

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**FARELERDE EHRLICH ASİT SOLİD TÜMÖR MODELİNDE THYMUS
SİPYLEUS ve TAURİNİN, BÖBREK MDA, GLUTATYON, AOPP
DÜZEYLERİNE ve SOD AKTİVİTESİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Salih SARI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nedret KILIÇ

ANKARA
Ocak 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**FARELERDE EHRLICH ASİT SOLİD TÜMÖR MODELİNDE THYMUS
SİPYLEUS ve TAURİNİN, BÖBREK MDA, GLUTATYON, AOPP
DÜZEYLERİNE ve SOD AKTİVİTESİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Salih SARI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nedret KILIÇ

Bu tez çalışması kısmen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri SBE-11/2004-06 kod numaralı proje ile desteklenmiştir.

ANKARA
Ocak 2008

KABUL ve ONAY

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : Salih Sarı
ANABİLİM DALI : Tıbbi Biyokimya (Tıp)
SINAV TARİHİ : 04.01.2008
TEZ KONUSU : Farelerde Ehrlich Asit Solid Tümör
Modelinde Thymus Sipyokus ve Taurininin
Böbrek MDA Glutasyon AOPP Düzeylerine
ve SOD Aktivitesine Etkisi
KARAR : Başarılı

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :
Kabulüne : X
Reddine :

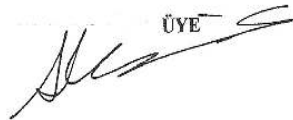
OYBİRLİĞİ / OYÇOKLUĞU ile karar verilmiştir.

GEREKÇE :

Prof. Dr. Halime Paşaoğlu
JÜRI BAŞKANI

ÜYE
Prof. Dr. Aygün Babül

ÜYE
Prof. Dr. Nedret Kılıç

ÜYE


ÜYE

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	V
Grafikler ve Tablolar	VI
Semboller, Kısaltmalar	VII
Önsöz	VIII

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	5
2.2.1. Serbest Radikal Oluşumunu Artıran Faktörler	6
2.2.2. Süperoksit Radikali	7
2.2.3. Hidrojen Peroksit	8
2.2.4. Hidroksil Radikali	8
2.2.5. Singlet Oksijen	9
2.2.6. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri	9
2.2.6.1. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri	10
2.2.6.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	12
2.2.6.2.1. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu	12
2.2.6.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri	13
2.3. Antioksidanlar	13
2.3.1. Antioksidan Enzimlerin Sınıflandırılması	14
2.3.2. Enzim Karakterli Antioksidanlar	15
2.3.2.1. Süperoksit Dismutaz	15
2.3.2.2. Katalaz	15
2.3.2.3. Glutasyon Peroksidaz	16
2.3.3. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	17
2.3.3.1. Antioksidan Vitaminler	17
2.3.3.2. Karotenoidler	17
2.3.3.3. Glutasyon	18
2.3.3.4. Ürik Asit	18
2.3.3.5. Bilirubin	18
2.3.3.6. Melatonin	18
2.3.3.7. Stobadin	19
2.4. Total Antioksidan Durum	19
2.5. Serbest Oksijen Radikallerinin Kanserle İlişkisi	20
2.5.1. Oksidatif Stresin Tümör Başlamasındaki Rolü	20
2.5.2. Oksidatif Stresin Tümör Gelişmesindeki Rolü	21
2.5.3. Oksidatif Stresin Tümör İlerlemesindeki Rolü	22

2.6. Böbrek Dokusu ve Serbest Radikaller	22
2.6.1. Glomerül Hasar	24
2.6.2. Nefrotoksik Hasar	25
2.6.3. İskemi - Reperfüzyon Hasarı	25
2.6.3.1. Akut Böbrek Yetmezliği (İskemi-Perfüzyon Hasarı)	25
2.6.3.2. Böbrek Transplantasyonu	27
2.6.4. Böbrek İskemi - Reperfüzyon Hasarında Serbest Oksijen Radikal Kaynakları ve Serbest Oksijen Radikallerince Böbreklerde Oluşturulan Hasar Mekanizmaları	29
2.6.4.1. Ksantin Oksidaz Sistemi	29
2.6.4.2. Nötrofiller	31
2.6.4.3. Endotel Hücre Tetikleme Mekanizması	32
2.6.4.4. Hücre İçi Kalsiyum (Ca^{+2}) Artışı	33
2.6.4.5. Araşidonik Asit Metabolizması	36
2.6.4.6. Mikrovasküler Yapının Bozulması ve “Re-flow Paradoks Fenomeni”	38
2.6.4.7. Eritrosit Tuzağı	41
2.6.4.8. Lökosit Yapışması ve Lökosit Tıkacı	42
2.6.5. Böbreklerde Antioksidan Sistem	43
2.7. Kekik ve Genel Özellikleri	45
2.7.1. Kekik	45
2.7.2. Kekiğin Etkileri ve Kullanım Alanları	46
2.8. Taurin	47
2.8.1. Taurinin Genel Özellikleri	47
2.8.2. Taurinin Genel Etkileri	51
2.8.2.1. Taurinin Membran Stabilize Edici Fonksiyonu	51
2.8.2.2. Taurinin Hücre Ca^{+2} Homeostasisi Üzerine Etkisi	51
2.8.2.3. Taurinin Lipit Metabolizması Üzerine Etkisi	52
2.8.2.4. Taurinin Antioksidan Özelliği	52
3. GEREÇ ve YÖNTEM	55
3.1. Kullanılan Gereçler	55
3.1.1. Deney Hayvanları	55
3.1.2. Kullanılan Aletler	55
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	55
3.2. Uygulanan Yöntemler	56
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	56
3.2.2. Metodların Uygulanması	57
3.2.2.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeyinin Ölçülmesi	57
3.2.2.2. Böbrek Dokusu SOD Aktivitesinin Ölçülmesi	58
3.2.2.3. Böbrek Dokusu Glutasyon Düzeyinin Ölçülmesi	59
3.2.2.4. Böbrek Dokusu AOPP Düzeyinin Ölçülmesi	60
3.2.2.5. Lowry Doku Protein Tayini	60
3.2.2.6. Sonuçların Analizi	61

4. BULGULAR	62
4.1. Böbrek Dokusu MDA Sonuçları	63
4.2. Böbrek Dokusu SOD Aktivitesi Sonuçları	64
4.3. Böbrek Dokusu GSH Sonuçları	65
4.4. Böbrek Dokusu AOPP Sonuçları	65
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ	73
7. ÖZET	74
8. SUMMARY	75
9. KAYNAKLAR	76
10. EKLER	92
11. ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER

Şekil 1. Lipit peroksidasyonu	11
Şekil 2. Antioksidan gruplar ve görevleri	14
Şekil 3. Glutasyon döngüsü	16
Şekil 4. İskemi -reperfüzyon hasarının mekanizması	19
Şekil 5. Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması	29
Şekil 6. Böbreklerde ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşüm modeli	31
Şekil 7. Endotel hücre tetikleme mekanizması	32
Şekil 8. Böbrek tübüler epitel hücresinde Ca^{+2} regülasyonu	33
Şekil 9. İskemik böbrek vasküler hasar mekanizmasının basamakları	34
Şekil 10. İskemi-reperfüzyon modelinde tübüler epitelde Ca^{+2} un rolü ve hasar oluşturuu mekanizmaları	36
Şekil 11. Araşidonik asit metabolizması ve radikal oluşumu	37
Şekil 12. Mikrovasküler ve hücreseu hasarın iskemi ve postiskemik reperfüzyon dönemlerindeki patomekanizması	39
Şekil 13. “Re-flow paradoks” dönemindeki hücreseu ve mikrovasküler hasarın patomekanizması	40
Şekil 14. Kısa kapillerde konjesyon görünümü	41
Şekil 15. Uzun kapillerde kuatronekzogonal eritrosit paket birikiminin görünümü	41
Şekil 16. Eritrosit tuzağı oluşma mekanizması	42
Şekil 17. Lökosit yapışmasının hasar oluşturma mekanizması	43
Şekil 18. Taurin biyosentez yolu	48

GRAFİKLER ve TABLOLAR

Grafikler

Grafik 1. Tüm gruplara ait ağırlık istatistikleri	63
Grafik 2. Böbrek dokusu MDA ortalamaları (nmol / g doku)	63
Grafik 3. Böbrek dokusu SOD ortalamaları (ünite / mg protein)	64
Grafik 4. Böbrek dokusu GSH ortalamaları (μmol / mg protein)	65
Grafik 5. Böbrek dokusu AOPP ortalamaları (nmol / mg protein)	65

Tablolar

Tablo 1. Reaktif oksijen partikülleri	5
Tablo 2. Reaktif oksijen türlerinin sorumlu tutulduğu böbrek hastalıklarında geliştirilen deneysel modeller	24
Tablo 3. Taurinin çeşitli sistemlere etkisi	49
Tablo 4. Çeşitli dokulardaki taurin konsantrasyonu	50
Tablo 5. Çalışma grupları ve özellikleri	56
Tablo 6. Tüm gruplara ait istatistiksel sonuçlar	62
Tablo 7. Tüm gruplara ait ağırlık istatistikleri	62

SEMBOLLER, KISALTMALAR

NO[·]	: Nitrik oksit
NO₂[·]	: Nitrojen dioksit
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
ONOO⁻	: Peroksinitrit
¹O₂	: Singlet oksijen
O₂^{-·}	: Süperoksit
·OH	: Hidroksil radikali
ROO[·]	: Peroksi radikali
ROOH	: Hidroperoksit
RO[·]	: Alkoksi radikali
ROOR	: Endoperoksit
HO₂[·]	: Hidroperoksi radikali
NO₂⁺	: Nitril katyonu
NO⁻	: Nitroksil
NO⁺	: Nitrozil
ONOO[·]	: Peroksinitrit radikali
N₂O₃	: Dinitrojen trioksit
N₂O₄	: Dinitrojen tetraoksit
HO₂[·]	: Perhidroksil radikali
R[·]	: Zincir başlatıcı radikal
AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
KAT	: Katalaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
GSH	: Glutasyon
STB	: Stobadin
DNPH	: Dinitrofenil hidrazin
BSA	: Sığır serum albumini
DTNB	: 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)
3-NT	: 3-nitrotirozin
PC	: Protein karbonil
T-SH	: Total tiyol grupları
P-SH	: Protein tiyol grupları

ÖNSÖZ

Kanser, anormal vücut hücrelerinin kontrolsüz üremeleri ile meydana gelen bir doku kitlesi olarak tanımlanmaktadır . Dünyada her yıl binlerce kişi kanser nedeniyle ölmektedir. Günümüzde antioksidanların kanser üzerine etkileri yaygın olarak araştırılmaktadır.

Çalışmamızda farelerde Ehrlich asit solid tümör modelinde taurinin ve bir kekik türü olan Thymus sipyleus' un böbrek dokusunda meydana getirdiği antioksidan etkilerini araştırdık.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak, desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Nedret KILIÇ' a;

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Prof. Dr. Aydan BABÜL' e;

Tez çalışmalarım sırasında her türlü destek, yardım ve anlayışı için Dr. Zuhal YILDIRIM' a;

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (GÜDAM) Müdürü Prof. Dr. Engin ÇALGÜNER ve veteriner hekimleri, Dr. Şeyda DİKER ve Dr. Elif ERGÜVEN KAYA' ya;

Güler yüzü ve bitmeyen enerjisiyle çalışmalara katılan, çalışma arkadaşım Gamze TURNA' ya;

Eğitimimde emeği geçen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma;

Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında çalışmalarım sırasında her türlü yardımları için asistan arkadaşlarıma;

Çalışmalarımda katkısını esirgemeyen, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi çok sevdiğim dostum Seçil ŞENGÖREN' e;

Her zaman yanımda olan aileme;

Ve sevgili arkadaşlarıma;

Teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Kanser, normal dokuların gelişimini aşan, normal dokulara uyum göstermeyen ve kendisini meydana getiren uyarının yok olması durumunda bile aşırı seyrinde devam eden bir doku kitlesi olarak tanımlanmaktadır ¹.

Kanser, içerisinde bulunduğumuz modern çağın en ciddi hastalığı olup, insan ölümlerine yol açan nedenler arasında önemli bir yere sahiptir. Gelişmiş toplumlarda kanserden kaynaklanan ölümler ilk sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ise giderek artmaktadır. Günümüzde kanser ile mücadele çok ciddi çabalar ve inanılmaz miktarlarda bütçeler harcanmaktadır. Buna rağmen kanser, insan sağlığını tehdit eden ilk faktör olma özelliğini muhafaza etmektedir ².

Bugün kanseri önlemede en umut verici strateji, kemoterapidir. Kemoterapi, insanda kanser gelişimini önleyici sentetik veya doğal maddelerin (yalnız başına veya kombinasyonu) kullanımı olarak tarif edilir. Halk tarafından kullanılan bitkiler, sebzeler ve şifalı otlar, kanser kemoterapisinin keşfedilmesinin ve gelişiminin ana kaynağı olmuştur ³.

