşıldı.

Gene Search

Create alert Advanced

Tabular 20 per page Sort by Relevance Send to:

Search results

Items: 1 to 20 of 75 Selected: 1

<< First < Prev Page 1 of 4 Next > Last >>

See also 12 discontinued or replaced items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input checked="" type="checkbox"/> Sod1 ID: 20655	superoxide dismutase 1, soluble [Mus musculus (house mouse)]	Chromosome 16, NC_000082.6 (90220742..90226324)	B430204E11Rik, Cu/Zn-SOD, CuZnSOD, Ipo-1, Ipo1, SODC, Sod-1
<input type="checkbox"/> Sod2 ID: 20656	superoxide dismutase 2, mitochondrial [Mus musculus (house mouse)]	Chromosome 17, NC_000083.6 (13007839..13018119)	MnSOD, Sod-2
<input type="checkbox"/> Sod3 ID: 20657	superoxide dismutase 3, extracellular [Mus musculus (house mouse)]	Chromosome 5, NC_000071.6 (52363804..52369738)	AI314465, EC-SOD

clear

Şekil 3.3. İlgili genin temel özelliklerini gösteren NCBI sayfası

Açılan sayfanın alt bölümündeki gen sekans kodu (NM_...) tıklanarak ilgili genin ayrıntılı bilgilerinin ve sekansının bulunduğu Şekil 3.5’deki sayfaya gidildi.

1. **NM_011434.1** → **NP_035564.1** superoxide dismutase [Cu-Zn]

[See identical proteins and their annotated locations for NP_035564.1](#)

Status: PROVISIONAL

Source sequence(s)	BC048874
Consensus CDS	CCDS37395.1
UniProtKB/Swiss-Prot	P08228
Related	ENSMUSP00000023707 , ENSMUST00000023707

Conserved Domains (1) [summary](#)

Şekil 3.4. İlgili genin gen ve protein sekansını gösteren NCBI veritabanı

Nucleotide Advanced

NCBI is phasing out sequence GI numbers in September 2016. Please use accession.version! [Read more...](#)

GenBank

Mus musculus superoxide dismutase 1, soluble (Sod1), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_011434.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Şekil 3.5. Gen sekansının bulunduğu veri tabanı

Şekil 3.5'deki sayfanın sol tarafında bulunan 'CDS' tıklanarak ilgili genin kodlanan bölgesi işaretlendi. Şekil 3.6'da tez kapsamında çalışılan genlerden biri olan Sod-1 genine ait kodlanan bölge koyu zeminde gösterilmektedir.

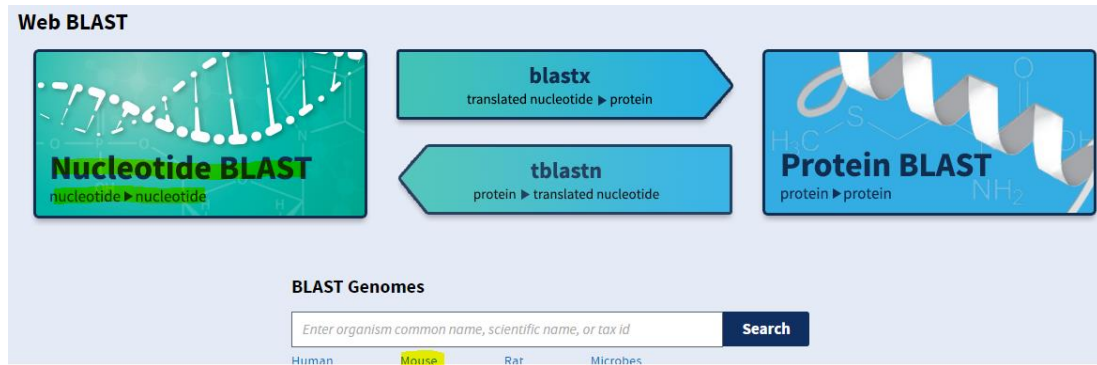
```

1 gccagggcct cgTTTTTTtg cgcggtcctt tctgCGGcg cttccgtcc gtcggcttct
61 cgtcttgctc tctctggTcc ctccggagga ggccgCCcg cgtctcccgg ggaagcAtgg
121 cgatgaaagc ggtgtGcgtg ctgaagggcg acggtccggt gcagggaaacc atccacttGg
181 agcagaaggc aagcggTgaa ccagttgtgt tGtcaggaca aattacagga ttaactgaaG
241 gccagcAtgg gttccacgtc catcagTatg gggacaatac acaaggctgt accagtGcag
301 gacctcattt taatcctcac tctaagaaac atggTggccc ggccgatgaa gagaggcAtg
361 ttggagacct gggcaatgtg actgctggaa aggacggtgt ggccaatgtg tccattgaaG
421 atcgtgtgat ctcactctca ggagagcatt ccatcattgg ccgtacaatg gtggtccatg
481 agaaacaaga tgacttgggc aaaggtggaa atgaagaaag tacaagact ggaaatgctg
541 ggagccgctt ggccctgtgga gtgattggga ttgcgcagta aacattccct gtgtggTctg
601 agtctcagac tcattctgta ccctcaaacc attaaactgt aatctgaaaa aaaaaaaaaa
661 a

```

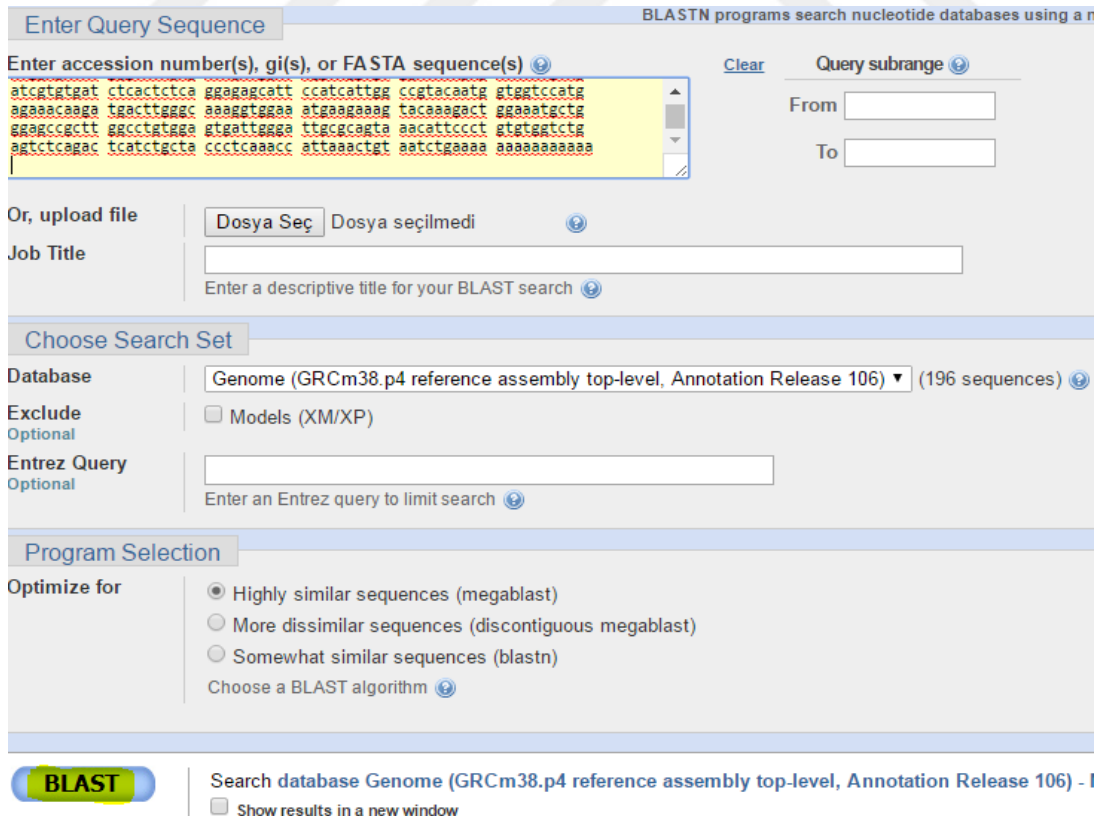
Şekil 3.6. Sod-1 genine ait kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri gösteren veritabanı

Daha sonra sayfanın üst kısmında bulunan 'FASTA' seçeniği tıklanarak boşluklar ve sıra sayıları kaldırıldı. İlgili genin organizmanın başka genleri ile homoloji oranının kontrol edilmesi için tüm gen sekansı blastlanmalıdır. Tüm gen sekansı kopyalanıp blastlama sayfasına (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gidildi ve Şekil 3.7'deki gibi organizma seçimi yapılarak Şekil 3.8'deki blast sayfasına ulaşıldı.



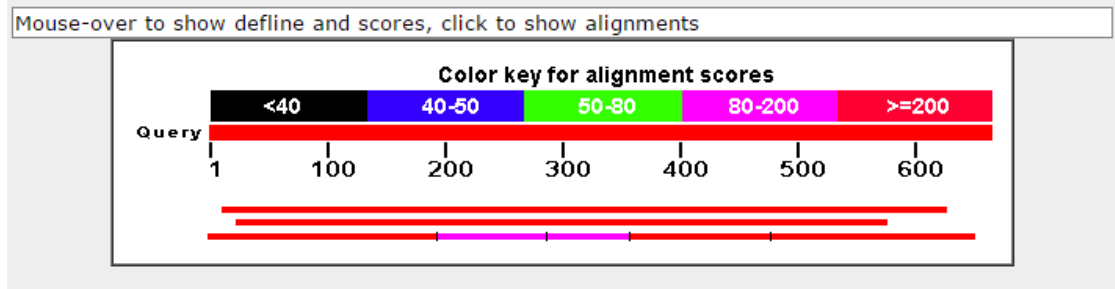
Şekil 3.7. İlgili genin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği organizma seçim sayfası

Şekil 3.8'deki sayfaya ilgili genin sekansı yapıştırılıp BLAST butonuna basıldı.



Şekil 3.8. Gen sekansının homolojisinin kontrol edildiği blast sayfası

BLAST butonuna basıldıktan sonra görüntülenen homoloji belirleme sayfası Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9. İlgili genin başka genlerle homoloji oranını gösteren sayfa

Daha sonra <http://frodo.wi.mit.edu/> sayfasına gidildi. Açılan sayfada dizayn edeceğimiz primer ve propların optimum değerleri Tablo 3.7'de verildiği gibi girilerek sayfanın en altında bulunan 'Pick Primer' butonuna basıldı.

Tablo 3.7. Dizayn edilen primer ve proplara ait optimum değer aralıkları

	Minimum baz uzunluğu	Optimum baz uzunluğu	Maksimum baz uzunluğu
Ürün boyutu aralığı	50	100	150
Primer boyutu	19	20	21
Primer TM	59	60	61
Primer GC %	45	50	55
Primer Max Poly-X		3	
Prob boyutu	19	20	23
Prob TM	69	70	71
Prob GC %	45	50	55
Prob Max Poly-X		3	

General Primer Picking Conditions

Primer Size	Min: 19	Opt: 20	Max: 21	
Primer Tm	Min: 59.0	Opt: 60.0	Max: 61.0	Max Tm Difference: 100.0 Table of thermodynamic parameters: Breslauer et al. 1986
Product Tm	Min:	Opt:	Max:	
Primer GC%	Min: 45.0	Opt: 50.0	Max: 55.0	
Max Self Complementarity:	8.00	Max 3' Self Complementarity:	3.00	
Max #N's:	0	Max Poly-X:	3	
Inside Target Penalty:		Outside Target Penalty:	0	Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.
First Base Index:	1	CG Clamp:	0	
Concentration of monovalent cations:	50.0	Salt correction formula:	Schildkraut and Lifson 1965	
Concentration of divalent cations:	0.0	Concentration of dNTPs:	0.0	
Annealing Oligo Concentration:	50.0	(Not the concentration of oligos in the reaction mix but of those annealing to template.)		
<input checked="" type="checkbox"/> Liberal Base <input type="checkbox"/> Show Debugging Info <input checked="" type="checkbox"/> Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus <input type="checkbox"/> Lowercase masking				

Şekil 3.10. Dizayn edilen primer ve problemlerin optimum değerlerinin girildiği NCBI sayfası (üst kısım)

Hyb Oligo (Internal Oligo) General Conditions

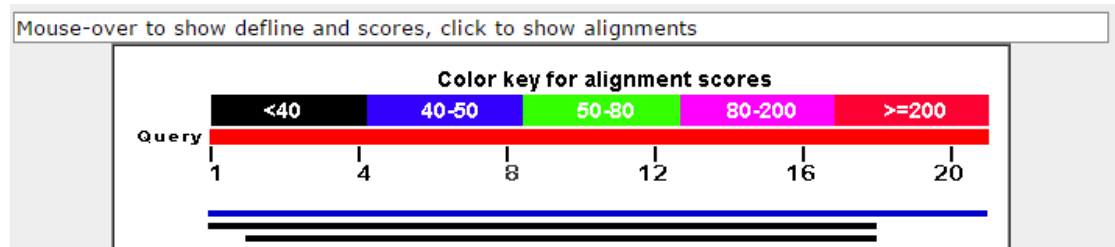
Hyb Oligo Size	Min: 19	Opt: 20	Max: 23	
Hyb Oligo Tm	Min: 69.0	Opt: 70.0	Max: 71.0	
Hyb Oligo GC%	Min: 45.0	Opt: 50.0	Max: 55.0	
Hyb Oligo Self Complementarity:	12.00	Hyb Oligo Max 3' Self Complementarity:	12.00	
Max #N's:	0	Hyb Oligo Max Poly-X:	3	
Hyb Oligo Mishyb Library:	NONE	Hyb Oligo Max Mishyb:	12.00	
Hyb Oligo Min Sequence Quality:	0			
Hyb Oligo Conc of monovalent cations:	50.0	Hyb Oligo DNA Concentration:	50.0	
Hyb Oligo conc of divalent cations:	0.0	Hyb Oligo [dNTP]	0.0	

Objective Function Penalty Weights for Hyb Oligos (Internal Oligos)

Hyb Oligo Tm	Lt: 1.0	Gt: 1.0
Hyb Oligo Size	Lt: 1.0	Gt: 1.0
Hyb Oligo GC%	Lt: 0.0	Gt: 0.0
Hyb Oligo Self Complementarity	0.0	
Hyb Oligo #N's	0.0	
Hyb Oligo Mishybing	0.0	
Hyb Oligo Sequence Quality	0.0	
<input type="button" value="Pick Primers"/> <input type="button" value="Reset Form"/>		

Şekil 3.11. Dizayn edilen primer ve problemlerin optimum değerlerinin girildiği NCBI sayfası (alt kısım)

Tez kapsamında dizayn edilen her primer ve prob ikinci bir blastlama ile kontrol edildi.