Bitki kaynaklı doğal ürünlerden bazıları, antitümör ve antioksidan aktiviteleri içeren çeşitli farmakolojik özelliklerinden dolayı yıllardır ilgiyi üzerinde toplamaktadır ^{4,5}. Bitki kaynaklarından antikanser ajan aramada en iyi yaklaşımlardan biri; modern bilimin ışığında, etkinliği ve güvenilirliği test edilmiş bitkilerin seçimidir ⁶.

Aromatik bitkilerin antioksidan aktivitesi yapılarındaki fenolik bileşiklerle ilişkilidir ⁷. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet (tekli) oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır ^{8,9}. Bu bileşikler, lipitlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbonhidrat, nükleik asitler) serbest radikallerce okside olmalarını engellemek için aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarda bulunan hidrojeni verebilmektedir ¹⁰.

Aromatik bitkilerin kimyasal bileşimi birçok etmene bağlı olarak farklılık gösterdiğinden, antioksidan etkileri de değişebilmektedir ^{11,12}. Türkiye’ de yetiştirilen aromatik bitkiler arasında kekiğin güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir ¹¹.

Üzerinde en fazla araştırma yapılan aromatik bitki kekiktir. Ülkemizde ticareti yapılan ve yaygın olarak kullanılan cinsler; Origanum, Thymbra, Coridothymus, Satureja ve Thymus’ dur. Bunlardan en fazla ihracatı yapılan türlerin ortak özelliği, yüksek düzeyde uçucu yağ

içermeleri ve uçucu yağın ana bileşenlerinin timol ve/veya karvakrol olmasıdır. Bu maddeler kekiğe kendine özgü kokusunu veren ve antioksidan özellik kazandıran fenolik bileşiklerdir ¹³. Bu bileşikler uçucu yağların %78-82' sini oluşturmaktadır ¹⁴.

Taurin; organizmada metionin, sistein gibi sülfür içeren amino asitlerin metabolizmasından açığa çıkar ^{15,16}. Organizmadaki taurin havuzu diyetle alınan kükürtlü amino asitlerin endojen metabolizması ile belirlenir ¹⁷. Taurin esas olarak beyin ve karaciğerde sentezlenmektedir ¹⁸.

Bugün taurinin pek çok önemli işlevlerinin olduğu saptanmıştır. Safra asidi sentezinde sınırlayıcı, osmoregülatör, enerji verici ve santral sinir sisteminde nöroinhibitör etkili olduğu gösterilmiştir ¹⁹.

Literatürde taurinin in vivo ve/veya in vitro şartlarda antioksidan olarak davrandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır ^{16,20,21}. Örneğin, CCl₄ ile indüklenmiş karaciğer ve karaciğer mikrozomlarında taurinin malondialdehit (MDA) yapımını azalttığı, pnömotoksik maddelere bağlı sekonder olarak akciğerde gelişen lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir ²¹. Ayrıca taurin, doksorubisin gibi antikanser ilaçların kalpte lipid peroksidasyonunu artırıcı etkilerini önlemektedir ²². Yine bu amino asidin koroner arter greftlerinde serbest radikal süpürücü özelliği nedeniyle reperfüzyon sırasında hücre hasarını ve lipid peroksidasyonunu belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir ²³.

Bu gerçekler ışığında, bu çalışmada; Swiss Albino faresinde, Erlich Ascites Carcinom (EAC)' a karşı, Tymus Sipyaleus kekik türü bitkisinin etanol ekstraktının ve taurinin böbrek dokusunda meydana getirdiği antioksidan durumu değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz (otonom), normal dışı büyümesi olarak tarif edilebilir ²⁴. Kansere neden olan maddelere “Karsinojen” adı verilir. Karsinojen madde, radyasyon gibi fiziksel, polisiklik hidrokarbon gibi kimyasal veya virüs gibi biyolojik ajan olabilir ²⁴.

Günümüzün en önemli ölüm nedenlerinden olması sebebiyle kanser oluşumunun önlenmesi, üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir ²⁵.

Karsinojenaz üç farklı aşamada incelenir. Bu aşamalar başlangıç evresi (initiation), gelişim evresi (promotion) ve ilerleme evresi (progression) olarak adlandırılır ²⁴.

Başlangıç evresi geri dönüşümsüz bir olaydır. Normal dokuda yer alan hücrenin karsinojenle karşılaşması sonucu genomik DNA hasarı oluşur. Oluşan hasarın tamiri söz konusu değildir. Somatik mutasyona yol açan genotoksik hasar, mitoz sırasında mutasyonlu hücre koloni oluşmasına yol açar ²⁵.

Gelişim evresi kısaca premalign tümör hücre popülasyonunun aktif çoğalmasını sağlamak üzere hasarlı hücrelerin büyümesi olarak tanımlanabilir. İlerleme evresi ise geri dönüşümsüz bir mekanizmadır. Yeni bir tümör hücre klonu meydana getirir, bunun sonucu proliferatif kapasite ve invazyon artarak metastatik potansiyel gelişir ²⁶.

Kanserojen etkenler ya doğrudan DNA hasarı yaparak (genotoksik etki) ya hücre proliferasyonunu artırarak ya da her ikisine birden neden olarak kanser riskini artırırlar ²⁷. Bugüne dek insanda kanserojen olduğu tanımlanan eksojen etkenlerin büyük kısmı genotoksik etkilidir ²⁸. Genotoksik veya DNA reaktif karsinojenlerin oluşturduğu reaktif elektrofilik türevler ve serbest radikaller doğrudan DNA hasarı yaparlar. Bu lezyonların DNA onarım enzimleri tarafından uzaklaştırılması ve tamiri söz konusudur. Ancak onarım mekanizması tamamlanmadan hücrenin bölünmesi DNA hasarının kalıcı hale gelmesine ve mutasyona neden olur ^{28,29}. Kritik genlerde oluşan mutasyonlar kanser gelişimine yol açarlar. Örneğin, insanda görülen tümörlerin yarısından fazlasında tümör supressör gen p-53’ de mutasyonların olduğu saptanmıştır ²⁹.

Normal hücrelerin proliferasyonu onkojenler ile regüle edilir ve tümör süpresör genler ile dengelenir. Kanser gelişiminde onkojenin etkisinin aktivasyona sebep olduğu veya bir tümör süpresör geninin kaybında inaktivasyona sebep olduğu ya da her ikisinde bir arada

görüldüğü ileri sürülmektedir ³⁰. Kansere çeşitlerinden en çok akciğer kanseri, bunu sıra ile kolorektal kanserler, meme kanseri, prostat kanseri, mesane kanseri, non-hodgkin lenfoma, uterus kanseri, farinks ve oral kavite kanserleri, pankreas kanseri, lösemi, malign melanoma, böbrek, mide over, beyin ve sinir sistemi, serviks, karaciğer, larinks ve tiroid bezi kanseri, multiple myeloma, özefagus kanseri, hodgkin lenfoma ve testis kanseri izler. Gelişen teknoloji ile insanların kanser yapıcı maddelere daha çok maruz kalmaları da kanser sıklığını etkilemektedir. Görülme sıklığı ve yüksek ölüm oranına ilave olarak kanser tedavisinin pahalılığı da sosyoekonomik bazı sorunları ortaya çıkarmaktadır ³⁰. Erken tanı tedavi ile kanserli hastalarda önemli oranda iyileşme mümkün olabilmektedir. Erken teşhis edilen kanser potansiyel olarak tedavi edilebilir. Amaç tümörün cerrahi olarak tamamen uzaklaştırılabilecek kadar küçük olduğu zaman teşhis etmektir. Maalesef pek çok durumda teşhis edildiği dönemde tümör ya cerrahi olarak uzaklaştırılabilecek kadar küçük değildir, ya da kanser diğer dokulara metastaz yapmış durumdadır. Medikal onkolog ve cerrahi onkologlar tedavide kimyasal toksinleri veya radyasyonu kullanırlar. Bunlar pek çok tümör hücresine karşı etkili olmalarına rağmen genellikle tedavi edici değildirler. Çünkü arta kalan tümör hücreleri proliferasyonla nüks geliştirebilirler ve hatta hastayı öldürebilirler ²⁴.

Kanser üzerine yapılan araştırmalar yaklaşık 14. yüzyıldan bu yana devam etmektedir. Söz konusu dönem içinde kanser ilaçlarının araştırılma ve geliştirilme çalışmalarında her zaman deneysel çalışmalara gereksinim duyulmuş ve çeşitli modeller kullanılmıştır ²⁷. Diğer bütün tedaviye yönelik denemelerde olduğu gibi kanser araştırmalarında da deneysel modelleri kullanmak zorunluluğu vardır. Deneysel kanser araştırmalarının yapıldığı yüzlerce yıllık dönemde kimyasal karsinojenler veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır ³¹.

Mutajenezde kritik faktör hücre bölünmesi olduğu gibi, hücre proliferasyonu da mutasyon olasılığını arttıran ve hatta bizzat kendisi mutajenezde neden olan faktördür. Bunun nedenleri arasında normalden hızlı replike olan hücrelerin DNA onarımı yapamaması; S fazındaki hücrelerin DNA hasarı yapıcı etkenlere daha duyarlı olması; hücre bölünmesinin mitotik rekombinasyonları ve gen dönüşümleri tetikleyip kromozomal değişikliklere neden olması; gen duplikasyonlara neden olup onkogen ekspresyonunu arttırması; özellikle sitotoksik ajanlara bağlı hücre proliferasyonunda fazla miktarda serbest oksijen radikallerinin oluşması ve bunların DNA hasarı yapması sayılabilir. Böylece, hücre bölünmesindeki artış her tür genetik hata riskini arttırmaktadır ^{25,28,29}.

Kemopreventif ajanlar, önleyiciler ve baskılayıcılar olarak iki ayrı grupta sınıflandırılırlar. Önleyici ajanlar karsinogenezin başlangıç evresini önlerler. Baskılayıcı kemopreventifler ise daha ileri basamaklara

etkileyerek hücre proliferasyonunu engeller. Pek çok kemopreventif madde her iki tip aktivitede de rol almaktadır ²⁷.

Önleyici ajanlar reaktif oksijen ürünlerinin çöpçülüğü ve ilaç metabolizma yollarının aktivasyonu ile kemopreventif etkilerini göstermektedirler. Tümör oluşumunu baskılayıcı kemopreventifler ise sinyal ileti yollarının modülasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, apoptoz veya hücre siklus aresti mekanizmalarıyla etki etmektedirler ²⁷.

2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Orbitali doldurup stabil hale gelmek için başka elektrona ihtiyaç duyduğundan ortaklanmamış elektronlar serbest radikalleri oldukça reaktif hale getirir ³². Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir ³³.

Tablo 1. Reaktif oksijen partikülleri ³⁵.

<u>Radikaller</u>	<u>Radikal olmayanlar</u>
Süperoksid anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) Hidroksil ($HO\cdot$) Peroksil ($ROO\cdot$) Alkoksil ($RO\cdot$) Nitrik oksit ($NO\cdot$) Semikinon radikali ($HQ\cdot$) Hemoproteine bağlı serbest radikaller Organik radikaller ($R\cdot$) Organik peroksid radikali ($RCOO\cdot$)	Hidrojen peroksid (H_2O_2) Singlet oksijen (*O_2) Ozon (O_3) Hipokloröz asit ($HOCl$) Lipit hidroperoksid ($LOOH$) Peroksinitrit ($ONOO\cdot$) Azot dioksit (NO_2) N-halojenli aminler ($R-NH-X$) Hipohalöz asid (HOX)

Bilindiği gibi, oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3' ü tam olarak suya dönüşmez, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur ³⁴.

Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşur :

- 1- Normal bir molekülün kovalent bir bağının her kısmında bir ortaklanmamış bir elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması
- 2- Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi
- 3- Normal bir moleküle tek bir elektron ilavesi

Serbest radikaller pozitif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Elektron transferi ile radikal oluşumu: $A + e^- \longrightarrow A^-$

Homolitik füzyonla radikal oluşumu: $X : Y \longrightarrow X^\cdot + Y^\cdot$

Heterolitik füzyonla radikal oluşumu: $X : Y \longrightarrow X^- + Y^+$

Biyolojik sistemlerde elektron transferi ile radikal oluşumu homolitik füzyondan daha yaygındır. Homolitik füzyon; yüksek sıcaklık, ultraviyole ışığı veya iyonize radyasyondan elde edilecek enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Heterolitik füzyonda ise serbest radikaller oluşmamakta ve ürün olarak sadece yüklü gruplar meydana gelmektedir ³⁶.

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasında denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden bir çok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır ³⁷.

2.2.1. Serbest Radikal Oluşumunu Artıran Faktörler

A. Eksojen Faktörler

1. Diyetel faktörler : Çok doymamış yağ asitlerince beslenme, alkol, fazla kalorili beslenme (obesite), hayvansal proteinlerce zengin beslenme, az sebze ve meyve yenmesi, yiyeceklerin uygun olmayan ortam ve koşullarda hazırlanması.
2. Çevresel faktörler : Sigara dumanı, hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂, Hidrokarbonlar), radyasyon diğer kirleticiler (asbest, pestisitler, vs.)
3. İlaçlar : Antikanser ilaçlar, glutatyon tüketen ilaçlar.

B. Endojen Faktörler

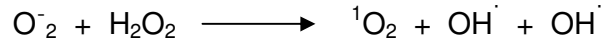
1. Fiziksel egzersiz / sedanter yaşam
2. Stres
3. Yaşlılık
4. Doku hasarı ve kronik hastalıklar (Ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi)
5. Diyetel antioksidan alımını etkileyen koşullar (iştahsızlık, malabsorbsiyon, kolestaz)³³.

2.2.2. Süperoksid Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

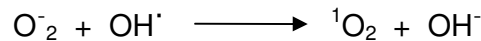
Zayıf reaktif bir serbest radikal olan süperoksid anyonu moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Süperoksid oluşumu özellikle mitokondri iç zarındaki solunum zincirinde elektrondan zengin aerobik ortamda spontan olarak meydana gelir. Süperoksid radikali ksantin oksidaz ve bir grup flovoenzimler tarafından oluşturulmaktadır. Diğer süperoksit üreten enzimler lipooksijenaz ve siklooksijenazdır. Fagositik hücrelerin NADPH bağımlı oksidaz enzim kompleksi fazla miktarda süperoksit radikali oluşturmaktadır. İki molekül süperoksit molekülü süperoksid dismutaz (SOD) tarafından hızla hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür³⁸.

Ortamda biriken süperoksid radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir³⁹:

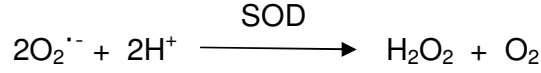
1. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali ($HO_2^{\cdot}$) oluşturabilir.
2. H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijen (1O_2) oluşturabilir.



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



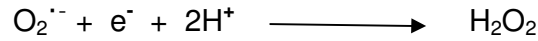
Serbest radikallere karşı organizmanın uzun süreli korumasız kalması bu maddelerin düşük konsantrasyonlarının bile biyolojik açıdan önemli moleküllerin tahribatı ile sonuçlanır ve sonuçta DNA' da mutasyona, doku tahribatına ve hastalıklara yol açar.



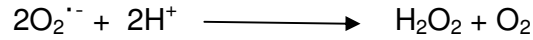
2.2.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit iki yol ile oluşur.

1. Oksijenin iki elektronla indirgenmesi sonucu H_2O_2 ortaya çıkar.

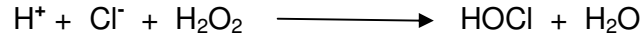


2. Biyolojik sistemlerde sıklıkla görülen süperoksidin üretimi yoluyla oluşmaktadır ve böylece iki süperoksid anyon radikali birbiriyle, hidrojen peroksit ve oksijeni verecek şekilde reaksiyona girerler ⁴⁰.



Süperoksit radikallerinin temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir. Bu reaksiyon SOD tarafından veya spontan olarak oluşabilir.

H_2O_2 bir serbest radikal değildir, fakat biyolojik membranlara kolaylıkla girebilmesinden dolayı oldukça önemlidir. Nötrofil fagozomlarında bulunan myeloperoksidaz enzimiyle çok reaktif serbest oksijen radikali olan HOCl oluşumuna sebep olur.

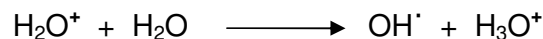


H_2O_2 geçiş metallrinin varlığında en önemli serbest oksijen radikali (ROS) olan $OH^{\cdot}$ radikalinin oluşumunu sağlar. H_2O_2 'nin diğer önemli bir görevinde intraselüler signal molekülü olarak rol almasıdır. H_2O_2 oluşuktan sonra katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler adında üç enzim sistemi tarafından uzaklaştırılır ³⁸.

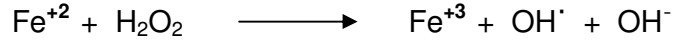
2.2.4. Hidroksil Radikali ($^{\cdot}OH$)

($^{\cdot}OH$) biyolojik sistemlere diğer ROS'lerden daha fazla hasar veren, biyomoleküllerle reaksiyona girebilen güçlü bir radikaldir ³⁸. Oluşması için ortamda geçiş metalleri gereklidir. 3 yolla oluşabilir.

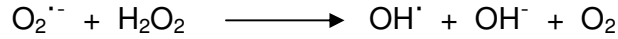
1. Radyasyon-Su



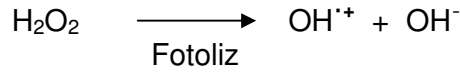
2. Fe – katalizli - Haber Weiss reaksiyonu (Fenton Reaksiyonu)



Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonunda ise, süperoksidin direk olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesidir.



3. Hidrojen peroksidin fotolizi ile,



$\text{OH}^\cdot$ radikali canlı hücrelerde bulunan bütün moleküllerle reaksiyona girebilmektedir ³⁶. Lipit peroksidasyonunu başlatabilir, DNA iplikçiklerinde kırılmalara neden olabilir ve hemen her organik molekülü, ayırım yapmadan okside edebilir ⁴⁰.

2.2.5. Singlet Oksijen

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronlarını değiştirerek aynı veya farklı orbitale yerleşebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen denir. Reaktif olmayan ancak reaktif oksijen radikallerinden biri olan singlet oksijenin sigma ve delta diye iki tipi vardır ⁴¹. Sigma formu çok enerjik olduğundan yarı ömrü kısadır, hızlıca bozunarak delta formuna dönüşür ⁴².

Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi invivo olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz reaksiyonlarıyla da oluşabilmektedir. Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2-5-difenilfuran, 1,4-diazbisikloalefan, singlet oksijeni temizlerler ⁴¹.

Singlet oksijen, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve sterollerini kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur ⁴².

2.2.6. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

- a) DNA' nın tahrip olması,
- b) Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
- c) Lipit peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- d) Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
- e) Protein ve lipitlerle kovalan bağlantılar yapması,
- f) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- g) Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi
- h) Proteinlerin tahrip olması ve protein “turnover” nin artması
- i) Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi
- j) Kollogen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması
- k) Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir ³³.

2.2.6.1. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri

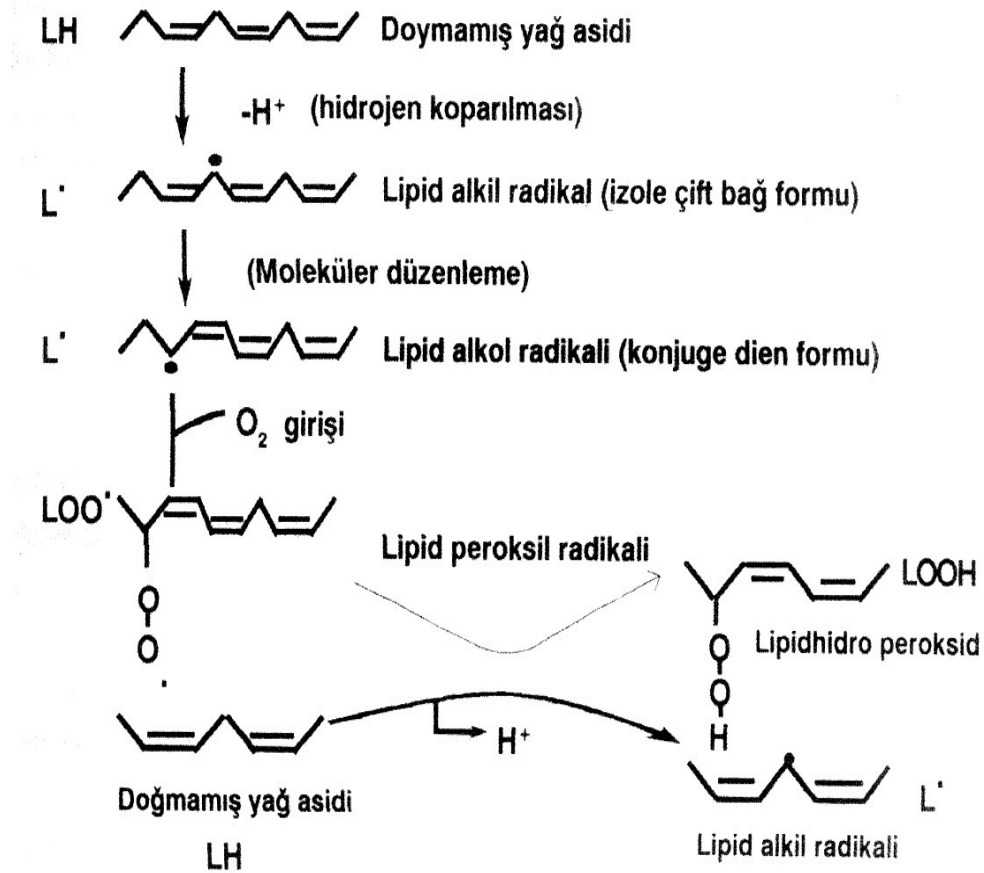
Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum), membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı dolayısıyla oksidatif ataklara duyarlıdırlar ⁴³. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar ⁴⁴. Biyolojik sistemlerde bu serbest radikalın süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipit peroksidasyonunda asıl etkili radikalin ($OH^\cdot$) olduğu benimsenmektedir.

Yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Oluşan lipit radikali (L) dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğramaktadır.

Öncelikle, molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra lipit radikalın oksijen ile reaksiyonlaşması ile lipit peroksit radikali ($\text{LOO}^\bullet$) meydana gelir. Bu radikalde zardaki poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta ve kendileride açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşmektedir. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder ^{33,44}.

Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipit peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Peroksidasyon sırasında oluşan dien konjugatlarının ölçümü de, in vivo lipit peroksitlerinin düzeyini yansıtmaları açısından giderek önem kazanmaktadır. Lipit hidroperoksitlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de, son yıllarda lipit peroksidasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir ⁴⁵.



Şekil 1. Lipit peroksidasyonu

Organizmadaki etkileri;

a) Lipit peroksidasyonu sonucu membran akışkanlığı azalır ve normalde hücre içine geçemeyen maddelerin hücre içine girişleri artar.

b) Lipit peroksitler ve alkoksil radikaller, triptofan ve sistein gibi protein kısımlarına ataklar yaparak protein yapısını bozar ve hasar meydana getirirler.

c) Lipit peroksidasyonu sırasında aktiviteleri için sülfidril ve amino grubuna gereksinim duyan, özellikle hormonal uyarılara hücrenin cevap verme imkanı sağlayan yüzey reseptörlerini inhibe ederler (G6P-az ve Na-K ATP-az gibi)

d) Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri de lipit peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA' nın replikasyonu yapılamaz.

e) Bazı aldehitler biyolojik sıvılarda kemotaktik etki gösterirler.

f) MDA gibi aldehitler, LDL' yi modifiye ederek metabolik yolu değiştirebilirler ⁴³.

2.2.6.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller bazı aminoasitlerle reaksiyona girerek enzimlerin aktivitelerini ortadan kaldırarak modifiye, fonksiyon görmeyen proteinlerin oluşmasına sebep olmaktadır. En çok sorumlu tutulan aminoasitler sülfür içerenlerdir ³⁸. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi halkalı amino asidler oksidasyonu en fazla maruz kalmaktadırlar. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonlar bozulmaktadır. Protein yapısındaki hasarın gösterilmesi için, protein karbonillerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir göstergedir ⁴⁴.

2.2.6.2.1. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu

Protein oksidasyonunun yeni bir belirtici olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır ⁴⁶.

AOPP düzeyleri, protein oksidasyonunun göstergesi olan ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile kolerasyon gösterdiği fakat lipit peroksidasyon belirteçleri ile kolerasyon göstermediği belirtilmiştir ⁴⁷.