Şekil 3.12. Çoğaltılacak gen bölgesinin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği blastlama sayfası (Üst kısım)

Tablo 3.8. Tez kapsamında yapılan mltipleks Real-Time PCR yönteminde kullanılmak üzere sipariş edilen primer ve probın sekansları

Gen ismi	Primer ve Prob	Sekans
<i>Sod-1</i>	Forward	AGAGGCATGTTGGAGACCTG
	Prob	Fam-TGGAAAGGACGGTGTGGCCA-Tamra
	Revers	TCATGGACCACCATTGTACG
<i>Cat-1</i>	Forward	ACGCAATTCACACCTACACG
	Prob	Fam-TCGTGAAGCCGAGCCTGAGGAT-Tamra
	Revers	TCCAGCGTTGATTACAGGTG
<i>Gpx-1</i>	Forward	AACGACATTGCCTGGAACCT
	Prob	Fam-TACAGCCGCCGCTTTCGTACCA-Tamra
	Revers	TGCAGCCAGTAATCACCAAG
<i>Gst-p1</i>	Forward	TTGCCGATTACAACCTGTGCTG
	Prob	Fam-TGCTGTGATCCACCAAGTCCTG-Tamra
	Revers	GAGCCACATAGGCAGAGAGC
<i>Gr-1</i>	Forward	AACATTCGCAGATGGTCCTC
	Prob	Fam-TCCTGATTGCCACAGGAGGCG-Tamra
	Revers	AGCTGAAAGAAGCCATCACTG
<i>G6pd</i>	Forward	GACGAGAAGGTGTCCG
	Prob	Fam-TACAGCCGCCGCTTTCGTACCA-Tamra
	Revers	GCGGTCGTTGTTGATG
<i>Actb</i>	Forward	AATCGTGCGTGATACATCAAAG
	Prob	Cy5-ATGGCCACTGCCGCATCCTC-Bq2
	Revers	CGTTGCCAATAGTGATGACCT

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 16, GRCm38.p4 C57BL/6J
Sequence ID: [NC_000082.6](#) Length: 98207768 Number of Matches: 351

Range 1: 90220798 to 90220818 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
42.1 bits(21)	0.002	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus

Features: [322231 bp at 5' side: T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1 iso...](#)
[40 bp at 3' side: superoxide dismutase \[Cu-Zn\]](#)

Query 1 TTCTCGTCTTGCTCTCTCTGG 21
Sbjct 90220798 TTCTCGTCTTGCTCTCTCTGG 90220818

Şekil 3.13. Çoğaltılacak gen bölgesinin başka genlerle homolojisinin kontrol edildiği blastlama sayfası (Alt kısım)

Primer ve prob dizaynı sonrasında tez kapsamında kullanılmak üzere METABION şirketinden sipariş edilen primer ve probın sekansları Tablo 3.8' de verilmiştir.

3.2.6.d. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR)

Genlerin ekspresyon dereceleri Real-Time PCR'da ilgili bölgenin çoğaltılması esnasındaki kantitatif olarak oluşan ürüne TaqMan probun bağlanması ve belirli dalga

boyunda ışığa yaparak absorbans vermesi esasına dayanır. Böylece oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülür.

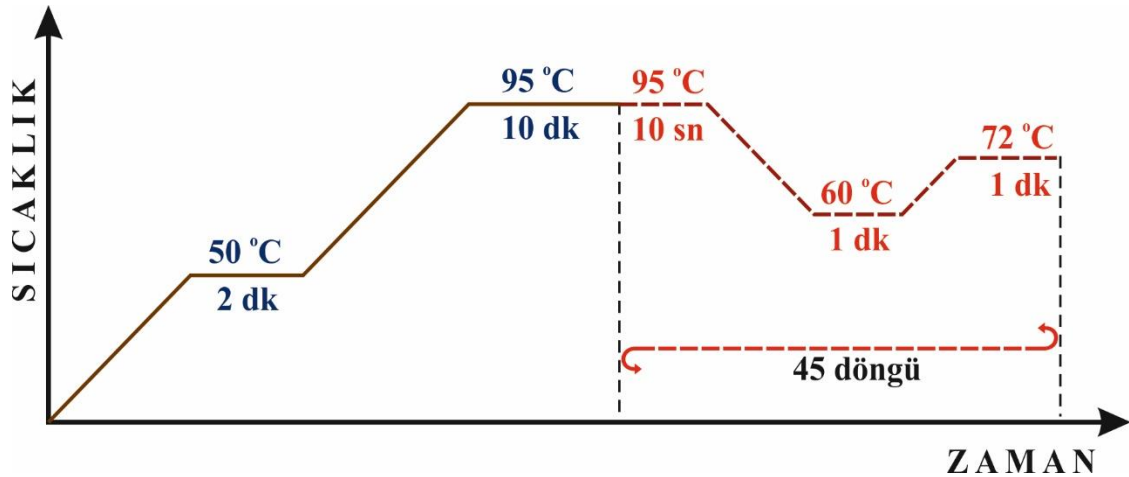
Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla Real Time-PCR analizi yapıldı. Yapılan Real-Time PCR çalışmalarında 5' ucunda raportör florokrom 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' ucunda baskılayıcı florokrom 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) floresan işaretli hedef gen probu ve 5'ucunda raportör florokrom (Cy5), 3'ucunda baskılayıcı florokrom (BQ2) olan floresan işaretli referans (housekeeping) gen Taqman probları kullanılarak kantitatif gen ekspresyonları ölçüldü. Kontrol ve ilaç gruplarından elde edilen doku örneklerinden izole edilen RNA'dan sentezlenen cDNA'lar 1:10 seyreltilerek kullanıldı. Gen ekspresyonu için Real-Time PCR tüpünde hazırlanan karışım Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.9. Real-Time PCR için hazırlanan tüp içeriği

Bileşen	1×Reaksiyonluk	45×Reaksiyonluk
Master mix	12,5 µl	562,5 µl
ddH ₂ O	9,25 µl	416,25 µl
F(Forward) primer	0,25 µl	11,25 µl
R(Reverse) primer	0,25 µl	11,25 µl
Taqman prob	0,25 µl	11,25 µl
Aktin için F primer	0,25 µl	11,25 µl
Aktin için R primer	0,25 µl	11,25 µl
Aktin için Taqman prob	0,25 µl	11,25 µl

Yukarıdaki gibi hazırlanan karışımdan her bir PCR tüpüne 22,5 µL pipetlendi. Sonra tüplerin üzerine ilgili cDNA'dan 2,5 µL eklendi.

Real-Time PCR uygulamasında kullanılan sıcaklık döngüsü Şekil 3.10'da gösterildiği gibidir.



Şekil 3.14. Real-Time PCR cihazındaki sıcaklık döngüsünü gösteren ekranın görüntüsü

3.2.6.e. Real-Time PCR sonuçlarının hesaplanması

Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, her örneğin referans ve hedef CT değerleri arasındaki farkı kıyaslayan ΔCT metodu kullanıldı (Livak and Schmittgen 2001). Kontrol ve deney gruplarının ekspresyon seviyelerinin hesaplanması aşağıda gösterildiği yapılmıştır.

$$\text{Ekspresyon } (\Delta C_T) = 2^{CT(\text{referans}) - CT(\text{hedef})}$$

2: Hedef geni çoğaltan primer etkinlik oranı

Referans CT: Real-Time PCR reaksiyonu esnasında referans (housekeeping) genin kantitatif olarak anlamlı miktarını ifade eden değer.

Hedef CT: Real-Time PCR reaksiyonu esnasında hedef (araştırılan gen) genin kantitatif olarak anlamlı miktarını ifade eden değer.

ΔCT değeri hem hedef hem de referans genimiz için hesaplanarak istatistiksel olarak kıyaslandı. Referans ve hedef genlerin CT değerleri genlerin kantitatif miktarlarını belirten ifadeler olup reaksiyon sırasında artan gen miktarı belirli konsantrasyona ulaştığında okunur. Okunan konsantrasyon oranı kullanılan cihazın hassasiyetine göre farklılık gösterebildiğinden, referans ve hedef genlerin aynı cihazda çalışılması deneyin hassasiyeti ve güvenilirliği açısından önemlidir.

3.2.7. Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

3.2.7.1. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon Redüktaz (GR) enzim aktivitesinin ölçümü (Carlberg and Mannervik 1975) yöntemine göre yapıldı.

Tablo 3.10. GR Aktivite Ölçüm Prosedürü

	KÖR(μL)	Numune(μL)
Tampon	200	200
Su	600	600-x
GSSG	100	100
Enzim	-	x
NADPH	100	100

340 nm'de NADPH'ın tükenmesine dayalı absorbands azalışı ölçüldü. (3 dk. Ölçüm yapıldı)

Aktivite hesaplanması

$$\frac{\text{EU}}{\text{mL}} = \frac{\Delta\text{OD}}{3 \times 6,22} \times \frac{V_t}{V_e} \times \text{Sf} \quad (3.1)$$

3.2.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesinin ölçümü (Paglia and Valentine 1967)'e göre belirlendi.

Tablo 3.11. GPx Aktivite Ölçüm Prosedürü

	Kör (μL)	Numune(μL)
Tampon	100	100
GSH	100	100
GR	100	100
NADPH	100	100
Enzim	10	10
Su	590	580
t-bütül HPx	-	10

t-bütül HPx eklenmeden önce 340 nm’de absorbans değişimi sabit kalana kadar ölçüm yapıldı. Absorbans değişimi sabitlenince numune küvetine t-bütül HPx eklendikten sonra 3 dk. boyunca 340 nm’de absorbans azalışı ölçüldü.

Aktivite Hesaplanması

$$\frac{\text{EU}}{\text{mL}} = \frac{\Delta\text{OD}}{3 \times 6,22} \times \frac{V_t}{V_e} \times \text{Sf} \quad (3.2)$$

3.2.7.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

(G6PD) enzim aktivitesinin ölçümü (Beutler 1971)’e göre yapıldı.

Tablo 3.12. G6PD Aktivite Ölçüm Prosedürü

	KÖR(μL)	Numune(μL)
Tampon	200	200
Su	600	600-x
G6P	100	100
Enzim	-	X
NADP⁺	100	100

340 nm’de NADPH’ın oluşumu 3 dk. da absorbans artışıyla ölçüldü.

Aktivite Hesaplaması

$$\frac{\text{EU}}{\text{mL}} = \frac{\Delta\text{OD}}{3 \times 6,22} \times \frac{V_t}{V_e} \times \text{Sf} \quad (3.3)$$

3.2.7.4. Glutatyon S-Transferaz (GST)

Glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktivitesinin ölçümü ise (Nandhini et al. 2005) metoduna göre tayin edildi.

Tablo 3.13. GST Aktivite Ölçüm Prosedürü

	KÖR(μ L)	Numune(μ L)
Tampon	200	200
Su	730	730-x
GSH	50	50
Enzim	-	x
CDNB	20	20

340 nm'de glutatyon- CDNB konjugatının oluşumuna dayalı absorbands artışı ölçüldü.

Aktivite Hesaplaması

$$\frac{EU}{mL} = \frac{\Delta OD}{3 \times 6,22} \times \frac{Vt}{Ve} \times Sf \quad (3.4)$$

3.2.7.5. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçümü (Aebi 1984) metoduna göre tayin edildi.

Tablo 3.14. CAT Aktivite Ölçüm Prosedürü

	KÖR(μ L)	Numune(μ L)
Tampon	1500	1490
H₂O₂	1500	1500
Enzim	-	10

Yukarıda hazırlanan (Bölüm 2.1.3.1.e) tamponun 50 ml'sinde H₂O₂'den 200 μ L eklendi. 240 nm'de tampona karşı 3 ml'lik kuvarz küvette absorbands farkı 0,5 olana kadar ölçüm yapıldı. 240 nm'de 15 sn.de bir 1 dk. boyunca ölçüm yapıldı.

Aktivite Hesaplaması

$$\frac{EU}{mL} = \frac{\Delta OD}{0,0396} \times \frac{Vt}{Ve} \quad (3.5)$$

3.2.7.6. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin ölçümü (Sun et al. 1988) metoduna göre tayin edildi.

Tablo 3.15. SOD Aktivite Ölçüm Prosedürü

	Kör(µL)	Numune(µL)
Reaktif karışımı	2850	2850
Numune	-	50
Saf su	100	(100-50)
Ksantin Oksidaz	50	50
CuCl₂	1000	1000

CuCl₂ eklenmeden önce oda sıcaklığında 25 dk. inkübasyon yapıldı. 560 nm’de reaktif karışımına karşı önce kör, sonra numune okundu.

Aktivasyon hesaplama

$$\%inhibisyon = \frac{(KörünAbs. - Numuneninabs.)}{KörünAbs.} \times 100 \quad (3.6)$$

$$Aktivite \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\%inhibisyon}{50 \times 0,1} \quad (3.7)$$

3.2.8. Western Blot analizinin uygulanması

3.2.8.a. Homojenatın hazırlanması

Fare kalp dokularından ayrı ayrı bir miktar alındı ve tartıldı. Tartılan dokular 2 ml’lik ependorf tüplerine konuldu ve üzerine 1:5 oranında RIPA tamponu eklendi. Tüpler “TissueLyser II” homojenizatöre yerleştirilerek dokuların parçalanması sağlandı. Parçalanmış dokular 10000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Protein tayini ve Western-Blot yapmak üzere +4°C’de muhafaza edildi.

3.2.8.b. SDS-PAGE jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

Deneyin amacına göre hangi yüzdelik jeli hazırlamamız gerektiği belirlendikten sonra SDS jel hazırlandı. SDS Jeli iki kısımdan oluşur. Yükleme jeli (Tablo 3.17) ve ayırma jeli (Tablo 3.18). Proteinler yüklenmeden önce konsantrasyonları Bradford yöntemi ile ölçüldü. 10-100 µg proteine 1xSDS yükleme tamponu ilave edildi. 95°C' lik ısıtma blokunda 10 dakika kaynatılarak proteinler denatüre edildi. 10 dakika sonunda numuneler buz içine transfer edilerek yüklemeden önce en az 10 dakikada daha bekletildi. Numune yükleme jeline yüklendikten sonra 50 Voltta 30 dakika elektroforezde yürütüldü. Numune ayırma jeline geçmeye başladığında voltaj 120 volta yükseltildi ve 90 dakika daha yürütmeye devam edildi.

Tablo 3.16. SDS Jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri (Erdoğan vd. 2016)

Toplam	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
Didestile Su	0,68 ml	1,4 ml	2,1 ml	2,7 ml	3,4 ml
%30Akril Amid	0,17 ml	0,33 ml	0,5 ml	0,67 ml	0,83 ml
1M Tris pH:6,8	0,13 ml	0,25 ml	0,38 ml	0,5 ml	0,63 ml
%10SDS	0,01 ml	0,02 ml	0,03 ml	0,04 ml	0,05 ml
%10 Amonyum persülfat	0,01 ml	0,02 ml	0,03 ml	0,04 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,002 ml	0,003 ml	0,004 ml	0,005 ml

Tablo 3.17. SDS Jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri (Erdoğan vd. 2016)

Jel Yüzdesi	%6	%8	%9	%10	%12
Didestile Su	7,9 ml	6,9 ml	6,45 ml	5,9 ml	4,9 ml
%30Akril Amid	3 ml	4 ml	4,5 ml	5 ml	6 ml
1,5M Tris pH:8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
%10SDS	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
%10 Amonyum persülfat	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	0,012 ml	0,009 ml	0,075 ml	0,006 ml	0,006 ml
Toplam	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml

3.2.8.c. Jeldeki proteinin membrana transferi ve film edilmesi

SDS jeli üzerinde molekül ağırlığına göre ayrılan proteinler membrana transfer edildi. Bunun için Semidry Blotter cihazı kullanıldı. Membranlar kullanılmadan önce metanol ile 5 dakika muamele edildikten sonra 1x transfer tamponu ile de 5 dakika muamele

edildi. Semidry Blotter cihazına sıra ile 2 parça blot kağıdı, membran, jel, 2 parça blot kağıdı konuldu ve cihaz kapatıldı. 1 watt elektriksel alana konularak 75 dakika blotlama işlemi yapıldı. Blotlama sonrası proteinler jelden membrana transfer oldu.

3.2.8.d. Bloklama

Membran 10 dakika TBST ile yıkandı. 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi (%5 Skim milk powder) ile muamele edildi. Membranın kurumamasına dikkat edildi.

3.2.8.e. Antikorla muamele

4°C'de 1 gece birinci antikor ile inkübasyona bırakıldı. Membran 6 kez 5 dakika TBST ile yıkandı. Oda sıcaklığında 1 saat HRP konjüğe edilmiş ikinci antikor ile inkübasyona bırakıldı. Membran 6 kez 5 dakika TBST ile yıkandı.

3.2.8.f. Proteinin görüntülenmesi

Membranlar antikorla muamele edildikten sonra Femto ve Pico substratları (ECL reagent) kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturması sağlandı. Chemiluminescence/Fluorescence - Fusion-FX cihazı ile karanlık odada membranın filmi otoradyografik olarak çekildi. Kantitatif analiz için β -aktin referans (housekeeping) protein olarak kullanıldı.

3.2.8.g. Western Blot görüntülerin analiz edilmesi

Western Blot işleminden elde edilen görüntüler ImageJ2x programı yardımıyla analiz edildi. Sonuçlar optimize edilerek anlamlandırıldı.

3.2.9. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler

In vivo inhibisyon, glutasyon tayini, Real-Time PCR ve Western Blot analizi verilerinin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplara Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) ve t-test uygulandı. Bütün sonuçlarda mean±standard hata (SEM) değerleri analiz edildi. Yıldız işareti (*) ile ifade edilen değerler istatistiksel analiz sonucu elde edilen p önem

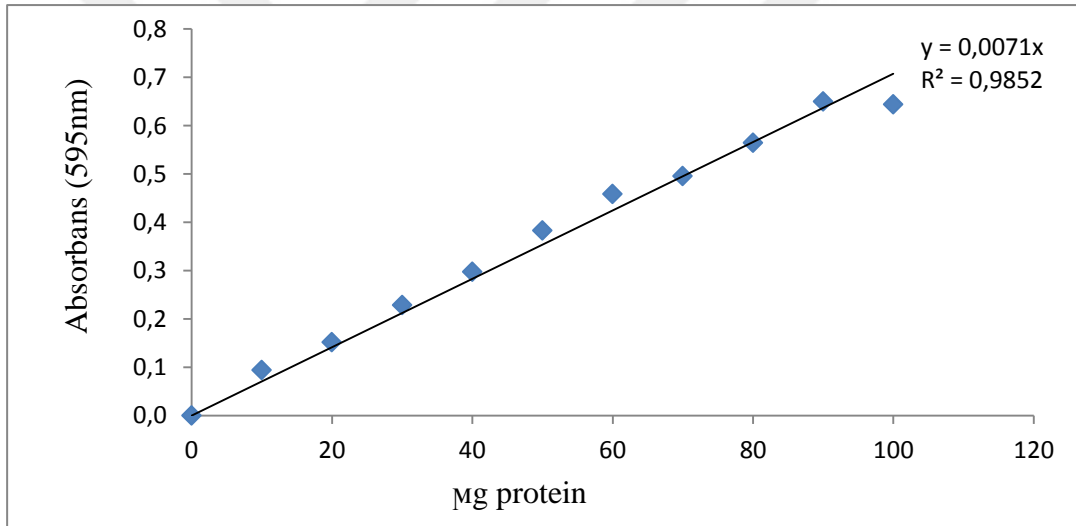
değerlerini ifade etmektedir. Önemlilik derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 4 arasında doğru orantılı olarak değişmektedir. ($p > 0,05 = ns$ (not significant) önemsiz, $p < 0,05 = *$ (significant) önemli, $p < 0,01 = **$ (very significant) çok önemli, $p < 0,001 = ***$ ve $****$ (highly significant) yüksek derecede önemli).



4. SONUÇLAR

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.5’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Ham homojenatlar ve enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1’de gösterildi.

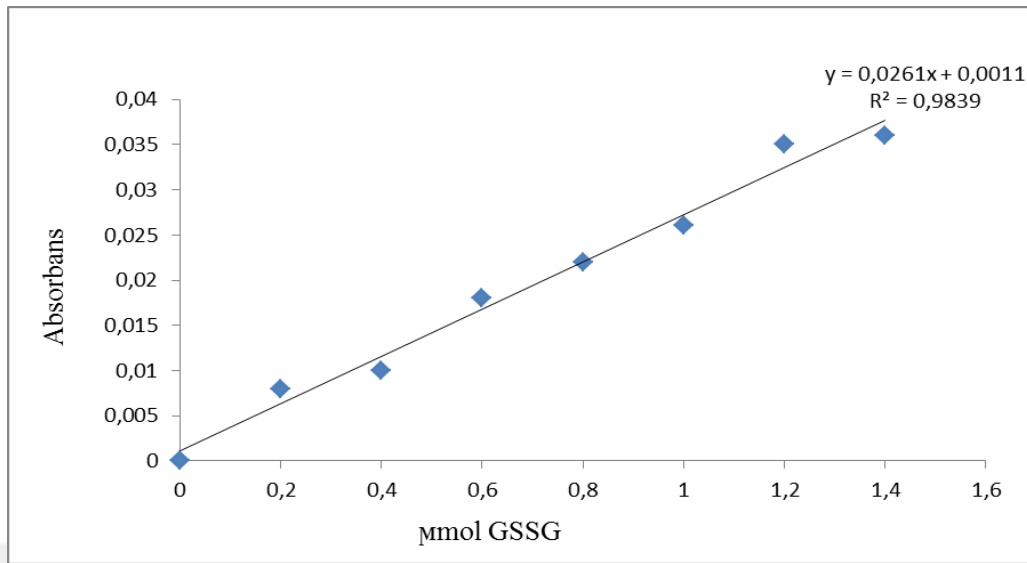


Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart

4.2. Redükte Glutasyon (GSH) ve Okside Glutasyon (GSSG) Tayin Sonuçları

4.2.1. Glutasyon tayini için hazırlanan standart grafik

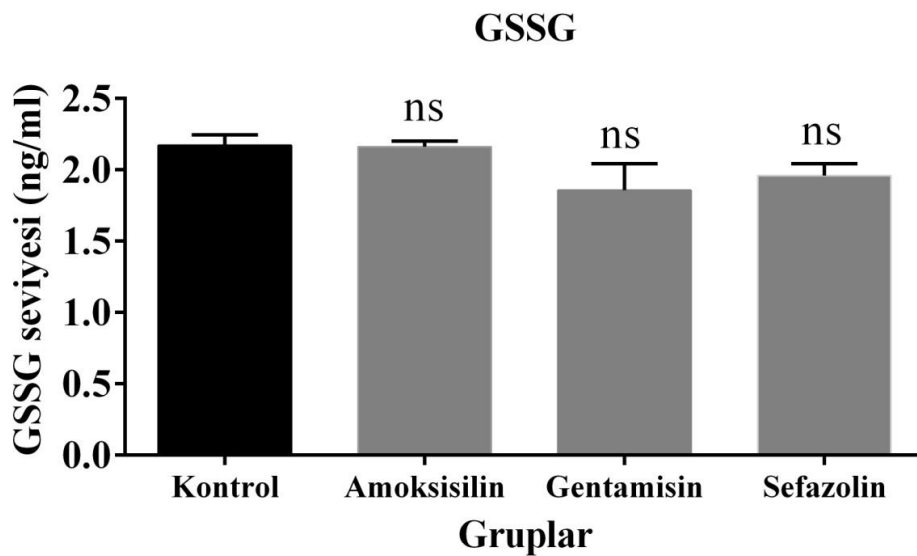
Bölüm 3.2.6.a’da açıklandığı gibi GSSG kullanarak hazırlanan standart grafik Şekil 4.2’de verildi.



Şekil 4.2. GSSG kullanarak hazırlanan standart grafik

4.2.2. Okside glutatyon (GSSG) tayini sonucu

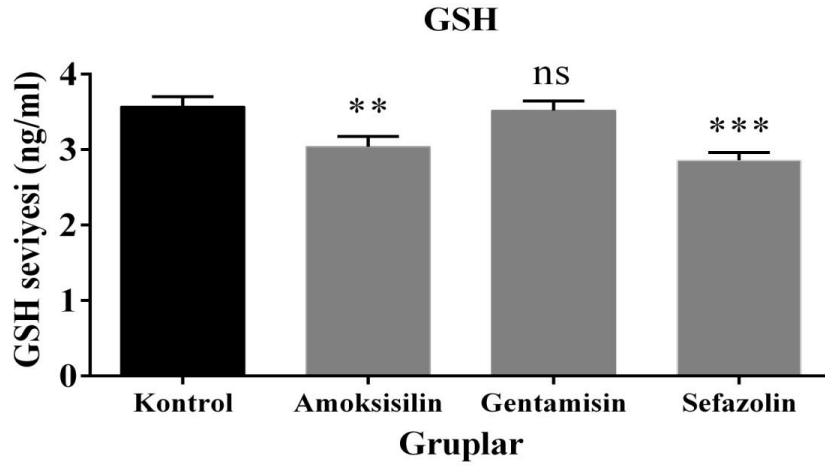
Bölüm 3.2.6.c'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen GSSG tayini sonuçları standart grafik kullanılarak ng/ml doku cinsinden hesaplandı. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.3'te verildi. GSSG miktarı kontrole kıyasla ilaç uygulanan gruplarda önemli bir değişiklik gözlenmedi.