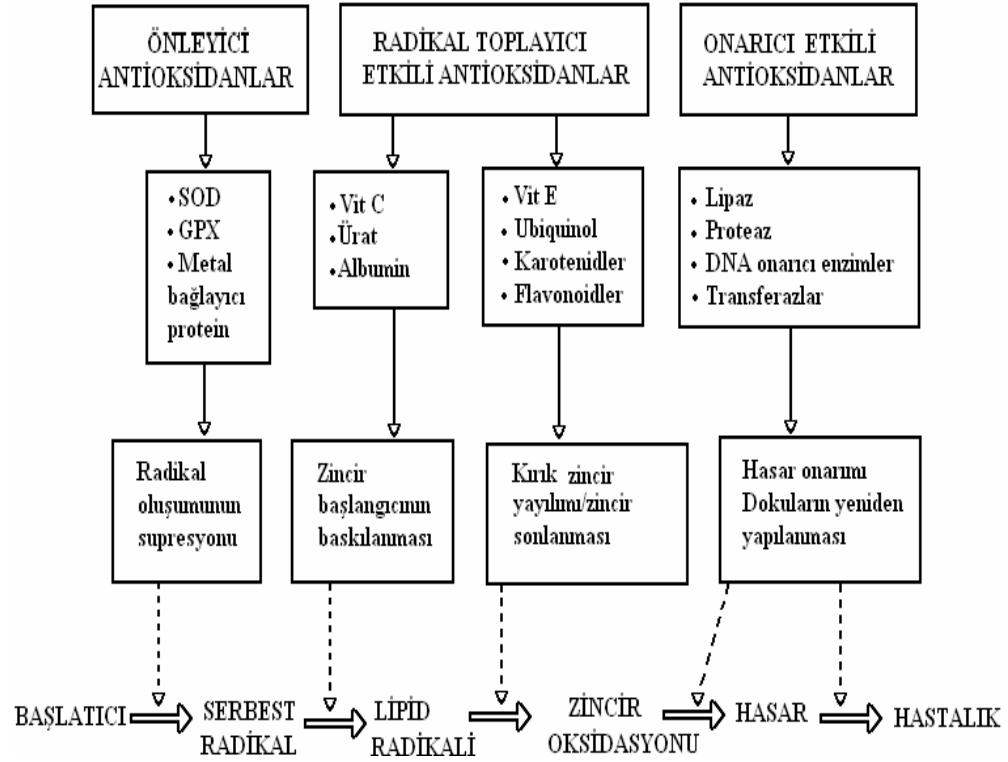
Bununla birlikte protein-protein çapraz bağlanmaları proteinlerin oksidatif değişiminin bir belirteci olmakla birlikte birkaç farklı reaksiyonla gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlar; (a) karbon merkezli iki radikalin direkt reaksiyonu sonucu, (b) iki tirozin radikali arasında etkileşim sonucu, (c) iki sistein-tiil radikalinin reaksiyonu sonucu, (d) karbonil grubu içeren proteinlerin aynı veya farklı protein yan zincirindeki lizin bakiyeleri ile reaksiyonu sonucu, (e) reaktif aldehytlerin aynı veya farklı protein moleküllerinin lizin bakiyeleri arasındaki reaksiyon sonrası, (f) glikasyon/glioksidasyon reaksiyonları sonucu karbonil grubuna sahip proteinlerin aynı veya farklı proteinlerin lizin veya arjinin bakiyeleri ile reaksiyonu sonrası, (g) Michael reaksiyonu ile lipit peroksidasyon belirteçlerinin, proteinlere eklenmesi sonucu oluşan protein aldehytlerin, aynı veya farklı proteinlerdeki lizin bakiyeleri ile reaksiyonu olarak sıralanabilir ⁴⁸.

2.2.6.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikaller DNA' nın kimyasal modifikasyonu ile mutagenik etkilerini göstermektedir. Özellikle OH^{*} radikali, serbest radikallerin sebep olduğu bir takım değişimlere (DNA ayrılması, DNA-protein çapraz bağlanımı, pürinlerin oksidasyonu gibi) sebep olmaktadır. DNA onarım sistemi hemen DNA' yı rejenere etmezse replikasyon sırasındaki yanlış baz çifti mutasyonla sonuçlanacaktır. Bu mekanizma oksidatif strese maruz kalmış kişilerdeki artmış kanser prevelansını açıklamaktadır. Serbest radikal vasıtasıyla oluşan apoptozis bazı vakalarda serbest radikale bağlı DNA hasarının bir parçasıdır ³⁸.

2.3. Antioksidanlar

Vücutta serbest radikaller meydana geldiğinde organizmayı oksidatif stresden korumak için antioksidan sistem devreye girer. Birinci defans hattını, peroksidaz ve metal bağlayan proteinlerin süpresyonu ile serbest radikallerin meydana gelmesini önleyen antioksidanlar oluşturur. İkinci defans hattını, vitamin C ve vitamin E gibi radikal temizleyici antioksidanların zincir oksidasyonunun başlamasını inhibe etmesi ve zincirleme reaksiyonların yayılımını önlemesi oluşturmaktadır. Üçüncü olarak hasarı onarma ve eski haline getirmeye çalışan onarıcı ve yeniden yapılandırıcı enzimler (lipazlar, proteazlar, DNA onarıcı enzimler ve transferazlar gibi) defansta rol alırlar ³².



Şekil 2. Antioksidan gruplar ve görevleri ³².

2.3.1. Antioksidan Enzimlerin Sınıflandırılması

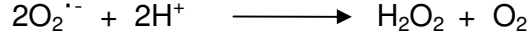
Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplandırılabilirler ³⁷:

1. Yapılarına göre
 - a. Enzim karakterli antioksidanlar
 - b. Enzim karakterli olmayan, küçük moleküller
2. Kaynaklarına göre
 - a. Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
 - b. Dışardan alınanlar (eksojen antioksidanlar)
3. Çözünürlüklerine göre
 - a. Suda çözünenler
 - b. Lipitlerle çözünenler
4. Yerleşimlerine göre
 - a. Hücre içinde bulunanlar
 - b. Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar

2.3.2. Enzim Karakterli Antioksidanlar

2.3.2.1. Süperoksid Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1.)

Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan SOD, süperoksidin H₂O₂ dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir ³⁵.



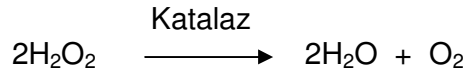
SOD' ın diğer bir görevi de serbest radikalleri inaktive ederek dehidratazları korumasıdır.

Dört çeşit SOD tanımlanmıştır.

1. Mangan içeren dismutaz (Mn SOD): Homotetramer yapıdadır. Mitokondrideki solunum zinciri ve oksijen radikalının major kaynağıdır. Mn-SOD süperoksit radikalini uzaklaştıran primer antioksidan enzimdir. Fe-SOD ile homologtur.
2. Bakır ve çinko içeren dismutaz (Cu/Zn SOD): 32 kDa ağırlığında dimerik yapıdadır. Sitoplazmada bulunur.
3. Ekstrasellüler dismutaz (EC-SOD): İntertisyel alanda ve plazma, lenf ve sinovial sıvılarda bulunan tetramerik yapıda bakır ve çinko içeren bir enzimdir.
4. Nikel içeren dismutaz (Ni-SOD): Streptomyces sp ve Streptomyces coelicolor' un sitozolik fraksiyonundan saflaştırılmıştır. Aminoasit kompozisyonu diğer SOD' lardan farklıdır. Siyanid ile inhibe olmaktadır ⁴⁹.

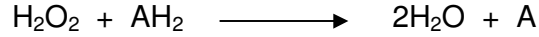
2.3.2.2. Katalaz (EC, 1.11.1.6.)

Katalaz 60 kDa ağırlığında 4 aynı yapıda tetrahedral subunitler içeren hem-enzimdir. 240 kDa molekül ağırlığında her molekülde 4 adet ferriprotoporfirin içerir. Katalaz, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler ⁴⁹.

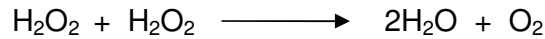


Katalaz, peroksizomlarda yerleşmiş olup kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır.

Katalaz düşük hızlarda hidrojen peroksitin oluştuğu durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğunda peroksidatif tepkime ile,

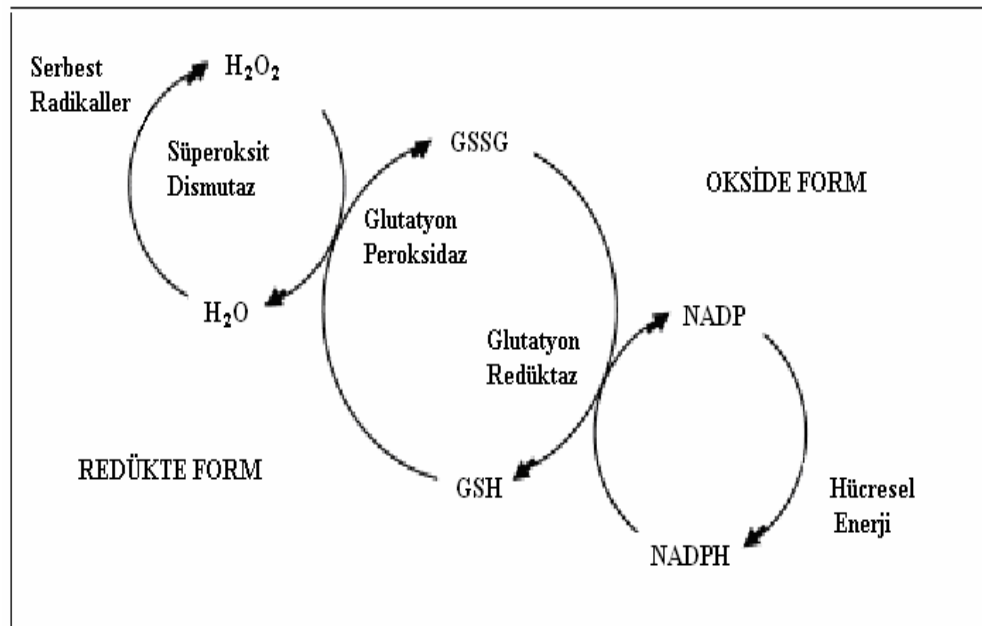


Hidrojen peroksid oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır³⁵.



2.3.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9.) ve Glutasyon Redüktaz

Glutasyon peroksidaz, glutasyon tarafından hidroperoksitlerin (ROOH ve H_2O_2) indirgenmesini sağlayarak, memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan selenyum içeren bir enzimdir⁴⁹. Glutasyon peroksidaz enziminin selenyuma bağlı ve bağımsız 2 izomeri mevcuttur. Selenyuma bağlı izoenzimi selenosistein formunda bulunmaktadır. Bu enzim hem hidrojen peroksiti hem de organik peroksitleri (örneğin, kümen hidroperoksit) kullanabilir. Selenyumdan bağımsız GSH-Px ise, hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olup, yalnızca lipit hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir⁵⁰.



Şekil 3. Glutasyon döngüsü.

H₂O₂, suya indirgenirken glutatyon (GSH), glutatyon disülfide (GSSG) yükseltgenir. Antioksidan defans sistemini normal işleyişi sırasında indirgenmiş GSH, hidrojen peroksidi GSH-Px ile detoksifiye eder. Ayrıca Glutatyon redüktazda, hidrojen peroksiti GSH' a dönüştürerek hidrojen peroksitin detoksifikasyonuna katkıda bulunmasından dolayı önemlidir. Glutatyon redüktaz oksitlenmiş NADPH' ın elektronunu kullanarak GSSG' yi GSH' ye çevirir. H₂O₂' nin detoksifikasyonunun devamı için NADPH' ın sağlanması gereklidir ⁵¹.

2.3.3. Enzimatik olmayan Antioksidanlar

2.3.3.1. Antioksidan Vitaminler

Yağda çözünen vitaminler içersinde önemli yere sahip vitamin E, özellikle membran ve lipoproteinlerin bileşenleri üzerinde zincir-kırıcı antioksidan etkiye sahiptir. α-Tokoferol vitamin E türevleri içersinde en aktif bileşik olup, zincir reaksiyonları ile ilişkili peroksil radikalini temizleyerek lipit peroksidasyonunu engeller ⁵².

Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka bu moleküle antioksidan özellik kazandırır ⁵³. Bununla birlikte α-Tokoferol singlet oksijen, alkoksil radikali, peroksinitrit, nitrojen dioksit, ozon ve süperoksit radikalleri ile de tepkimeye girer ⁵⁴. Lipit radikalleri ile tepkimesi sonucu oluşan αT[•] radikalinin, peroksil radikale göre membranların yağ asidi zincirlerine karşı reaktivitesi çok düşük olup, askorbik asit başta olmak üzere diğer molekül veya mekanizmalar tarafından α-tokoferol'e dönüştürülür.

Askorbik asit veya vitamin C glikoz metabolizmasından gelen, suda çözünen vitaminler grubundandır. Prolin, lizin ve dopamin β-hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olup, bu amino asitlerin hidroksilasyonunda ve kollojen fibrillerin sentezinde gereklidir. Askorbik asit' in (Vitamin C) bir elektron oksidasyonu sonucu monodehidro askorbil radikali oluşurken, reaksiyona girdiği radikali de etkisiz hale getirerek serbest radikallerin organizmaya verdiği zararı engeller. Askorbik asidin radikalik formu ise glutatyon sistemi tarafından askorbik aside yeniden dönüştürülür ⁵⁵.

2.3.3.2. Karotenoidler

Karotenoidler (β-karoten, Likopen, Zeaksantin, Lutein, Violaksantin), genelde sarı ve turuncu renkli bileşikler olup bazı bakteriler ve alglerde, çoğu zaman ise bitkilerde bulunan pigmentlerdir. İnsan ve hayvanlar karotenoid biyosentezini gerçekleştiremedikleri için bu bileşikleri diyetle alırlar. Karotenoidler organizmada, triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama, singlet oksijeni baskılama ve bazı oksijen radikallerini

temizleme gibi koruyucu etkilere sahiptir. Bununla birlikte karotenoidler, lipit membranlara lokalize olarak membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltır ⁵⁶.

2.3.3.3. Glutasyon (GSH)

Glutasyon, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olup antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Organizmada temel olarak; peroksidaz aracılı peroksitlerin katabolize edilmesi, hücresel tiyol ve redoks potansiyelinin düzenlenmesi, bir nörotransmitter veya immünofarmakolojik tiyol görevi üstlenerek endokrin ve immün sistem arasındaki interaksyonu sağlaması, redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak strese cevabın aktivasyonu gibi görevler üstlenir ⁵⁷⁻⁵⁹.