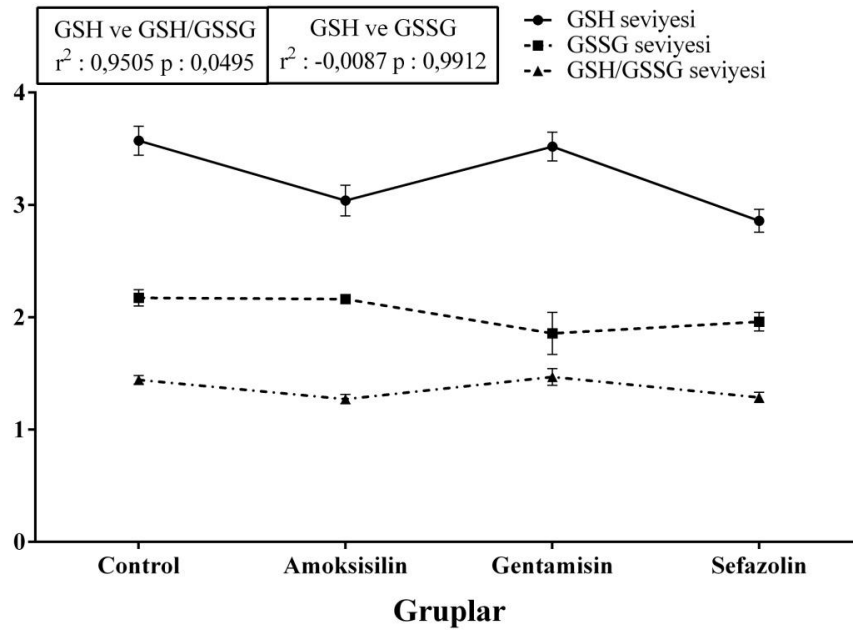
Şekil 4.3. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre karaciğer GSSG miktarları ($p > 0,05 = ns$ (önemsiz), $p < 0,05 = *$ (önemli), $p < 0,01 = **$ (çok önemli), $p < 0,001 = ***$ (yüksek derecede önemli))

4.2.3. Redükte glutatyon (GSH) tayini sonucu

GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.4'te verildi. GSH miktarı kontrole kıyasla gentamisin uygulanan grupta önemli değişiklik göstermezken ($p>0,05$), amoksisilin uygulanan grupta çok önemli ölçüde ($p<0,01$) ve sefazolin sodyum uygulanan grupta ise yüksek derecede önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldı.



Şekil 4.4. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre karaciğer GSH miktarları ($p>0,05$ =ns (önemsiz), $p<0,05$ =*(önemli), $p<0,01$ =**(çok önemli), $p<0,001$ =*** (yüksek derecede önemli))

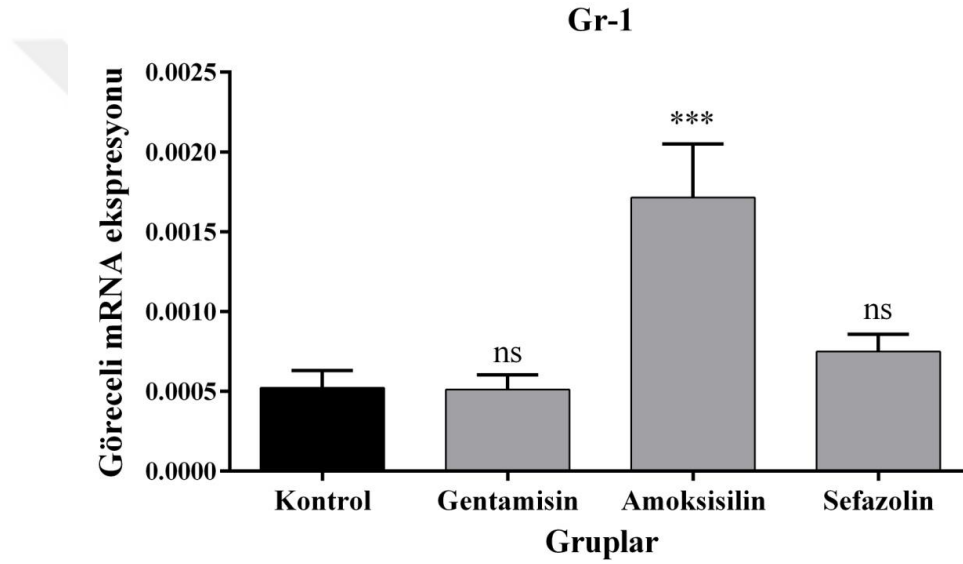


Şekil 4.5. Kontrol grubu ile amoksisilin, gentamisin ve sefazolin sodyum uygulanan farelerin kalp dokusunda GSH, GSSG ve GSH/GSSG arasındaki korelasyon

4.3. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları

4.3.1. Glutasyon Redüktaz (GR) Gen Ekspresyonu Sonucu

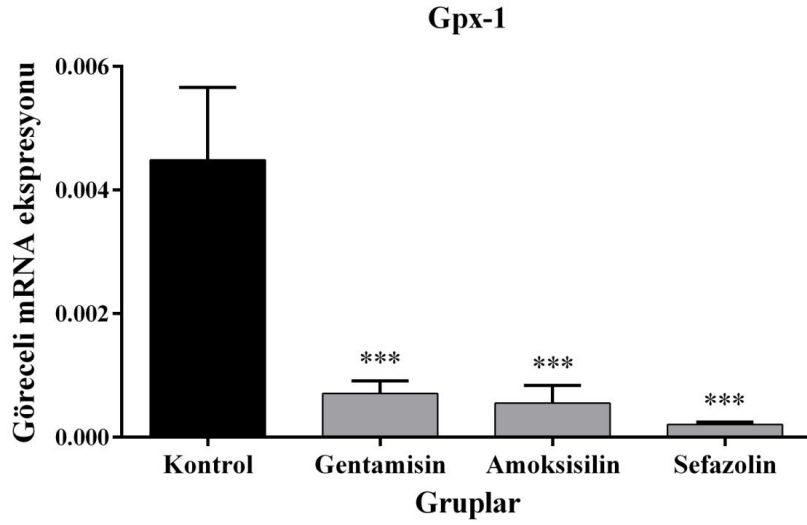
Kalp dokusunda gerçekleştirilen Gr enziminin gen ekspresyon sonuçlarının GraphPad Prism 6 programı kullanılarak istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.6'da verildi. Kalp Gr ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla amoksisilin uygulanan grupta yüksek derecede önemli derecede ($p<0,001$) artış gözlenirken; gentamisin ve sefazolin uygulanan gruplarda önemli değişiklik gözlenmedi ($p>0,05$).



Şekil 4.6. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Gr gen ekspresyon sonuçları ($p>0,05=ns$ (önemsiz), $p<0,05=*$ (önemli), $p<0,01=**$ (çok önemli), $p<0,001=***$ (yüksek derecede önemli)

4.3.2. Glutasyon Peroksidaz (Gpx) Gen Ekspresyonu Sonucu

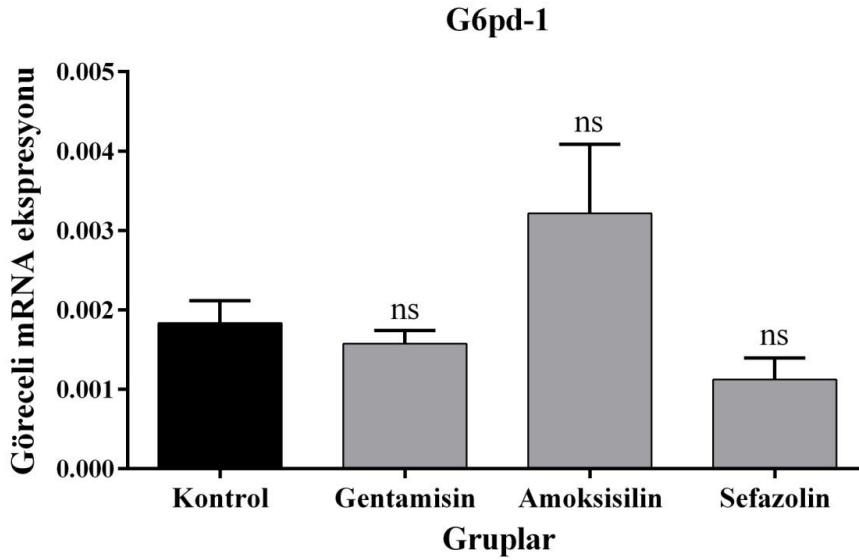
Kalp dokusunda gerçekleştirilen Gpx enziminin gen ekspresyon sonuçlarının GraphPad Prism 6 programı kullanılarak istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.7'de verildi. Kalp Gpx ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla antibiyotik uygulanan gruplarda yüksek derecede önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldı



Şekil 4.7. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Gpx gen ekspresyon sonuçları (p>0,05=ns (önemsiz), p<0,05=*(önemli), p<0,01=**(çok önemli), p<0,001=***(yüksek derecede önemli))

4.3.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Gen Ekspresyonu Sonucu

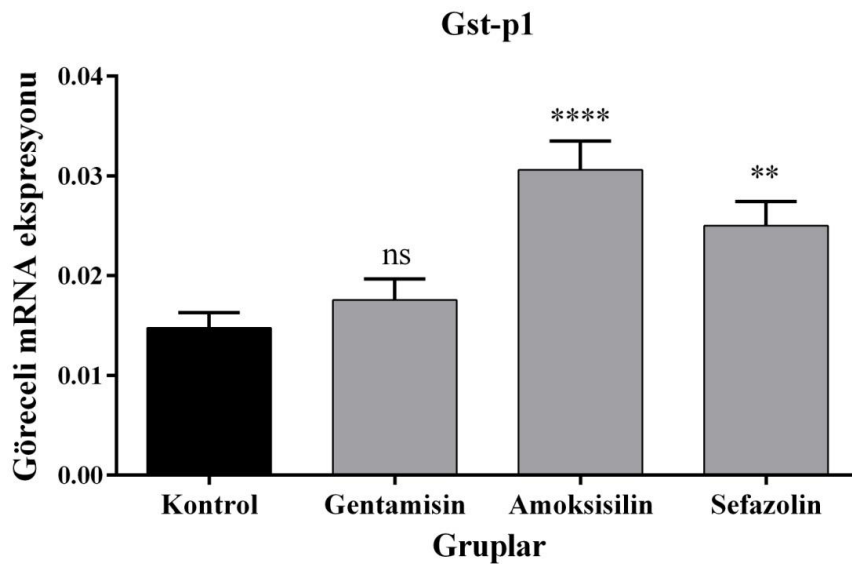
Kalp dokusunda gerçekleştirilen G6pd enziminin gen ekspresyon sonuçlarının GraphPad Prism 6 programı kullanılarak istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.8'de verildi. Kalp G6pd ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla antibiyotik uygulanan gruplarda önemli değişiklik gözlenmedi (p>0,05).



Şekil 4.8. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp G6pd gen ekspresyon sonuçları (p>0,05=ns (önemsiz), p<0,05=*(önemli), p<0,01=**(çok önemli), p<0,001=***(yüksek derecede önemli))

4.3.4. Glutatyon S-Transferaz (GST) Gen Ekspresyonu Sonucu

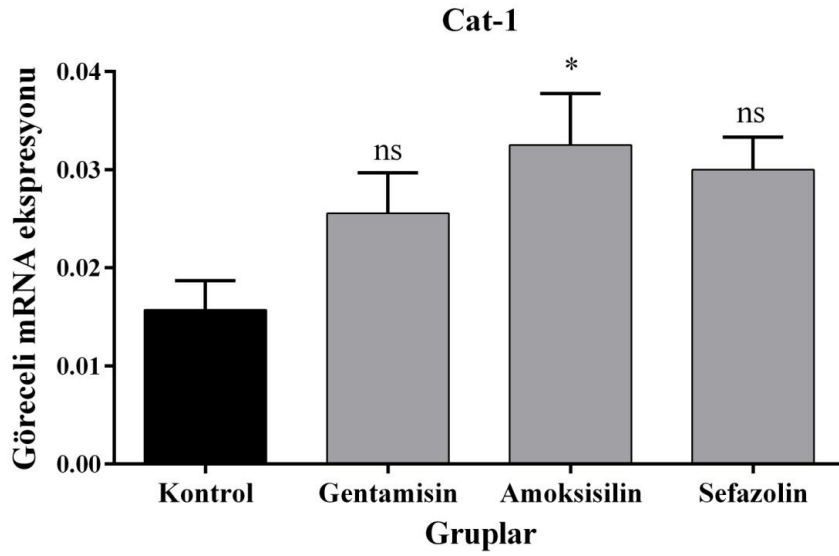
Kalp dokusunda gerçekleştirilen Gst enziminin gen ekspresyon sonuçlarının GraphPad Prism 6 programı kullanılarak istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.9’da verildi. Kalp Gst ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla gentamisin uygulanan gruplarda önemli değişiklik gözlenmezken ($p>0,05$); amoksisilin uygulanan grupta yüksek derecede önemli ölçüde ($p<0,001$) ve sefazolin sodyum uygulanan grupta da çok önemli ölçüde arttı ($p<0,01$).



Şekil 4.9. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Gst gen ekspresyon sonuçları ($p>0,05$ =ns (önemsiz), $p<0,05$ =*(önemli), $p<0,01$ ** (çok önemli), $p<0,001$ **** (yüksek derecede önemli))

4.3.5. Katalaz (CAT) Gen Ekspresyonu Sonucu

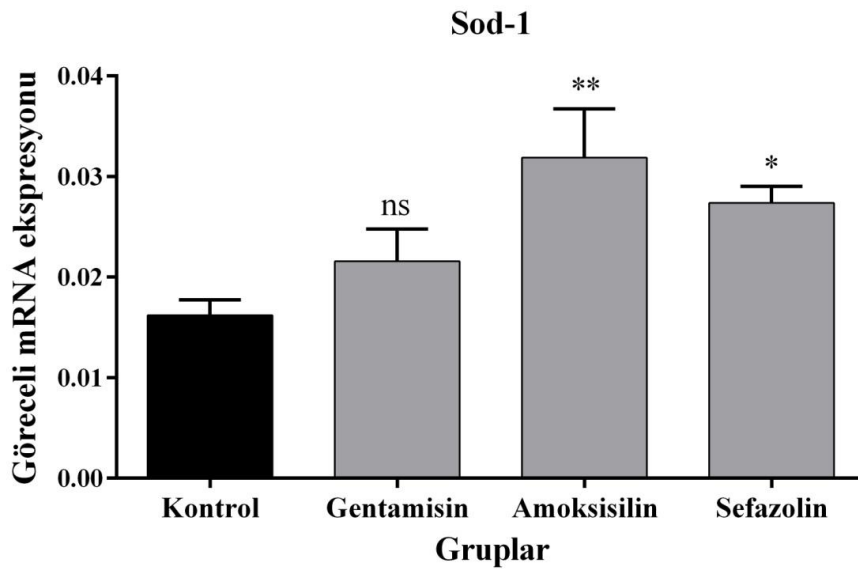
Kalp dokusunda gerçekleştirilen Cat enziminin gen ekspresyon sonuçlarının GraphPad Prism 6 programı kullanılarak istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.10’da verildi. Kalp Cat ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla sefazolin ve gentamisin uygulanan gruplarda önemli değişiklik gözlenmezken ($p>0,05$); amoksisilin uygulanan grupta önemli ölçüde arttı ($p<0,05$).



Şekil 4.10. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Cat gen ekspresyon sonuçları (p>0=ns (önemsiz), p<0,05=*(önemli), p<0,01=**(çok önemli), p<0,001=***(yüksek derecede önemli))

4.3.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Gen Ekspresyonu Sonucu

Kalp dokusunda gerçekleştirilen Sod enziminin gen ekspresyon sonuçlarının GraphPad Prism 6 programı kullanılarak istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.11’de verildi. Kalp Sod ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla amoksisilin uygulanan grupta çok önemli ölçüde (p<0,01), sefazolin uygulanan grupta önemli ölçüde (p<0,05) artarken, gentamisin uygulanan gruplarda önemli bir değişiklik gözlenmedi (p>0,05).

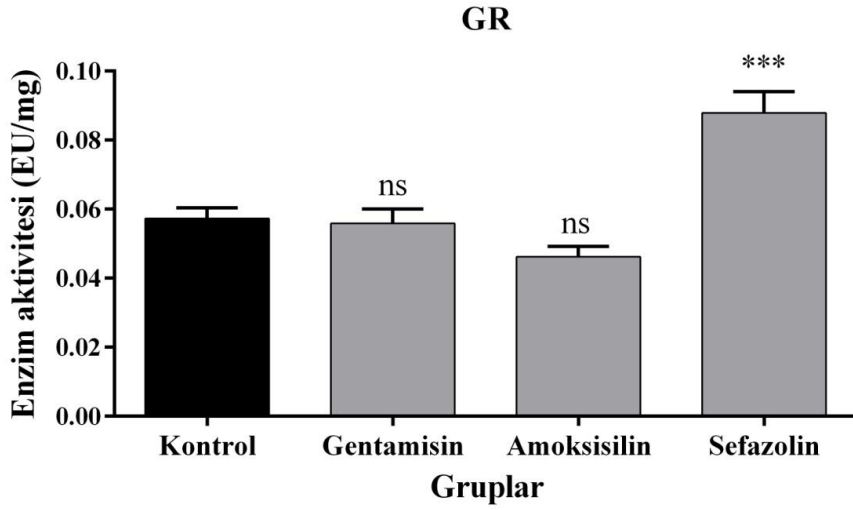


Şekil 4.11. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp Sod gen ekspresyon sonuçları ($p > 0,05 = ns$ (önemsiz), $p < 0,05 = *$ (önemli), $p < 0,01 = **$ (çok önemli), $p < 0,001 = ***$ (yüksek derecede önemli))

4.4. Amoksisilin, Gentamisin ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Kalp Dokusunda Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine *İn Vivo* İnhibisyon Etkilerinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları

4.4.1. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu

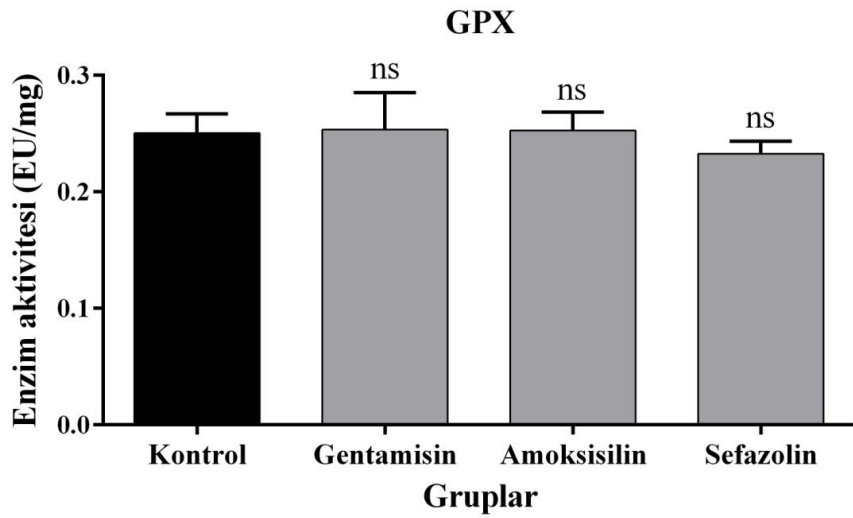
Bölüm 3.2.4.1.'de anlatıldığı şekilde GR enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.12'de verildi. Kalp GR enzimi kontrole kıyasla amoksisilin ve gentamisin uygulanan grupta önemli bir değişiklik gözlenmezken ($p > 0,05$); sefazolin sodyum uygulanan grupta ise yüksek derecede önemli ölçüde ($p < 0,001$) artış oldu.



Şekil 4.12. Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer GR enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri ($p>0,05=ns$ (önemsiz), $p<0,05=*$ (önemli), $p<0,01=**$ (çok önemli), $p<0,001=***$ (yüksek derecede önemli))

4.4.2. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu

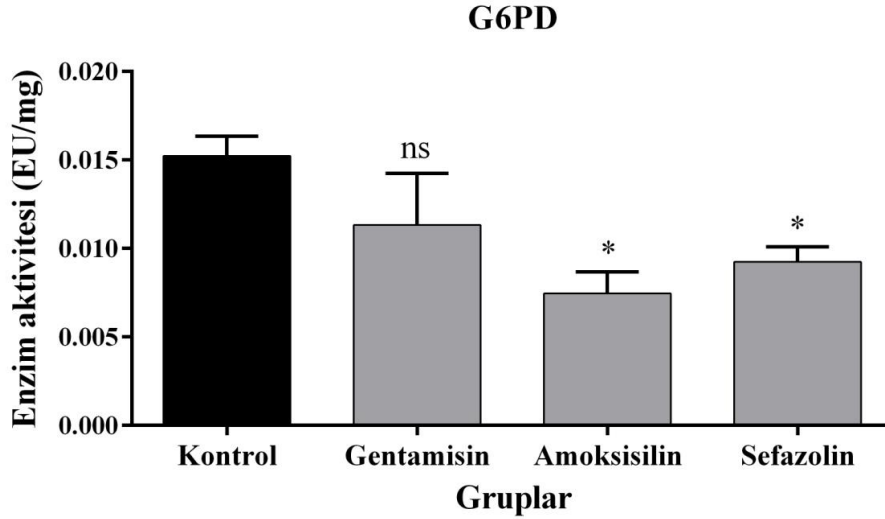
Bölüm 3.2.4.2.'de anlatıldığı şekilde GPx enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.13'te verildi. Kalp GPx enzimi kontrole kıyasla amoksisilin, gentamisin ve sefazolin sodyum uygulanan grupta önemli bir değişiklik gözlenmedi ($p>0,05$).



Şekil 4.13. Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer GPx enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri ($p>0,05=ns$ (önemsiz), $p<0,05=*$ (önemli), $p<0,01=**$ (çok önemli), $p<0,001=***$ (yüksek derecede önemli))

4.4.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu

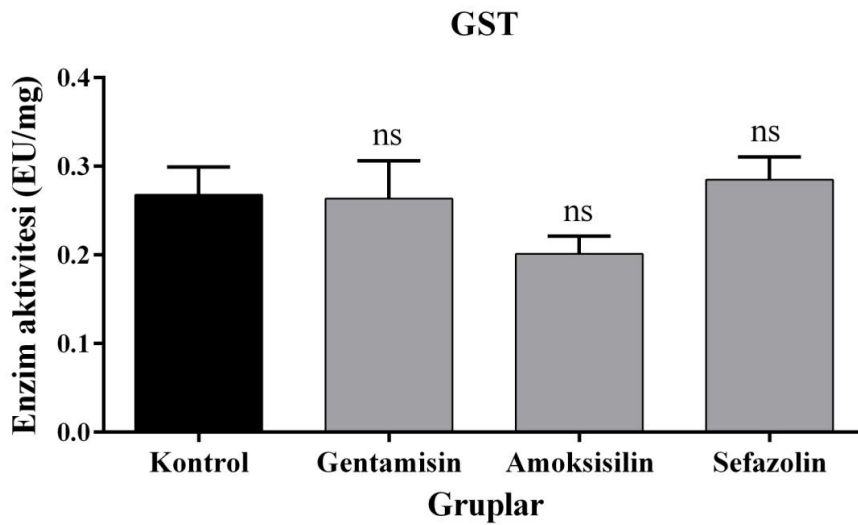
Bölüm 3.2.4.3.'de anlatıldığı şekilde G6PD enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.14'te verildi. Kalp G6PD enzimi kontrole kıyasla gentamisin uygulanan grupta önemli bir değişiklik gözlenmezken ($p>0,05$); amoksisilin ve sefazolin sodyum uygulanan grupta önemli derecede inhibisyon gözlendi $p<0,05$.



Şekil 4.14. Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer G6PD enziminin kontrol grubuna göre aktivite (p>0,05=ns (önemsiz), p<0,05=*(önemli), p<0,01=**(çok önemli), p<0,001=***(yüksek derecede önemli))

4.4.4. Glutatyon S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu

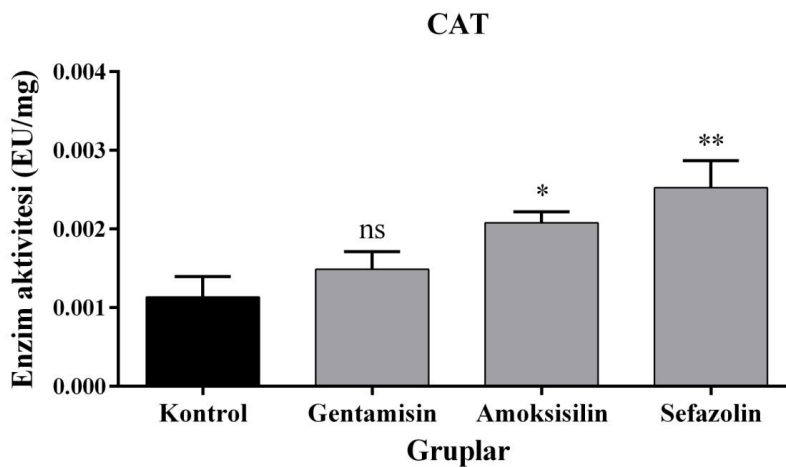
Bölüm 3.2.4.4.'de anlatıldığı şekilde GST enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.15'de verildi. Kalp GST enzimi kontrole kıyasla antibiyotik uygulanan gruplarda önemli bir değişiklik gözlenmedi ($p>0,05$).