2.3.3.4. Ürik asit (Ürat)

Ürik asit, Ksantin oksidazın oksipürünleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi ile oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metabolojisinin son ürünüdür. Ürat, fizyolojik koşullarda singlet oksijen, hipoklorit ve hidroksil radikali gibi reaktif bileşikler baskılar fakat süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girmez, peroksit kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı korur, bu da ürik asidin antioksidan etkilerinin olduğunun göstergesidir ⁶⁰.

2.3.3.5. Bilirubin

Hem katabolizmasının son ürünü olan bilirubin aynı zamanda singlet oksijen, peroksinitrit ve hipokloröz asit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini, baskılarken bununla birlikte peroksil radikallerine karşı hidrojen donörü olarak davranarak lipit peroksidasyonunun zincir devam ettirici radikalini de etkisiz hale getirir. Bu arada biliverdin ise bilirubine göre daha etkili biçimde peroksil radikallerini baskılar ⁶¹.

2.3.3.6. Melatonin

Pineal bezde triptofandan sentezlenir. Görevi tam olarak bilinmese de sirkadiyen ritmi düzenlediği bilinmektedir. Bununla birlikte hidroksil radikali, hidrojen peroksit, peroksil radikali, singlet oksijen, nitrik oksit ve peroksinitrit anyonu gibi reaktif türlerin temizlenmesinde veya baskılanmasında etkilidir. Melatonin reseptöründen bağımsız olarak membran lipitlerini, stozol proteinlerini, çekirdek ve mitokondride nükleik asitleri serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korur ⁶².

2.3.3.7. Stobadin (STB)

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu önlemek veya zararlı etkilerini azaltabilmek için, farklı etki mekanizmalarına sahip antioksidanlar veya diğer kimyasal moleküller sürekli olarak geliştirilmektedir. Bunlar arasında heterosiklik indol türevlerinden bir pridoinol olan stobadin üzerinde halen günümüzde de devam etmekte olan birçok çalışma yapılmıştır. Pridoinol türevi stobadin'in klinik, toksikolojik, farmokodinamik özellikleri ve kimyasal yapısı belirlenmiştir ⁶³.

2.4. Total Antioksidan Durum

Antioksidan kapasite biyolojik sistemlerdeki 4 genel antioksidan kaynağı açıkça ortaya koymaktadır.

1. Enzimler: (örneğin, SOD, GPx ve katalaz)
2. Büyük moleküller: (albumin, seruloplazmin, ferritin ve diğer proteinler)
3. Küçük moleküller: (askorbik asit, glutatyon, ürk asit, tokoferol, karotenoidler, polifenoller)
4. Bazı hormonlar: (östrojen, anjiotensin, melatonin vs.) ⁶⁴.

Antioksidan kapasite (AC) ölçümü plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların kümülatif etkisini yansıtmaktadır. Böylece ölçülebilen antioksidanların ayrı ayrı toplamından daha bütün bir değerdir. Bilinen ve bilinmeyen antioksidan kapasiteyi ve sinerjik etkileşimi ölçtüğünden dolayı invivo oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki hassas dengeyi kavramayı sağlar. Plazma AC ölçümü insanlarda fizyolojik, çevresel ve beslenme faktörlerinin redoks durumunu değerlendirmeye yardım eder. Plazma AC' nin tespiti invivo oksidatif durumun değiştiği durumları ayırtetmeye yarar (ROS' a maruz kalma ve antioksidan alımı). Bitkisel antioksidan alımı veya antioksidandan zengin yiyeceklerin alımından sonra plazma AC' deki değişiklikler besinsel bileşimlerin biyoyararlanımı ve absorpsiyonu hakkında bilgi sağlayabilir. Hücrelerin AC' si başlıca enzim sistemini yansıtırken plazma ise dietsel orjinli küçük molekül ağırlıklı antioksidanları yansıtır. Plazma AC hem radikal fazla yüklenimini hem de dietsel antioksidan alımını düzenler ve tek seçilmiş antioksidan konsantrasyonuna göre invivo oksidasyon ürünleri ve antioksidanlar arasındaki dengeyi daha fazla temsil ettiği kabul edilmektedir ⁶⁵.

Geleneksel antioksidan kapasite ölçümleri primer olarak plazmadaki aköz kompartmanın antioksidan kapasitesini ölçmektedir. Bu

nedenle başlıca askorbik asit, ürik asit ve protein tiolleri gibi suda çözünen antioksidanlar bu ölçümü etkilemektedir. Fakat tokoferol ve karotenoidler gibi yağda çözünen antioksidanlar küçük bir role sahiptir. Ancak plazmanın hidrofilik ve lipofilik kompartmanlarında lokalize olmuş antioksidanlar arasında etkileşim vardır. Lipit kompartmanının sebep olduğu radikalleri ve proteinin etkilerinin maskelenmesini önlemek için lipit peroksidasyonunu izlemek ve lipolik antioksidanlar ile aktif olarak etkileşen yağda çözünen antioksidanlara ek olarak suda çözünen antioksidanları da açığa çıkarmak için yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir ⁶⁶.

2.5. Serbest Oksijen Radikallerinin Kansere İlişkisi

Serbest oksijen radikallerinin (ROS) fazla oluşumu veya antioksidan korunma ve onarım mekanizmalarının yetersizliği sonucunda oksidatif stres gelişebilir. Bunu geriye dönüşümlü veya dönüşümlü olmayan hücre hasarı izler. Oksidatif stres DNA' da mutajenik değişikliklere neden olmuşsa hücre malign özellikler kazanır. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada ROS' un gerçekten karsinojen olduğu gösterilmiştir. Kanser başlama ve gelişmesi basit olarak üç evrede incelenmiştir ^{67,68}.

1. Başlama (Initiation)
2. Gelişme (Promotion)
3. İlerleme (Progression)

Serbest radikallerin karsinogenezin her üç evresinde de etkili olduğu ancak ilerleme safhasında daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Başlama evresi tek başına kansere neden olamaz. Promatörler uyarılmış hücreyi stimüle ederek kanser hücrelerine çevirebilirler ve bu etkinin reversibl olduğu düşünülmektedir ⁶⁸.

2.5.1. Oksidatif Stresin Tümör Başlamasındaki Rolü

Oksidatif strese bağlı kanser oluşumunun ilk basamağıdır. OH[•] radikali DNA hasarı yoluyla modifiye pürin ve pirimidin bazları oluşumuna sebep olur. Hergün insanlardaki normal hücrelerdeki her DNA molekülünün 106 bazının oksidatif darbeye maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Serbest radikallerle oluşan endojen DNA hasarı yaşa bağlı kanser oluşumuna neden olmaktadır ³².

DNA modifikasyonları: Oksidatif DNA hasarı kimyasal veya yapısal olabilir. Kimyasal modifikasyondan her zaman yapısal değişikliğe

neden olur. Bunlar DNA baz modifikasyonları ve DNA heliks değişikleri olarak görülebilir ⁶⁸.

DNA baz modifikasyonları: Çeşitli kanser türlerinde ROS artışına bağlı DNA modifikasyonları bulunmuştur. Örneğin OH[•] radikali DNA' nın bütün komponentleri ile deoksiriboz iskeleti, pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girebilir. Adenin ve guanine etkisi sonucu halkada açılma, replikasyonda blok oluşması ve sonuç olarak nokta mutasyonuna yol açar ³².

DNA' da en sık rastlanan oksidatif baz modifikasyonu 8-hidroksi-2'deoksiguanozin (8-OHdG) dir. Oksidatif stres için güvenilir bir belirteç olduğu düşünölmektedir. Serbest radikallerle oluşan DNA hasar ürünlerinden 5-hidroksimetilurasil, 8-OHdG ve DNA oksidasyon ürünleri çeşitli çalışmalarda ölçölmüştür ³².

Hücre bölünmesini bloke eden p53 tümör supresör genindeki mutasyon, kanser gelişiminde önemli bir faktördür. P53 geni inaktive olduğunda hücre siklusuna hasarlı DNA ile girer ³². Bunun sonucunda ROS ilgili nokta mutasyonları sonucu onkogenlerin aktivasyonu ile karsinogenezdeki ilk adım başlar. Bunlar aynı zamanda son safha olan ilerleme döneminde de etkilidirler.

DNA heliks değişiklikleri: DNA heliksindeki değişiklikler heliksin kıvrılması, tek veya çift iplik kırılması, iplikler arası çapraz bağlar ve kromozomal değişiklikler sayılabilir ⁶⁹. Tek veya çift iplik kırılması serbest radikal etkisiyle oluşabildiği gibi ROS ile ilgili enzimatik DNA bölünmesinin uyarısı ile de olabilir ⁶⁸.

2.5.2. Oksidatif Stresin Tümör Gelişmesindeki Rolü

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu mutasyon, kanserin başlama ve ilerlemesine neden olduğu gibi, oksidatif stres mutant hücre klonlarının yayılmasına ve proliferasyonuna ve hücre ölümine de neden olur. Son çalışmalar, ROS' nin benign tümörleri malign tümörleri dönüştürürken kanserin evresini de ilerlettiğini göstermiştir ⁷⁰.

Ca²⁺ aracılığı ile tümör gelişmesi (Promotion): Kalsiyum homeostazının serbest radikaller tarafından bozulması da karsinogeneziste önemli rol oynar. Hücre zarının normal yapısının serbest radikal etkisi sonucu bozulması hücre içi kalsiyum miktarının artmasına sebep olur ⁴⁴.

Oksidanlar Ca²⁺ bağlı epigenetik yolu uyarırlar. Bunu polipeptid büyüme faktörlerini ve hormonları kullanarak hücre replikasyonunu uyarmakla sağlarlar. Protoonkogenlerin aktivasyonu olur,

örneğin protoonkogen C-FOS' un düşük doz ROS ile indüksiyonunun sitolitik Ca^{2+} aracılığı ile geliştiği gösterilmiştir ⁷¹. Kalsiyum-kalmodulin etkileşimi birçok protein kinaz enzimini aktive eder. Protein kinazlar da S6 kinazı aktive ederler. Hem protein kinaz hem de S6 kinazlar çeşitli fosforilasyon yollarıyla transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini regüle ederler ve bu şekilde ROS' nin hücre proliferasyonuna olan etkilerinin başlatmasına aracı olurlar ^{44,68}.

Tümör gelişmesinde diğer mekanizmalar:

Çok sayıda genin aktivitesi redoks reaksiyonları ile kontrol edilir. Serbest radikaller de redoks reaksiyonlarını başlattıklarından dolayı oksidatif stres, bazı genlerin aktifleşmesine sebep olur. Böylece serbest radikaller onkogenleri aktive ederek hücre çoğalmasını artırırlar. Nitekim hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol alan transkripsiyon faktörlerini kodlayan c-fos, c-myc, c-jun ve b-aktin genleri ile bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B geni serbest radikaller tarafından aktifleştirilirler ⁴⁴.

Oksidanların kanser oluşturma özelliği hücre replikasyonunu ve DNA sentezini artırabilme yeteneklerine bağlı gibi görülmektedir. Oksidatif strese bağlı tümorogenezin gelişmesinin hücrenin antioksidan kapasitesinin artırılmasıyla durdurabileceği ileri sürülmektedir ⁷².

2.5.3. Oksidatif Stresin Tümör İlerlemesindeki Rolü

Tümör hücrelerinde ROS oluşumunun artması, oksidatif stresin kalıcı ve devamlı olmasını sağlayarak genomik stabil olmayan durumu artırır ⁷². ROS ile genomik instabilitede sonucu oluşan TP-53 genindeki mutasyon insan kanserlerinde en sık rastlanandır. P53' ün esas fonksiyonu karsinogenezde ROS' a karşı koruyucu olmasıdır. P53 proteini onkogen ürünlerini bağlayarak bazı tümörlerin oluşumunu geciktirebilir ⁷³. Oksidatif stres, yüksek invaziv ve metastatik kanser hücrelerinin proliferasyon ve apoptozisinin devamını sağlar. Bu hücreler, kanser hücrelerinin devamlılığında sinyal molekülü olan hidrojen peroksidin büyük miktarlarda oluşumunu sağlar. Antioksidanlar, hidrojen peroksid sinyal molekülünü ve kanser hücre proliferasyonunu suprese ederler ⁷⁴.

2.6. Böbrek Dokusu ve Serbest Radikaller

Böbrekler aerobik metabolizmanın belirgin bir şekilde görüldüğü, canlılar için önemli bir organdır. Vücut sıvı elektrolit dengesini muhafaza etmek için, böbrekler total vücut ağırlığının %1' ini oluşturmasına rağmen, bütün vücut oksijen tüketiminin %10' undan sorumludur ^{75,76}. Kardiak outputun %20' sine de maruz kalan süzme organı böbrekler, bu özelliklerinden dolayı dolaşımdaki polimorfonükleer

lökositlerin (PMN) ve monositlerin glomerüllere ve intersisyal dokuya infiltrasyonu sonucunda ek bir oksidan strese maruz kalırlar^{76,77,78,79}.

Böbrekler, yüksek O₂ tüketimi ve metabolik aktiviteye ek olarak, infiltratif hücreler ve kendi yerleşik hücrelerinden de reaktif O₂ türleri oluşması nedeniyle zaman zaman, kendi total antioksidan korunma mekanizmasını aşan oksidan stresle karşılaşmakta ve böbreklerde reaktif O₂ türlerine bağlı doku hasarları oluşmaktadır^{76,77,78,80,81}.

Reaktif oksijen türlerinin iskemik, toksik, immunolojik kaynaklı böbrek harabiyetinde rol oynadığı bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir^{76,81}.

Deneyisel böbrek iskemisinde, elektron transport zinciri, ksantin oksidaz gibi oksidan enzimler, fagositler, epinefrinin oto oksidasyonu ve araşidonik asit metabolitleri, reaktif oksijen türlerinin (ROT) kaynaklarını oluşturmaktadır^{76,77,78,80,82}.

ROT, hücre ve organel membranlarında lipid peroksidasyona neden olarak ve özellikle proksimal tübül segmentlerinde, tübül yapısını, hücre transport kapasitesini ve enerji üretimini bozarak etkilerini gösterirler^{83,84}.

Deneyisel immün glomerülonefritte ROT, PMN ve monositler gibi kan kaynaklı infiltratif hücrelerden oluşurlar ve glomerül hücrelerine ve özellikle mezenşyal hücrelere yerleşirler. Bunların oluşması, morfolojik lezyonların meydana gelmesine, proteazların aktive olmasına, proteoglikan sentezinin düşmesine ve bunlara bağlı olarak proteinlere karşı glomerüler permabilite artışının görülmesine neden olur^{78,85,86}.

ROT' ları prostoglandin, tromboksan, trombosit aktivite edici faktör gibi vazokonstriktör bioaktif lipidleri serbestleştirerek ve vazodilatör olan nitrik oksiti inaktive ederek glomerül kan akımının ve glomerül filtrasyon hızının düşmesini indüklerler^{78,87}.

Proksimal, distal ve toplayıcı segmentlerdeki böbrek tübüler hücrelerinin ROT' ları üretebildikleri bildirilmiştir^{77,78,80,83,84}.

ROT' un böbrek hasarındaki rolü glomerülonefrit, nefrotik sendrom, akut böbrek yetmezliği, transplantasyon, toksik hasar, enfeksiyon, obstrüktif nefropati ve kronik böbrek yetmezliği gibi patolojiler deneyisel modellerle invivo hayvan deneyleriyle gösterilmiştir^{76,80,86} (Tablo 2).

Tablo 2. Reaktif oksijen türlerinin sorumlu tutulduğu böbrek hastalıklarında geliştirilen deneysel modeller ⁷⁶.

<u>İnsan Hastalıkları</u>	<u>Oluşturulan Deneysel Model</u>
Glomerülonefrit	Anti-GBM antikor Pasif Heyman nefriti Katyonize gamma globulin Forbol miristat asetat Kobra venom faktörü
Nefrotik sendrom	Puromisin aminonükleosid Hidrojen peroksit
İskemi-reperfüzyon / akut böbrek yetmezliği	Ototransplantasyon Renal arter bağlanması Hemorajik şok
Kronik böbrek yetmezliği Toksik nefropati	5/6 Nefrektomi Gentamisin, adriamisin, Merkür klorid, sefalosporin Radyokonstrast boya, glyserol, ezme hasarı
Obstrüktif nefropati	Bilateral üretral obstrüksiyon / probukol

2.6.1. Glomerül Hasar

Glomerülonefritin invivo hayvan modellerinde, glomerüler kapillerinde immün kompleks formasyonun ve kompliman aktivasyonunun PMN, monosit ve makrofajları içine alan kemikiliği kaynaklı inflamatuvar hücrelerinin infiltrasyonunu takiben oluştuğu bildirilmiştir. Bu hücreler, glomerüler hemodinamik yapıyı değiştirerek ve proteinüri gelişmesini sağlayarak glomerüler hasarı indüklerler. Bu patolojik gelişmeler ROT ile açıklanmaktadır. Bunlardan radikallerin sorumlu tutulmasının en önemli nedenlerinden biri, doku hasarının olduğu bölgede $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $HO^{\cdot}$ gibi ROT' ların gösterilmesidir ^{77,78,80,85,86,88}.

Yine son yıllardaki bir çok çalışma PMN, monosit ve makrofajların glomerüllerde meydana gelen ROT' un kaynağı olduğunu ortaya koymuştur. Ancak membranöz nefritteki proteinürinin patogenezinin, kan kaynaklı hücrelerin sorumlu olmaması, glomerüllerde glomerül hücrelerinin kendilerinin ROT üretiminde potansiyel kaynak olabileceklerini düşündürmektedir. Bu hipotez kültürü yapılmış glomerül hücrelerinde insan kaynaklı mezenşimal hücrelerin ROT üretmeleriyle kanıtlanmıştır ^{79,85,86}.

2.6.2. Nefrotoksik Hasar

Gentamisin, adriamisin, merkürü kloid radyokontrast madde, sefalosporin, glyserol gibi nefrotoksik ajanlar, serbest radikalleri veya reaktif O₂ moleküllerini uyararak veya kendi antioksidan savunma mekanizmasını baskılayarak böbrek hasarı oluşturlar^{76,82,89}.

Gentamisinin, böbreklerde özellikle mitokondrilerde malondialdehit (MDA) miktarını arttırdığı ve bu etkisinin OH[·] tutucular ve desferoksamin ile geri döndürülebildiği gösterilmiştir. Merkürü klorid, radyokontrast maddeler ve sefalosporinin de lipit peroksidasyonunu arttırdığı bildirilmiştir^{76,82,89}.

2.6.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi-reperfüzyon hasarı böbrek dokusuna spesifik olmasa da iki önemli böbrek hastalığının patogenezinde yer alır⁷⁶. Bunlar;

- a. Akut böbrek yetmezliği,
- b. Böbrek transplantasyonudur.

2.6.3.1. Akut Böbrek Yetmezliği (İskemi-Perfüzyon Hasarı)

İskemik akut böbrek yetmezliği böbreklerde vazokonstriksiyon, glomerüler filtrasyon hızında ani düşme, tübül tıkanıklığı ve glomerüler filtratın tübüllere geri sızmasıyla karakterize kompleks bir sendrom olarak tanımlanır^{90,91}.

Deneyisel invivo hayvan modellerinde, böbrek arterlerinin bağlanmasıyla veya intrarenal norepinefrinin infüzyonuyla, ayrıca izole proksimal tübül segmentlerinde ve epitelyal hücrelerin kültürlerinin de hipoksi ve reoksijenasyona maruz bırakılmasıyla yapılan invitro çalışmalarda, serbest O₂ radikallerinin bu tür lezyonların patogenezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir⁷⁸.

Akut böbrek yetmezliğinin en sık medeni akut tübüler nekrozdur (ATN). ATN morfolojik olarak tübül epitelyal hücrelerinin yıkımı ve klinik olarak böbrek işlevlerinin akut olarak baskılanmasıyla karakterizedir. ATN çeşitli klinik durumlarda ortaya çıkan, geriye dönebilen bir böbrek lezyonudur. Şiddetli travmadan, akut pankreatit ve sepsisemiye kadar değişebilen bu klinik durumlara genellikle belirgin hipotansiyon ve şokun eşlik ettiği periferik organlara yetersiz kan akımı dönemi vardır. Olayı ortaya çıkaran faktörlerin çokluğu nedeniyle ATN sık olarak gelişmektedir. Bundan başka geriye dönebilir olması ayrı bir önem

taşımaktadır, çünkü uygun tedavi tam iyileşme ile kesin ölüm arasındaki fark demektir⁹⁰.

Postiskemik, böbrek hasarı iki basamakta oluşur. Birincisi; akımının bozulması ve yetersiz kan akımı sonucunda ATP' nin azalması yani iskemik dönem, ikincisi ise; iskemiye takiben reoksijenasyon safhası olarak bilinen reperfüzyon dönemidir. Bu bifazik hasarın en önemli göstergeleri, reperfüzyon döneminden önce yapılan histolojik doku çalışmalarında minimal hasar tespit edilmesi ve reperfüzyonun erken döneminde uygulanan tedavilerden ve girişimlerden sonuç alınıp, korunma sağlanmasıdır^{92,93}.

Her ne kadar oluşan bu doku hasarına bakış günümüze kadar genelde iskemi üzerinde yoğunlaşsa da, son çalışmalar değişken oranlarda olmakla birlikte, bu hasarın önemli bir kısmının O₂ metabolitlerince reperfüzyon safhasında oluşturulduğunu ortaya koymuştur⁹⁴.

O₂ radikallerinin kısa ömürlü ve böbrek dokusunun kompleks bir yapıya sahip olmasından dolayı O₂ radikallerini direkt tespit etmek zor olmaktadır⁷⁸. Ancak bir çok çalışmada varlıkları, serbest O₂ kaynaklı lipid peroksidasyonun ölçülmesiyle indirekt olarak gösterilmiştir^{95,96,97,98,99,100}.

Paller ve arkadaşlarının⁹¹ yaptıkları çalışmalar bu konuda yapılan çalışmalara temel oluşturması bakımından büyük önem taşımaktadır. Paller ve arkadaşları^{91,101}, sıçanlarda 60 dakikalık böbrek arteri oklüzyonunu takiben, 15 dakikalık reperfüzyon döneminden sonra, böbreklerde MDA oluşumunu ve lokal olarak oluşan etanın da kanla transportunun sağlanarak akciğerlerden dışarı atıldığını göstermişlerdir.

Proksimal tübül epitelyal hücrelerinin O₂^{•-} radikalini, H₂O₂' i ve OH[•] radikalini normoksemik durumlarda üretebileceği, in vitro çalışmalarda gösterilmiştir ve hipoksi ve reoksijenasyon boyunca bu ürünlerin üretiminin daha da arttığı ve lipid peroksidasyona neden oldukları kanıtlanmıştır⁸⁴.

Tübül epitelyal hücreleri arasında proksimal tübül hücreleri, oksidan hasara karşı distal tübül hücrelerinden daha fazla hassastırlar ve daha fazla etkilenirler. Hücre hasarı ilkin adenin nükleotidlerinin harcanması, ATP seviyelerinin düşmesi ve son olarak da hücre lizisi ile karakterizedir⁸³.

Postiskemik böbrek hasarının, O₂ radikallerinden kaynaklandığını destekleyen görüşler, deneysel çalışmalarda antioksidanların kullanılması ve olumlu sonuçlarının alınmasıyla daha da artmıştır⁸².

İskemiden önce ve reperfüzyon safhasında SOD infüzyonunun glomerül filtrasyon hızındaki düşmeyi önleyerek fonksiyonel, hücresel nekrozisi ve tübül obstrüksiyonunu azaltarak histolojik koruma sağladığı gösterilmiştir ^{82,102}. Bu çalışmalar iskemi-reperfüzyon modelinde $O_2^{\cdot-}$ radikalının önemini göstermesi açısından önemlidir. Birikimi hem SOD enziminin azalmasıyla hem de KO enziminin artmasıyla açıklanabilir ⁷⁸.

$O_2^{\cdot-}$ radikal kaynağı olarak KO enziminin önemli bir faktör olduğu, patent inhibitörleri allopurinol ve tungsten muamelesi ile korunma sağlanarak, $O_2^{\cdot-}$ radikalının oluşumunun inhibe edilmesinin gösterilmesiyle ortaya konmuştur ^{82,91,103,104,105,106}.

2.6.3.2. Böbrek Transplantasyonu

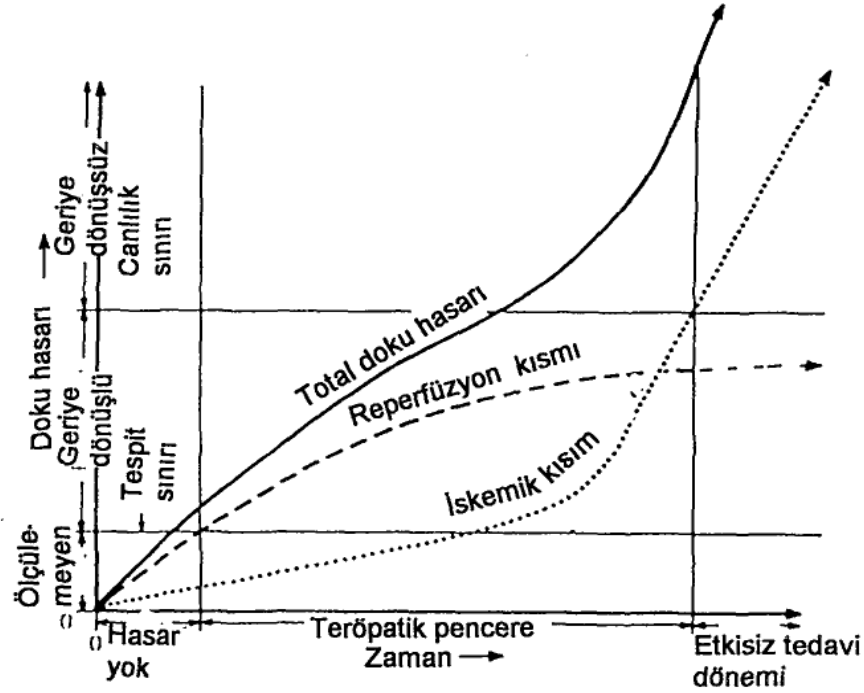
Organ transplantasyonu günümüzde kronik böbrek yetmezliğinin standart tedavisi haline gelmiş ve bu tedavide %80 başarı oranlarına çıkmıştır ⁹⁴.