Şekil 4.15. Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer GST enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri ($p>0,05=ns$ (önemsiz), $p<0,05=*$ (önemli), $p<0,01=**$ (çok önemli), $p<0,001=***$ (yüksek derecede önemli))

4.4.5. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu

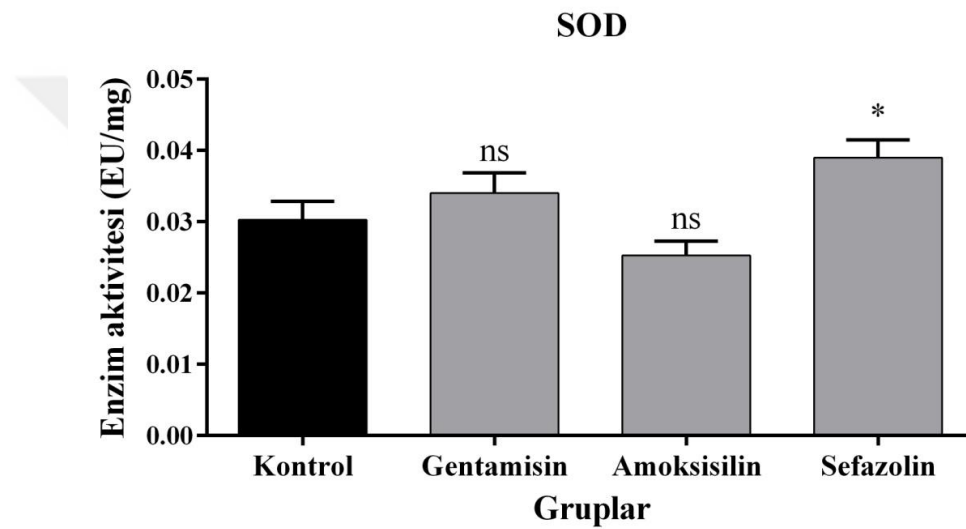
Bölüm 3.2.4.5.'de anlatıldığı şekilde CAT enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.16'da verildi. Kalp CAT enzimi kontrole kıyasla gentamisin uygulanan grupta önemli bir değişiklik gözlenmezken ($p>0,05$); amoksisilin uygulanan grupta çok önemli derecede ($p<0,01$) ve sefazolin sodyum uygulanan grupta önemli derecede artış gözlemlendi $p<0,05$.



Şekil 4.16. Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer CAT enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri ($p>0,05=ns$ (önemsiz), $p<0,05=*$ (önemli), $p<0,01=**$ (çok önemli), $p<0,001=***$ (yüksek derecede önemli))

4.4.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Sonucu

Bölüm 3.2.4.4.'de anlatıldığı şekilde SOD enziminin aktivite ölçümleri yapıldı. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Çizilen grafikler Şekil 4.17'de verildi. Kalp SOD enzimi kontrole kıyasla sefazolin uygulanan grupta önemli derecede $p < 0,05$ artış olurken, diğer gruplarda önemli bir değişiklik gözlenmedi ($p > 0,05$).

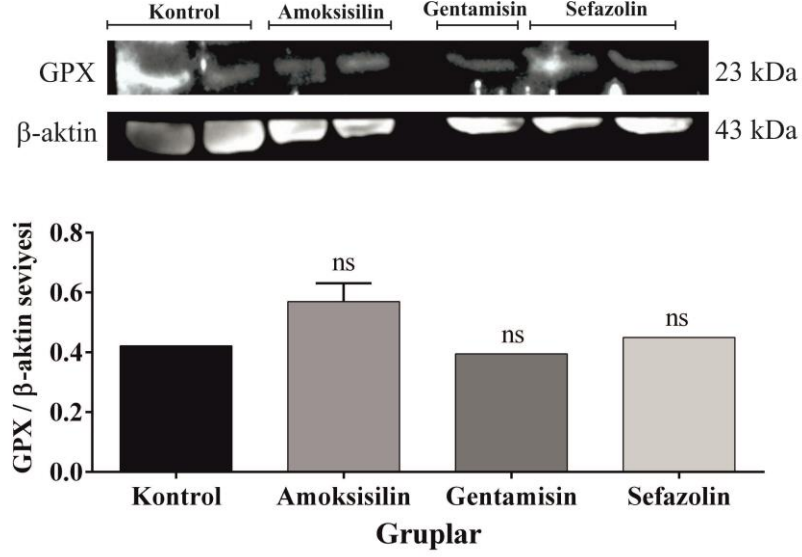


Şekil 4.17. Antibiyotik uygulanan gruplarda karaciğer SOD enziminin kontrol grubuna göre aktiviteleri ($p > 0,05 = ns$ (önemsiz), $p < 0,05 = *$ (önemli), $p < 0,01 = **$ (çok önemli), $p < 0,001 = ***$ (yüksek derecede önemli))

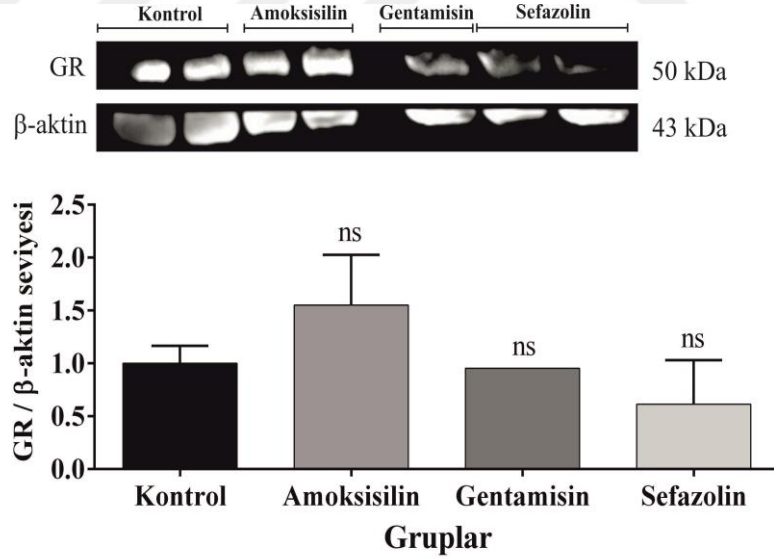
4.4. Amoksisilin, Gentamisin ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Kalp GPx ve GR Enzimlerinin Protein Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları

Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi hazırlanan homojenatlar 40 μ g protein içerecek şekilde yükleme boyasıyla seyreltildi ve denatüre edildi. %10'luk SDS-PAGE jeli hazırlandı ve kuyulara 25'er μ L numune yüklenerek SDS-PAGE gerçekleştirildi. Elde edilen jeldeki proteinler membrana transfer edildi bloklama ve antikorla muamele işlemlerinden sonra kemilüminesans görüntüleme gerçekleştirildi. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. Kontrol grubuna göre kıyasladığımızda ilaç uygulanan gruplarda GPx ve GR protein ekspresyonunda anlamlı bir

değişiklik gözlemlenmemiştir ($p>0,05=ns$ (önemsiz)). Elde edilen veriler Şekil 4.18 ve 4.19'da verildi.



Şekil 4.18. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp GPx enziminin protein ekspresyon sonuçları ($p>0,05=ns$ (önemsiz), $p<0,05=*$ (önemli), $p<0,01=**$ (çok önemli), $p<0,001=***$ (yüksek derecede önemli))



Şekil 4.19. Antibiyotik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kalp GR enziminin protein ekspresyon sonuçları ($p>0,05=ns$ (önemsiz), $p<0,05=*$ (önemli), $p<0,01=**$ (çok önemli), $p<0,001=***$ (yüksek derecede önemli))

5. TARTIŞMA

İnsan vücudunda, normal koşullarda, oksijenin indirgenmiş formu tarafından aktif oksijen (monovalent ve/veya divalent), süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi reaktif oksijen türleri üretilir (Halliwell and Gutteridge 1989). ROS, hücrel sinyal iletim mekanizmalarının doğru şekilde ilerlemesi açısından önemli olsa da hücrel konsantrasyonlarının yükselmesi sonrasında lipidler, proteinler (Gebicki and Bartosz 2010) ve hatta DNA'nın kendisi gibi makromoleküller açısından zarar teşkil eder. Lipitlerin peroksidasyonu sonucu hücre zarının akışkanlığı ve geçirgenliği bozular. Lipit peroksidasyonu ayrıca enzimler ve reseptörler gibi zara bağlı proteinlerin fonksiyonunu da bozabilir. Reaktif oksijen türleri ayrıca yapısal proteinlerin ve enzimlerin aktivitesine müdahale ederek çeşitli proteinleri genomik ve proteomik seviyede etkileyebilir. Bunların yanı sıra lipit peroksidasyonunun kardiyak ve endotelial hücrelerin fonksiyonlarını da etkilediği rapor edilmiştir (Gutteridge and Halliwell 1994).

Serbest oksijen türlerine karşı antioksidanlar diye adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları bulunur (Grune 2002). Bu sistemler genel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere ikiye ayrılır (McCord 1993). Antioksidanların aktivitesi etki ettiği radikalın türüne bağlıdır (Janssen et al. 1993). Genellikle bütün organizmalar serbest radikallere karşı SOD, GPx, CAT, GR gibi endojen antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarını arttırır. Ancak bu enzimler, ROS konsantrasyonunun artması neticesinde hücre zar yapısının bozulmasıyla ilgili olan dejeneratif hastalıklar ve diğer sağlık problemlerini tamamen önlemede yetersiz kalırlar (Borneo, Leon et al. 2009). Bunlara ek olarak fenolikler, askorbik asit, tokoferoller, glutatyon ve diğer birçok gıdalar serbest radikallerin zararlı etkilerini gidermede önemli rol oynarlar (Tachakittirungrod et al. 2007).

Oksidan/Antioksidan denge sisteminde dengenin oksidanlar lehine kayması sonucu kalp hastalıkları (Gavat and Voroniuc 1999), iskemi reperfüzyon hasarı, katekolamin kaynaklı aritmiler ve ilaç kaynaklı toksisiteleri de içeren çeşitli hastalıkların meydana geldiği

belirlenmiştir (McCord 1993, Gutteridge and Halliwell 1994). Bu tez çalışması kapsamında çok yaygın olarak kullanılan amoksisilin, gentamisin ve sefazolin antibiyotiklerinin 100 mg/kg dozunda, altı gün boyunca, fare kalp dokusu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırma, kalp dokusundaki indirgenmiş glutasyon miktarının belirlenmesi, kalp dokusunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarının incelenmesi, kalp dokusundaki antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişimlerin belirlenmesi ve protein seviyesindeki değişikliklerin western blot yöntemiyle doğrulanması şeklinde dört aşamada gerçekleştirilmiştir.

GSH'nin hücreleri serbest radikallere karşı koruyan önemli bir hücre içi antioksidan olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. GSH'de bir azalma ya da artış, oksidatif strese neden olan ROS birikiminin bir göstergesidir (Budak vd. 2014). Çalışmamızın sonuçlarına göre gentamisin antibiyotiğinin uygulandığı gruplarda kontrole göre anlamlı bir değişiklik olmazken; amoksisilin ve sefazolin uygulanan gruplarda anlamlı bir şekilde düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre amoksisilin ve sefazolin uygulanan gruplarda glutasyonun azalmasına bağlı olarak oksidatif stres oluştuğu, gentamisin uygulanan gruplarda ise böyle bir etkinin görülmediği söylenebilir.

Yin et al. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada farelere adriamisin tek doz şeklinde intraperitoneal olarak 1-5 gün süreyle uygulanmış ve muamele grubu kalp dokusunda Gpx gen ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada da Gpx gen ekspresyonu baskılanmış ve Yin ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyum göstermiştir. Diğer antioksidan genlerin ekspresyonları genel olarak artmış olmasına karşın Gpx ekspresyonunun azalmış olması bir tezat olarak görünmektedir. Bu durum Gpx'in azalmasına bağlı olarak artan H₂O₂'nin muhtemel vereceği zararı indirgeyebilmek amacıyla diğer antioksidan genlerin ekspresyonunun artmasıyla açıklanabilir. Ayrıca amoksisilin vücutta metabolize oluyorken sefazolin ve gentamisin metabolize olmamaktadır (Öncül 2002). Bu durum amoksisilin diğer antibiyotiklere göre daha fazla ROS üretmesine sebep olabilir. Gpx'ten başka diğer antioksidan genlerin ekspresyonlarındaki artış bu sebepten kaynaklanabilir. Antibiyotiklerin negatif bir etkisi olarak açığa çıkabilecek toksisite durumuna karşı fizyolojik şartlar altında GSH'nin olması gereken hücre içi konsantrasyonunu yüksek tutmak amacıyla Gpx gen ekspresyonu bu genel geçer duruma ters düşmüş olabilir. Bununla beraber G6pd gen ekspresyonunun uygulanan antibiyotiklere bağlı olarak değişmemesi posttranskripsiyonal bir müdahaleden

kaynaklanabilir. Sefazolin antibiyotiğinin gen ekspresyonu üzerine etkilerine bakıldığında amoksisiline benzer etkilerinin görülmesinin yanı sıra Cat ve Gr antioksidan gen ekspresyonları üzerine etki etmemesi yukarıda açıklamaya çalıştığımız amoksisilin aksine metabolize olmamasından kaynaklanmış olabilir.