İmmünolojik faktörler iyi bir şekilde kontrol edildikten sonra tedavide, transplantasyonun kullanılmasındaki en önemli engel, uzun süreli iskemik korunma sonucu bekleyen böbreklerin alıcıya transplante edildikten sonra, iskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasıyla kullanım dışı kalmasıdır ^{94,105}.

İskemi-reperfüzyon hasarından primer olarak O_2 radikallerinin sorumlu tutulması, hayvan modellerinden bir çok organın transplantasyon hasarından korunmasında radikal etkili prensiplerin kullanılabileceğini ortaya koymuştur ^{94,107}.

Deneyssel ve klinik çalışmalar, SOD enziminin ve allopurinolün, kadavrada yapılan böbrek transplantasyonlarında, radikallere etkili olarak önemli derecede kullanılabilir organ sayısını arttırdığını göstermiştir ^{105,107}.

İskemi-reperfüzyon doku hasarında total hasarın bir kısmı iskemik dönemden, bir kısmı reperfüzyon döneminden kaynaklanmakta ve antioksidan tedavinin etkisi doz bağımlı olmaktansa zaman bağımlı olarak kendini göstermektedir. İskemi-reperfüzyon modelinde antioksidan tedavisinin etkili olduğu zaman aralığına teröpatik pencere denmektedir ^{107,108} (Şekil 4).



Şekil 4. İskemi-reperfüzyon hasarının mekanizması ^{94,107,108}.

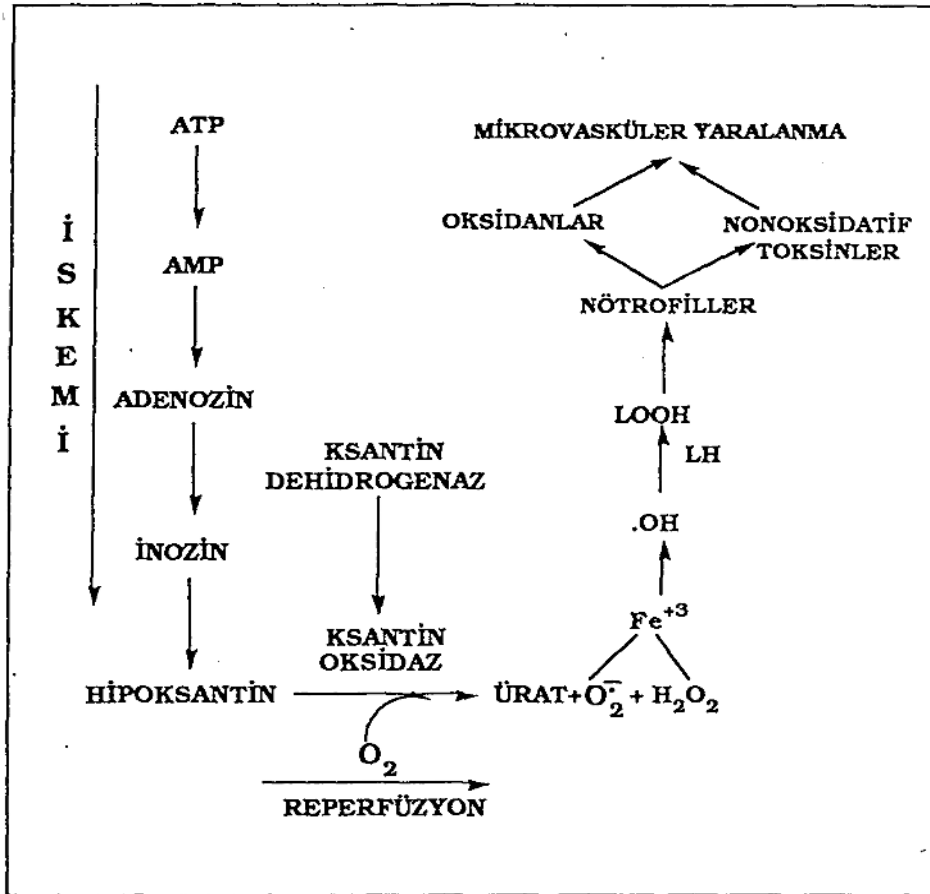
Transplantasyon için bekleyen organlarda hipoperfüzyon sonucu oluşan total hasar, iki ana kısma ayrılır; iskemi hasarı ve O_2 radikallerinin oluşturduğu reperfüzyon hasarı (Şekil 4) her iki komponentte iskeminin başlamasıyla etkisini göstermeye başlar. Başlangıçta iki komponentte ölçülebilecek derecede hasar oluşturamaz. Bu sebepten dolayı bu dönemdeki tedavilerden belirgin bir sonuç alınamaz. İskemi ilerledikçe reperfüzyon, ilkin dominant olarak etki gösterir ve oluşan total hasarın 2/3' ünden sorumlu olur. Bu dönemde uygulanacak tedavi iskemiye takiben belli bir süre sonra başlayan teröpatik pencere döneminde uygulandığında etkili olur. Teröpatik pencere aralığının sınırları içinde yer alan iskemi dönemlerinde de, radikallere etkili tedavi yapılarak gerekli yararlar sağlanabilmektedir. Ancak zaman zaman, iskemi hasarı canlılığı tehdit edecek düzeyde çok fazla olabilmekte ve reperfüzyon hasarını baskılayabilmektedir. Bu durumlarda uygulanacak tedaviden sonuç alınamaz. Bu mekanizmalar Şekil 4' de gösterilmektedir ^{94,107,108}.

Organların iskemiye toleransları, teröpatik pencerenin genişliği ve süresinin her organa göre değişiklikler göstermesinden dolayı, büyük farklılıklar içermektedir. Bu faktör serbest radikallerin uzaklaştırılmasında antioksidanların dozu ve türünden daha etkili ve daha önemli bir unsur olarak düşünülmektedir. Teröpatik pencere organlara spesifiktir ve tedavi manüplasyonlarıyla değiştirilememektedir ^{107,108}.

2.6.4. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Serbest Oksijen Radikal Kaynakları ve Serbest Oksijen Radikallerince Böbreklerde Oluşturulan Hasar Mekanizmaları

2.6.4.1. Ksantin Oksidaz Sistemi

KO enziminin, reperfüzyon sırasında açığa çıkan O_2 radikallerinin üretiminde rolü olabileceği ilk kez Granger ve arkadaşları¹⁰⁹ tarafından ortaya atılmıştır. Bu konudaki diğer gelişmelerde Granger ve arkadaşlarının ortaya koyduğu bu çatı altında gelişmektedir. Bu araştırmacılar, iskemi sırasında KO enziminin KD'ye dönüştüğünü ve ATP'nin de hipoksantine katabolize olduğunu göstermişler ve reperfüzyon döneminde KO enziminin, hipoksantin ksantine dönüşümünü katalizlerken elektron alıcısı olarak NAD^+ yerine O_2 'yi kullanarak, $O_2^{\cdot-}$ radikalini oluşturduğunu ortaya koymuşlardır (Şekil 5).



Şekil 5. Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması¹¹⁰.

Mc Cord ¹¹¹ postiskemik dokularda, doku harabiyetini oluşturan en önemli; faktörün KO enziminden kaynaklanan $O_2^{\cdot-}$ radikalini olduğunu ve bu hasar sonucu gelişen fonksiyonel bozuklukların organdan organa farklılık gösterdiğini bildirmiştir.

Paller ve arkadaşlarının ⁹¹ yaptıkları çalışma, iskemi-reperfüzyon hasarının böbreklerde KO kaynaklı mekanizmayı göstermesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Araştırmacılar sıçanlarda 60 dakikalık böbrek arteri oklüzyonunu takiben, 15 dakikalık reperfüzyon safhasında, böbreklerde lipit peroksidasyon artışını göstermişler ve bu toksik oluşumun allopurinol verilmesiyle azaldığını, organ fonksiyonlarının korunmasının sağlandığını ortaya koymuşlardır ⁹¹.

Mc Cord ¹¹¹, KD→KO dönüşümünün böbreklerde 30 dakikalık iskemi süresini gerektirdiğini ve bu sürenin $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşumu için yeterli olduğunu bildirmiştir.

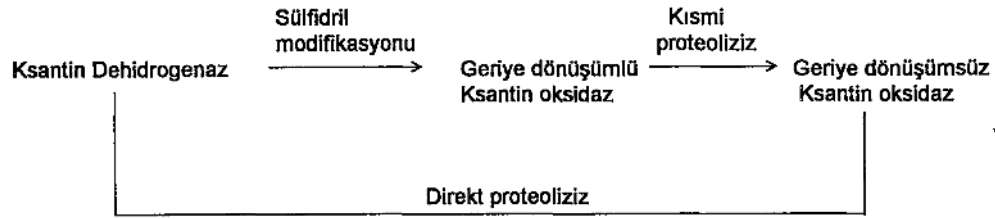
Linaz ve arkadaşları ¹¹² kısa süreli iskemi oluşturulan böbrek dokusunda tekrar oksijenlenme dönemindeki reperfüzyon hasarından O_2 metabolitlerini sorumlu tutmuştur. Kısa süreli iskeminin süresini 30 dakika olarak belirlemişler ve bu sürenin üzerindeki iskemik hasarın O_2 metabolitlerinden bağımsız, hücrel olaylarla açıklanabileceğini iddia etmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar farklı bir çalışmada, böbrek dokusundaki KO enziminin ditioerythreito (DTE) gibi tiyol redükleyici ajanlarla muamele edilmesinden sonra, geriye dönüşümünün olup olmaması esasına bağlı olarak, geriye dönüşümlü (reversible) ve geriye dönüşümsüz (irreversible) oksidazlar olarak ikiye ayırmıştır. Tiyol redükleyici ajanların varlığında geriye dönüşümlü KO→KD' a dönüşebildiği halde, geriye dönüşümsüz KO' ın KD' a dönüşemediğini göstermişlerdir. İskemik böbreklerde, KO→KD dönüşüm mekanizmasının enzimatik veya kimyasal sülfidril modifikasyonu olduğunu göstererek geri dönüşümlü olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmalarında, 45 dakikanın altındaki iskemi sürelerinde, iskemi-reperfüzyon hasarında KO sisteminin önemli bir oksidan kaynak olduğunu ve böbrek dokusunda KD→KO dönüşümü için 45 dakikanın altındaki iskemi sürelerinin yeterli olduğunu bildirmişlerdir ¹⁰⁶.

KD→KO' a geri dönüşümsüz çevrilmesi kısmi proteoliziz ile tripsin, kimotripsin, papain, subtilisin gibi proteinler ve N-ethylmaleimiden gibi kimyasal maddelerle sağlanabilir ¹¹³.

Mc Kelves ve arkadaşları ¹¹³ karaciğer ve böbrekte bu proteoliziz mekanizmasının geçerli olmadığını iddia etmişlerdir. Bu

araştırmacılara göre böbrekte, ilkin 1 saatin altındaki iskemi sürelerinde KD' dan geriye dönüşümlü KO oluşmakta, daha sonra 1,5 saatlik bir lag fazı süresini takiben oluşan geriye dönüşümlü KO' dan geriye dönüşümsüz KO oluşmaktadır (Şekil 6). Geriye dönüşümlü KO' ın invivo olarak proteoliziz yoluyla geriye dönüşümsüz KO' a çevrildiği ve geriye dönüşümlü KO' ın geriye dönüşümsüz KO' a çevrilmesi için KD' dan daha iyi bir substrat olduğunu aynı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.



Şekil 6. Böbreklerde ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşüm modeli ¹¹³

Greene ve Paller ¹⁰⁴ böbreklerde iskemi-reperfüzyon modelinde böbrek epitelyal hücrelerinin O₂ serbest radikal oluşumundan primer yer olduğunu ve bu radikallerce oluşturulan hasarın morfolojik yerinin ise proksimal tübüller olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.6.4.2. Nötrofiller

KD → KO dönüşümlü postiskemik radikal oluşumunun en önemli mekanizması olarak kabul edilmektedir. Aynı mekanizma içinde mikrovasküler reperfüzyon hasarının oluşmasında nötrofillerin de rol oynadığını Hernandez ve arkadaşları ¹¹⁴ göstermiştir. Bu araştırmacılar anti-nötrofil serum kullanarak ve endotel hücre yüzeyine nötrofil adezyonunu monoklonal antikolarla bloke ederek, nötrofillerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla, bu hasarın önemli derecede önlenbildiğini ortaya koymuşlardır.