Sonuçlarımıza göre sefazolin antibiyotiği uygulanmış fare kalp dokularında G6pd gen ekspresyonunda önemli olmayan bir azalma söz konusudur. Budak ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da demir toksisitesinin G6pd antioksidan enzimlerin transkripsiyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Ancak fiili etkinin sıçan karaciğerinde doza bağımlı şekilde protein seviyesinde gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (Budak vd. 2014). Bizim çalışmamızda da antibiyotik toksisitesinden kaynaklı G6pd enziminin transkripsiyonunun azalması gen seviyesinde değil protein seviyesinde gerçekleşmiştir. Bu durum yukarıda yapılan çalışmayı desteklemektedir. G6pd'nin ekspresyonundaki önemsiz azalma antioksidan yolağa sağlanan NADPH miktarının azalmasına neden olabilir. Nitekim aynı antibiyotikle muamele edilmiş olan Gr gen ekspresyonundaki önemsiz değişiklik bunu desteklemektedir. Gst gen ekspresyon sonuçlarına bakıldığında ekspresyon düzeyinin arttığı görülmektedir. Gst'nin detoksifikasyonunda görevli bir enzim olduğu göz önünde bulundurulduğunda antibiyotik toksisitesine karşı GSH'ı substrat olarak kullanan gst'nin gen ekspresyonunun artmış ve GSH konsantrasyonunun azalmış olması bu durum ile uyumludur. Antioksidan yolakta ardışık olarak görev yapan Sod gen ekspresyonu anlamlı şekilde artarken oluşan H₂O₂'nin süpürülmesinden sorumlu Gpx gen ekspresyonunun azalmasını süspanse etmek amacıyla Cat gen ekspresyonunda anlamsızda olsa bir artış olduğu gözlenmiştir. Amoksisilin etkili Cat ekspresyonu anlamlı şekilde artarken sefazolin etkili Cat ekspresyonundaki anlamsız artış amoksisilin daha fazla ROS oluşturmuş olabileceği yorumunu desteklemektedir.

Gentamisin etkili gen ekspresyon sonuçlarına bakıldığında Gpx dışında diğer antioksidan gen ekspresyonlarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Bu durum diğer açıklamalarda olduğu gibi muhtemel toksisiteye karşı GSH konsantrasyonunu yüksek tutmak amacıyla gerçekleşmiş olabilir.

Bu tez çalışmasının bir diğer aşamasında antioksidan sistemin ekspresyonunu protein seviyesinde araştırdık. Bu amaçla gen ekspresyonlarına bakılan antioksidan sistemin enzim aktiviteleri araştırıldı. Buna göre gentamisin etkili gen ekspresyonuna benzer

şekilde protein seviyesinde de önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bundan yola çıkarak gentamisin kalpte oksidatif strese neden olmadığını söyleyebiliriz. Amoksisilin etkili G6PD enzim aktivite sonuçlarına bakıldığında önemli şekilde azalmış olduğu görülmektedir. Bu durumdan NADPH üretiminin az olduğu yorumunu çıkarabiliriz. Bundan dolayı beklenen GR enzim aktivitesindeki azalma yerine önemli değişim olmaması olası farklı kaynaklardan gelen NADPH'ı kullanıyor olmasından kaynaklanabildiği gibi azalan GSH miktarından dolayı bozulan GSH/GSSG oranını fizyolojik şartlarda sağlıklı bir hücrede olması gereken düzeye getirmek amacıyla da olabilir. GR ile aynı döngüde olan GPx enzim aktivitesinin değişmemiş olması zaten azalmış olan GSH miktarını GSSG'ye çevirerek daha da azaltmamak amacıyla posttranslasyonel olarak inhibe olmuş olabilir. Bu durumda GPx'in görev yapmamasından dolayı ortamda biriken H₂O₂'nin verebileceği muhtemel hücre zararını engellemek amacıyla CAT enzim aktivitesi artırılmış olabilir. Yine bu durumu destekleyerek hücre hayatının devam ettirilmesine yönelik olarak ortamda oluşacak olan H₂O₂ konsantrasyonunu belirli düzeyde tutmak amacıyla SOD enzim aktivitesi azaltılmış olabilir. GST enzim aktivitesinde anlamlı artışın olmaması da yine GST'nin substratı olan GSH konsantrasyonunun yetersizliğinden kaynaklanıyor olabilir.

Sefazolin etkili enzim aktivitesi sonuçlarına bakılacak olursa amoksisiline benzer şekilde G6PD enzim aktivitesinde anlamlı bir azalma görülürken amoksisilin antibiyotiği etkili enzim aktivite sonuçlarından farklı olarak GR enzim aktivitesinde önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Ortamda oluşabilecek muhtemel toksisiteye karşı direnç sağlamak amacıyla farklı kaynaklardan gelen NADPH'ı da kullanarak azalan GSH miktarını yeniden dengelemek amacıyla GR enzim aktivitesi arttırılmış olabilir. GPx enzim aktivitesi de amoksisilin etkisine benzer şekilde azalan GSH miktarının GSSG'ye çevrilerek daha da azaltılmaması için inaktive olmuş olabilir. Buna ek olarak çalışma sonuçlarımıza göre CAT enzim aktivitesinin artmış olması; GPx enzim aktivitesinin değişmemesi ve SOD enzim aktivitesinin artmış olmasına bağlı olarak ortamda biriken H₂O₂'nin giderilmesine yönelik olarak oluşturulan bir modifikasyon olabilir. Wrzesniok ve arkadaşları normal insan melanositleri (Hemn-DP) hücreleri üzerinde amikasinin etkilerini *in vitro* ortamda incelemiştir. Çalışmalarının sonucunda GPx enzim aktivitesi sabit kalırken; CAT ve SOD enzim aktiviteeleri ise anlamlı şekilde artmıştır. SOD enzim aktivitesinin artışından dolayı H₂O₂ miktarında önemli bir artış olduğunu ve konsantrasyona bağlı olarak CAT'ın

aktivasyon göstererek GPx enziminin aktivitesini deaktive ettiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızın özellikle sefazolin sodyum antibiyotığının GPx, SOD ve CAT enzim aktivitesi sonuçları bu çalışmayla uyum içerisinde (Wrzesniok et al. 2015).

Epigenetik; DNA'dan bağımsız şekilde hücre bazlı fonksiyonların yeniden düzenlenmesi ya da oluşturulması anlamına gelir. Epigenetik düzenlemeler, kendine has bazı mekanizmlarla fonksiyonel pek çok moleküllü posttranskripsiyonel veya posttranslasyonel olarak etkileyebilir. Ayrıca (Johnson et al. 2013) tarafından yapılan bir çalışmada epigenetik gen düzenlenmesinin hem normal hücre süreçlerinde hem de hastalıklı hallerde kontrolü sağlamada etkin olduğu rapor edilmiştir. Bu bağlamda hücreye dışarıdan yapılan bir etkinin tolere edilmesi amacıyla hücre gerek gen seviyesinde gerekse protein seviyesinde hücre hayatını devam ettirmek için bazı modifikasyonlar yapılabilir (Koçpınar 2015).

Bu durumun bir doğrulayıcısı olarak Budak ve arkadaşlarının demir ile indüklenen fare böbrek dokusundaki çalışmanın sonuçlarına göre enzim aktiviteleri ile gen ekspresyon sonuçları arasında anlamlı bir korelasyon göremediklerini rapor etmişlerdir (Budak vd. 2014). Bizim çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında benzer şekilde anlamlı bir korelasyonun olmadığı görülerek bu durum desteklenmiştir.

Çalışmamızın son aşamasında antioksidan enzimlerin protein seviyesindeki değişikliklerini doğrulamak amacıyla GPX ve GR için western blot analizi yapıldı. Genel olarak anlamlı bir korelasyon görülse de daha iyi bir değerlendirme yapabilmek için western blot çalışmasının tekrarının yapılması elzemdir.

Sonuç olarak;

-Gentamisin uygulanan gruplarda gerek GSH seviyesi, gerek gen ekspresyonu, gerekse de enzim aktiviteleri ve protein ekspresyonu sonuçlarına bakacak olursak oksidatif stres meydana gelmediği söylenebilir. Bu durumun oksidatif hasardan kaynaklı olası kalp hastalıklarına neden olmayacağı sonucuna varılabilir.

- Çalışmamızın sonuçlarına göre amoksisilin ve sefazolin antibiyotiklerinin uygulandığı gruplarda antioksidan enzim aktivitelerinin gen ve protein seviyesindeki değişiklikleri

göz önünde bulundurulduğunda çok anlamlı bir korelasyon olmasa da genel sonuçlardan yola çıkılarak bu antibiyotiklerin oksidatif hasara yol açtığı sonucuna varılabilir.

-Söz konusu antibiyotiklerle ilgili literatür taraması sonucunda kalp dokusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durumun, çalışmamızın özgün olmasından dolayı literatüre katkı sağlaması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

Adem Ş (2011) Sıçan kalp ve akciğer dokularından glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz enzimlerinin saflaştırılması, karakterizasyonu, kotinin ve bazı ilaçların enzimlerin aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 148-149

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126

Agarwal R, Chase SD (2002) Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 775(1): 121-126

Akkuş İ (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1.Baskı

Al-Sowayan NS (2014) Antioxidant potential of grape seed extract and vitamin E in ameliorating doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Pensee Journal* 76: 5

Ali BH (1995) Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Research Support, Non-U.S. Gov't Review. Gen Pharmacol* 26(7): 1477-1487

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113: 548-555

Antmen ŞE (2005) Beta Talasemide Oksidatif Stres. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi, Adana, 18

Atlı Y (2009) İntestinal iskemi Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Alfa Lipoik Asit Ve Quersetin'in Koruyucu etkilerinin Araştırılması. Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı, Kahramanmaraş 31-32

Baltruskeviciene E, Kazbariene B, Badaras R, Bagdonaite L, Krikstaponiene A, Zdanavicius L, Didziapetriene J (2016) Glutathione and glutathione S-transferase levels in patients with liver metastases of colorectal cancer and other hepatic disorders. *Turk J Gastroenterol* 27(4): 336-341

Başhan P (2009) Gentamisinle nefrotoksisite oluşturulan sıçanlarda L-Argininin koruyucu etkisi üzerine katyonik kompetisyonun olası katkısı. Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi, Adana 19-20

Baykal Y, Kocabalkan F (2000) Serbest radikalleri ve hücre hasarı. *Sendrom* 9: 3136

Beutler E (1971) Red cell metabolism manual of biochemical methods. London: Academic Press 68-70

Blake DR, Allen RE, Lunec J (1987) Free radicals in biological systems--a review orientated to inflammatory processes. *Research Support, Non-U.S. Gov't, Review. Br Med Bull* 43(2): 371-385

Borneo R, Leon AE, Aguirre A, Ribotta P, Cantero J (2009) Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry* 112: 664-670

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Research Support U.S. Gov't, P.H.S. Anal Biochem* 72: 248-254

Bril F, Gonzalez CD, Di Girolamo G (2010) Antimicrobial agents-associated with QT interval prolongation. *Review. Curr Drug Saf* 5(1) 85-92

Budak H, Gonul N, Ceylan H, Kocpinar EF (2014) Impact of long term Fe³⁺ toxicity on expression of glutathione system in rat liver. *Research Support, Non-U.S. Gov't. Environ Toxicol Pharmacol* 37(1): 365-370

Budak H, Kocpinar EF, Gonul N, Ceylan H, Erol HS, Erdogan O (2014) Stimulation of gene expression and activity of antioxidant related enzyme in Sprague Dawley rat kidney induced by long-term iron toxicity. *Research Support, Non-U.S. Gov't. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 166: 44-50

Cadet JL (1988) Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview. Review. *Int J Neurosci* 40(1-2): 13-18

Carlberg I, Mannervik B (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250(14): 5475-5480

Ceylan T (2006) Sıçanlarda Oluşturulan İnce Bağırsak İskemi-Reperfüzyon Hasarında Curcumin'in Etkinliği. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Edirne 12-13

Champe PC, Harvey R (1997) Glikozaminoglikanlar. Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya ikinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 147-156

Chandan SK (2000) Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Ph.D. Elsevier 9 197

Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. Research Support Non-U.S. Gov't Review *Br Med Bull* 49(3) 481-493

Chopineau J, Sommier MF, Sautou V (1994) Evaluation of free radical production in an ischaemia-reperfusion model in the rabbit using a tourniquet. *J Pharm Pharmacol* 46(6): 519-520

Ciancio SG, Bourgault PC (1989) Clinical Pharmacology for Dental Professionals. Chicago: Year Book Medical Publisher ISBN: 0884165868. Media: http://isbndb.com/d/book/clinical_pharmacology_for_dental_professionals_a01.html

Çakır Y (2012) İnorganik Arsenik Ve Vanadyum Bileşiklerinin Detoksifikasyonunda Glutatyonun Rolü. *Türk Biyokimya Dergisi*, 37: Özel sayı 1

Çetik S, Ayhancı A, Şahintürk V (2015) Protective Effect of Carvacrol Against Oxidative Stress and Heart Injury in Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity in Rat. *Brazilian Archives of Biology And Technology* 58(4): 569-576

Dumitrescu AL (2011) Antibiotics and Antiseptics in Periodontal Therapy. <http://www.springer.com/medicine/dentistry/book/978-3-642-13210-0>

Dündar Y, Aslan R (1999) Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü. Hayvancılık Araştırma Dergisi 9(1-2): 32-39

Erdem A, Gundogan NU, Usubutun A, Kilinc K, Erdem SR, Kara A, Bozkurt A (2000) The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. Research Support, Non-U.S. Gov't. Nephrol Dial Transplant 15(8): 1175-1182

Erdoğan O, Ceyhan SB, Şişecioğlu M, Karakuş E, Budak H (2016) III. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Lisansüstü Yaz Okulu, Book, Aktif Yayıncılık 6: 103

Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S., Review Nutrition 18(10): 872-879

Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, Visioli O (1998) Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. Research Support Non-U.S. Gov't, Review Eur Heart J 19 Suppl B B2-11

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Calderera CM, Albertini A, Visioli O (1985) Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion: Role of the cellular defenses against oxygen toxicity. J Mol Cell Cardiol 17: 93-945

Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. Review. Lab Invest 47(5): 412-426

Gavat V, Voroniuc O (1999) Oxidative stress and antioxidants in the diet in pathological processes at the level of the cardiovascular system Review Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 103(1-2): 37-41

Gebicki JM, Bartosz G (2010) The role of proteins in propagation of damage induced by reactive oxygen species in vivo Review Postepy Biochem 56(2): 115-123

Ghoneim MA, Hassan AI, Mahmoud MG, Asker MS (2016) Protective Effect of Adansonia digitata against Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in Rats. Anim Biotechnol 27(2): 84-95

Gnanapragasam A, Ebenezar KK, Sathish V, Govindaraju P, Devaki T (2004) Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 76(5): 585-597

Gowtham AR, Joshua RM, Azza S, Charles LB, Georges NS, Scott S, Scott M (2014) Azithromycin and Levofloxacin Use and Increased Risk of Cardiac Arrhythmia and Death. *Ann Fam Med* 12: 121-127

Gören UD (2011) Gentamisinin neden olduğu böbrek korteks hasarına karşı curcuminin koruyucu etkisinin morfolojik olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne 21-22

Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Research Support Non-U.S. Gov't. *Anal Biochem* 106(1): 207-212

Grune T (2002) Oxidants and antioxidative defense. *Hum Exp Toxicol* 21(2): 61-62

Gurbuzel M, Sayar I, Cankaya M, Gurbuzel A, Demirtas L, Bakirci EM, Capoglu I (2016) The preventive role of levosimendan against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Research Support Non-U.S. Gov't. *Pharmacol Rep* 68(2): 378-382

Gutteridge JM, Halliwell B (1992) Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine. Second Edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Letter Free Radic Biol Med* 12(1): 93-95

Gutteridge JM, Halliwell B (1994) Antioxidants in nutrition, health and disease. New York: Oxford University Press 81: 7-14

Halliwell B, Gutteridge JM (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Oxford 2nd edn

Hitchler MJ, Domann FE (2007) An epigenetic perspective on the free radical theory of development. Research Support, N.I.H., Extramural, Review. *Free Radic Biol Med* 43(7) 1023-1036

Horz HP, Conrads G (2007) Diagnosis and anti-infective therapy of periodontitis. Review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5(4) 703-715

Hussein AA (2011) Ratlarda Kalp Üzerine Kafeinin Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı, Ankara 27

Iwata K, Nishinaka T, Matsuno K, Yabe-Nishimura C (2006) Increased gene expression of glutathione peroxidase-3 in diabetic mouse heart. *Biol Pharm Bull* 29(5): 1042-1045

Jacob RA (1986) Trace Elements in Textbook of Clinical Chemistry. (Tietz N. W. ed.) Philadelphia: W.B. Saunders Company

Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, Mossman BT (1993) Cell and tissue responses to oxidative damage. Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support U.S. Gov't P.H.S. Review Lab Invest 69(3): 261-274

Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S, Collins JJ (2013) Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells. *Sci Transl Med* 5(192): 192ra185

Karahan I, Atessahin A, Yilmaz S, Ceribasi AO, Sakin F (2005) Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 215(3): 198-204

Karahan İ, Yılmaz S, Ateşşahin A (2006) Ratlarda Cisplatin Ve Gentamisin Kan İle Karaciğerde Oluşturdukları Oksidatif Stres Üzerine Likopenin Etkileri. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* 20(1): 39-43

Katzung B, Masters S, Trevor A (2012) Basic and Clinical Pharmacology. [http://www.abebooks.com/9780071764018/Basic-Clinical Pharmacology-E-Katzung-0071764011/plp](http://www.abebooks.com/9780071764018/Basic-Clinical-Pharmacology-E-Katzung-0071764011/plp)

Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK (1993) Free radicals and the heart. Research Support, Non-U.S. Gov't, Review *J Pharmacol Toxicol Methods* 30(2): 55-67

Kavas GE (1989) Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri* 9: 1-7

Kayaalp O (2002) Betalaktam antibiyotikler: Sefalosporinler. *Tıbbi farmakoloji Ankara* Chapter 18: 234-248

Kehrer JP, Klotz LO (2015) Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Review Crit Rev Toxicol* 45(9) 765-798

Kemaloğlu A (2011) Ratlarda Sefazolin Sodyumun Cilt Yarası İyileşmesine Etkisi. Tıpta uzmanlık tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri 24-25

Kılınç K (1985) Oksijen Radikalleri: Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. *Biyokimya Derg* 10: 60-89

Kılınç K, Kılınç K (2002) Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 33: 110-118

Kinnula VL, Crapo JD (2004) Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S., Review Free Radic Biol Med* 36(6): 718-744

Kinnula VL, Paakko P, Soini Y (2004) Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *Research Support, Non-U.S. Gov't, Review. FEBS Lett* 569(1-3): 1-6

Kır AÇ (2012) Renal İskemi Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Epigallokateşin-3-Gallat Ve Quercetin'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş 28

Koçpınar EF (2015) Tip60 Geninin Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde Araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum 58-66

Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Research Support U.S. Gov't, Non-P.H.S. Cell* 130(5): 797-810

Korkmaz-Icoz S, Atmanli A, Radovits T, Li S, Hegedus P, Ruppert M, Szabo G (2016) Administration of zinc complex of acetylsalicylic acid after the onset of myocardial injury protects the heart by upregulation of antioxidant enzymes. *Research Support Non-U.S. Gov't. J Physiol Sci* 66(2): 113-125

Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H (1997) Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2478–2480

Kurutaş BE, İnanç GF, Kılınc M (2004) Serbest Radikaller. *Arşiv* 13 120-131

Lai HC, Yeh YC, Ting CT, Lee WL, Lee HW, Wang LC, Liu TJ (2010) Doxycycline suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in mouse hearts. *Research Support Non-U.S. Gov't. Eur J Pharmacol* 644(1-3): 176-187

Li PY, Chang YC, Tzang BS, Chen CC, Liu YC (2007) Antibiotic amoxicillin induces DNA lesions in mammalian cells possibly via the reactive oxygen species. *Research Support Non-U.S. Gov't. Mutat Res* 629(2): 133-139

Liang QN, Sheng YC, Jiang P, Ji LL, Xia YY, Min Y, Wang ZT (2011) The difference of glutathione antioxidant system in newly weaned and young mice liver and its involvement in isoleucine-induced hepatotoxicity. *Research Support Non-U.S. Gov't. Arch Toxicol* 85(10): 1267-1279

Liochev SI, Fridovich I (2002) The Haber-Weiss cycle 70 years later: an alternative view. *Comment, Letter. Redox Rep* 7(1): 55-57

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4) 402-408

Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J (2003) Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Research Support, Non-U.S. Gov't. Free Radic Biol Med* 35(3): 317-324

McCord JM (1993) Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance *Review Clin Biochem* 26(5): 351-357

Meram İ, Aktaran Ş (2002) Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv* 11 299

Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM (1999) Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Research Support Non-U.S. Gov't, Review Antimicrob Agents Chemother* 43(5): 1003-1012

Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV (2005) Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. Research Support Non-U.S. Gov't. Singapore Med J 46(2): 82-87

Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N (1998) Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. Am Heart. J 135(1): 115-120

Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. Free Radic Biol Med 31(11): 1287-1312

Oberley LW (1982) Representative of Polypeptid Structure of Bovine CuZnSOD. Superoxide Dismutase I 28

Öncül O (2002) Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi 31: 23-28

Özdamar MY (2008) Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidin (Üzüm Çekirdeği Proantosiyanidin) Ekstresinin Etkisi. Uzmanlık tezi, Meram Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Selçuk Üniversitesi, Konya 19

Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 70(1): 158-169

Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M (2000) A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. J Mol Biol 304(1): 55-68

Paterson DL, Robson JM, Wagener MM (1998) Risk factors for toxicity in elderly patients given aminoglycosides once daily. J Gen Intern Med 13(11): 735-739

Pençe S, Çiftçi M, Küfrevioğlu Öİ (2000) İnsan Eritrosit Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin İn Vitro Etkileri. Genel Tıp Dergisi 10(4): 141-142

Pochini L, Galluccio, M Scumaci, D Giangregorio N, Tonazzi A, Palmieri F, Indiveri C (2008) Interaction of beta-lactam antibiotics with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. Chem Biol Interact 173(3): 187-194

Radak Z (1998) Free radicals in exercise and aging, human kinetics. United States of America reactions Mayo Clin Proc 63(4): 381-389

Ray WA, Murray KT, Hall K, Arbogast PG, Stein CM (2012) Azithromycin and the risk of cardiovascular death. N Engl J Med 366(20): 1881-1890

Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A (1997) Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. Life Sci 60(25): 2255-2271

Rose LF, Genco RJ, Cohen DW, Mealey BL (2000) Periodontal Medicine. Hamilton: B.C. Decker Inc Media:<http://www.amazon.com/Periodontal-Medicine-CD-Rom-Loise-Rose/dp/1550091204> (erişim tarihi: 17.10.2016)

Sarı S (2008) Farelerde Ehrlich Asit Solid Tümör Modelinde Thymus Sipyelus ve Taurinin, Böbrek Mda, Glutasyon, Aopp Düzeylerine Ve Sod Aktivitesine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı, Ankara 7

Saygılı Eİ (1997) Kolorektal Kanserli Hastalarda Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistemler. Uzmanlık Tezi, Cerrah Pasa Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi İstanbul 16-17

Scandalios JG (2002) The rise of ROS. Review. Trends Biochem Sci 27(9): 483-486

Selcuk EB, Sungu M, Parlakpınar H, Ermis N, Taslidere E, Vardi N, Kayhan-Tetik B (2015) Evaluation of the cardiovascular effects of varenicline in rats. Drug Des Devel Ther 9: 5705-5717

Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal, PK (1995) Oxidative stress and heart failure. Mol Cell Biochem 147(1-2): 77-81

Slater TF (1984) Free-radical mechanisms in tissue injury. Biochem J 222(1): 1-15

Stadtman ER, Levine RL (2000) Protein oxidation. Ann NY Acad Sci 899: 191-208

Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988) A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 34(3): 497-500

Svanstrom H, Pasternak B, Hviid A (2013) Use of azithromycin and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 368(18): 1704-1712

Şahin T (2011) Karbon Tetraklorür (CCl₄) Verilen Rat Kalp Dokularında Oksidan / Antioksidan Sistemlerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 20-21

Şener G, Yeğen BÇ (2009) İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 22(3): 5-13

Tachakittirungrod S, Okonogi S, Chowwanapoonpohn, S (2007) Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chem* 103: 381-388

Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U (2000) Serbest Radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1: 52-58

Tavafi M, Ahmadvand H (2011) Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Tissue Cell* 43(6): 392-397

Telören B (2008) Edirne İl Merkezinde 7-12 Yaş Grubu Çocuklarda Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim eksikliği Taraması. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Edirne 9

Tokaç D (2007) Bitkisel Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Oksidatif DNA Hasarına Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara 51

Tsang C (2004) Antioxidant activity, protective effects and absorption of polyphenolic compounds. Ph. D. Thesis. Faculty of Biomedical & Life Sciences, University of Glasgow 15-16

Uysal M (1998) Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeneyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 11: 336-341

Walker PD, Shah SV (1988) Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 81(2): 334-341

Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S (1997) Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev* 23(4): 209-240

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44(4): 275-295

Wrzesniok D, Beberok A, Otreba M, Buszman E (2015) Impact Of Gentamicin On Antioxidant Enzymes Activity In HEMn-DP CELLS. Research Support, Non-U.S. Gov't. *Acta Pol Pharm* 72(3): 447-453

Wynn RL (2013) Azithromycin associated with a small increased risk of cardiovascular death: a review. *Review Gen Dent* 61(2): 8-9

Xiong Y, Liu X, Lee CP, Chua BH, Ho YS (2006) Attenuation of doxorubicin-induced contractile and mitochondrial dysfunction in mouse heart by cellular glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* 41(1): 46-55

Yalçın AS (1998) Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 11 342-346

Yin X, Wu H, Chen Y, Kang YJ (1998) Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem Pharmacol* 56(1): 87-93

Young IS, Woodside JV (2001) Antioxidants in health and disease. Review *J Clin Pathol* 54(3): 176-186

Yuce A, Atessahin A, Ceribasi AO, Aksakal M (2007) Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101(5): 345-349

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Mersin’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Mersin’de tamamladı. 1999 yılında Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2004 yılında bu bölümden mezun oldu. 2009 yılında, Muş Alparslan Üniversitesi Kimya Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak işe başladı. 2012 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bilim Dalı’nda ‘Rat Karaciğer Ve Böbrek Dokularında 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-P-Dioksin (TCDD)’nin Neden Olduğu Oksidatif Stres Üzerine Protokateşik Asit ’in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması’ başlıklı yüksek lisans tezini tamamladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.