PMN kaynaklı reperfüzyon dokusu hasarı, PMN lökositlerin mikrovasküler alana kemotaktik birikimi ve dolaşımdaki PMN' lerin mikrovasküler endotelyuma adezyonuyla karakterizedir ^{114,115,116}. PMN' ler, önemli O₂⁻ radikali kaynağı olmakla kalmazlar, ayrıca potansiyel doku hasarı oluşturma etkilerini hidrolitik enzimlerin, proteazların ve elastazların saliverilmesi ve degranülasyonu yoluyla oluştururlar ^{110,115}.

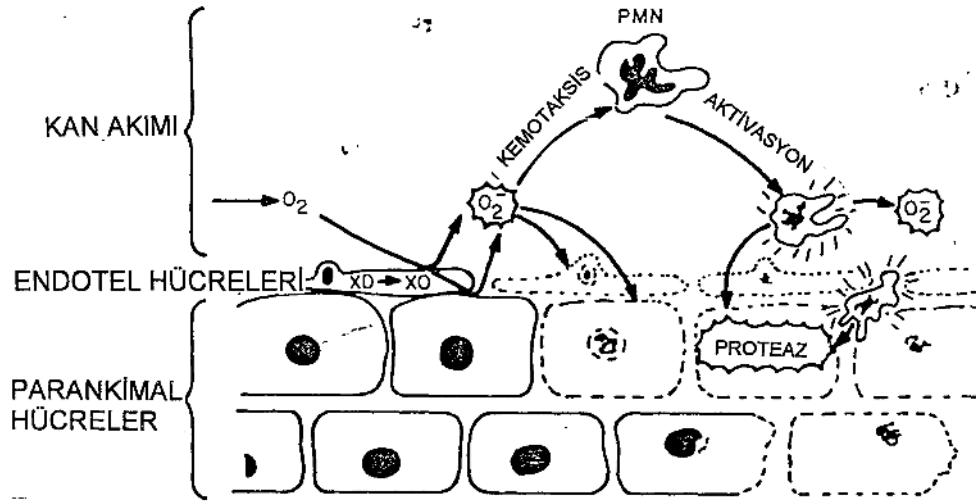
Granger ve arkadaşlarının ¹¹⁰ ortaya koyduğu gibi, postiskemik reperfüzyon döneminde yüksek derecede aktif sitotoksik radikaller, hücre membranlarının lipit peroksidasyonu, PMN' lere saldıran ve aktivite kazanmasını sağlayan bazı maddelerin salınmasını indükleyerek ve PMN' lerin mikrovasküler endotelyuma adezyonunu artırarak yapar.

2.6.4.3. Endotel Hücre Tetikleme Mekanizması

Her ne kadar reperfüzyon hasarının, nötrofillerce NADPH oksidaz orjinli $O_2^{\cdot-}$ radikali tarafından, primer olarak oluşturabileceği bildirilmiş olsa da, nötrofillerin ilk tetikleyici faktör olmadığı ve nötrofillerin ikincil bir mekanizma olarak tetikleyici mekanizmayı yükseltici etki gösterdiği iddia edilmektedir^{84,96,107,108}.

Pankreas ve akciğer gibi bazı organlarda reperfüzyon hasarı SOD ve katalazla önlenemediği halde, nötrofillerin ortamdaki uzaklaştırılmasının hasarın önlenmesine etkili olmadığı gösterilmiştir¹⁰⁷.

İskemi sonrası nötrofillerin birikmesi ve ölçülebilecek miktarlarda KO enzimi taşımayan dokularda iskemi-reperfüzyon hasarının, KO enzim inhibitörü allopurinol ile önlenmesi, NADPH oksidazın allopurinol ile inhibe edilemeyeceğinden, tetikleyici ve primer mekanizmanın KO kaynaklı $O_2^{\cdot-}$ radikali olduğu, nötrofillerin ise ikincil olarak reperfüzyon hasarına katılarak, endotel hücrelerde harabiyet oluşturduğunu düşündürmektedir (Şekil 7)^{107,108}.



Şekil 7. Endotel hücre tetikleme mekanizması¹⁰⁸

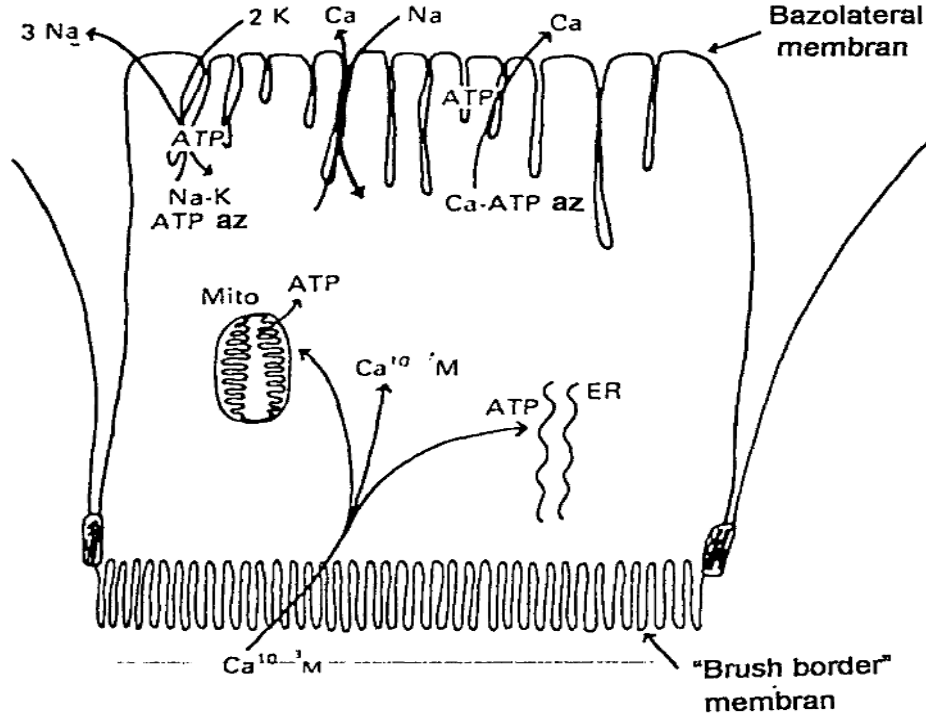
Bazı organlarda endotel tetikleme mekanizması olarak bilinen bu mekanizma nötrofiller olmaksızın hasar oluştursada, bazı organlarda ise bu mekanizma dolaşımdaki nötrofilleri aktive ederek oluşan hasarı arttırmaktadır^{92,117}. Büyüme mekanizması olarak adlandırılan bu oluşumun, Linans ve arkadaşları¹¹⁸ tarafından, iskemi sonrası sıçan böbreklerinde oluşan doku hasarında etkili bir faktör olduğu bildirilmiştir.

2.6.4.4. Hücre İçi Kalsiyum (Ca^{+2}) Artışı

Hücre dışı sıvıda Ca^{+2} , un konsantrasyonu hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarına göre daha fazladır ve normal hücrenin Ca^{+2} a geçirgen olmaması Ca^{+2} gradiyentinin sağlanmasına olanak tanır ¹¹⁹.

Böbrek tübüler epitelinde, Ca^{+2} , un hücre dışına çıkmasına yol açan iki önemli mekanizma mevcuttur; birinci mekanizma; Ca^{+2} – ATPaz mekanizması, ATP bağımlıdır ve Ca^{+2} hücre dışına taşınır. İkinci Na/Ca değişim mekanizması, indirekt olarak ATP bağımlıdır. Na/K-ATP az aktivitesi primer hücresel sodyumun (Na^+) regülasyonunu sağlar. Na^+ gradiyenti sayesinde Ca^{+2} hücre dışına çıkarılır, hücre içindeki konsantrasyonun düşük tutulması sağlanır ¹¹⁹.

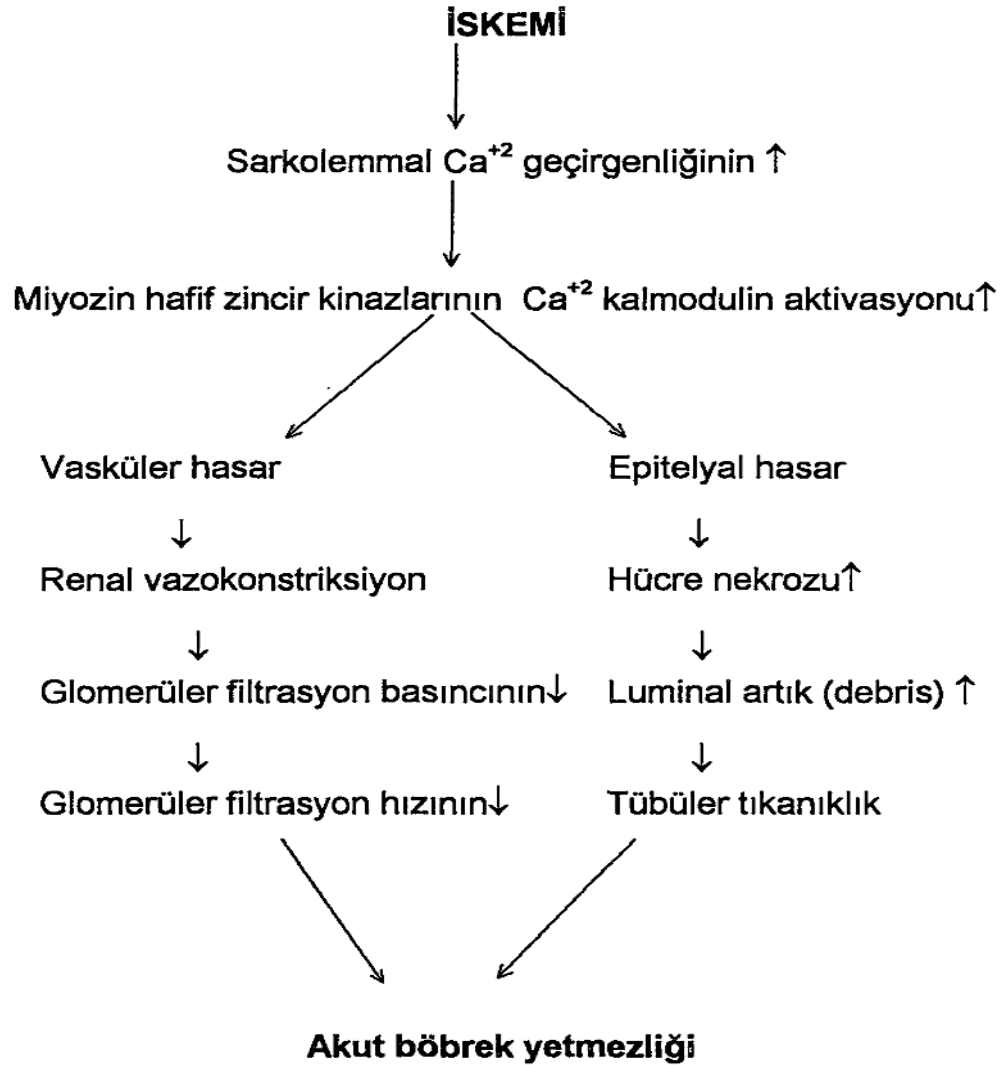
Bazal hücre Ca^{+2} hemostazının sağlanmasında iki önemli organel hücre içinde görev alır. Herhangi bir patolojik olay sonucunda Ca^{+2} , un hücre içinde artmasıyla mitokondriler ve endoplazmik retikulum, artan Ca^{+2} , un Ca^{+2} -ATP az mekanizmasıyla geri alımını arttırarak hücre içinde hemostazını sağlarlar. Ca^{+2} , un endoplazmik retikuluma ve mitokondrilere alınması ATP gerektiren bir olaydır ve O_2 veya ATP' nin yeterli düzeyde olduğu koşullarda gerçekleşir ¹¹⁹. Böbrek tübüler epitel hücresinde Ca^{+2} regülasyonun mekanizması şekil 8' de gösterilmektedir.



Şekil 8. Böbrek tübüler epitel hücresinde Ca^{+2} regülasyonu

Böbrek iskemisi sonucunda ortaya çıkan ATP yetersizliği iyonların transportunu kontrol eden Ca^{+2} -ATP az ve Na/K-ATPaz mekanizmalarının ve pompaların işlevlerini yapamamasına neden olur. Bunun sonucunda iyon akımının yönü konsantrasyon gradiyentlerince belirlenir ve bozulan Na^{+2} gradiyenti $3\text{Na}^{+}/2\text{Ca}^{+2}$ artar ¹¹⁹.

İskemi sonucu oluşan vasküler hasar sarkolemma hasarına yol açar ve Ca^{+2} a karşı geçirgenliği arttırır. Hücre içine Ca^{+2} akışı, Ca^{+2} -kalmodulin kompleksinin aktivasyonuna ve bunda miyozin hafif zincir kinazları aktive etmesiyle bir dizi patolojik olay oluşturarak, akut böbrek yetmezliğine kadar varacak iskemi kaynaklı vasküler hasarı oluşturur ¹¹⁹ (Şekil 9).



Şekil 9. İskemik böbrek vasküler hasar mekanizmasının basamakları ¹¹⁹.

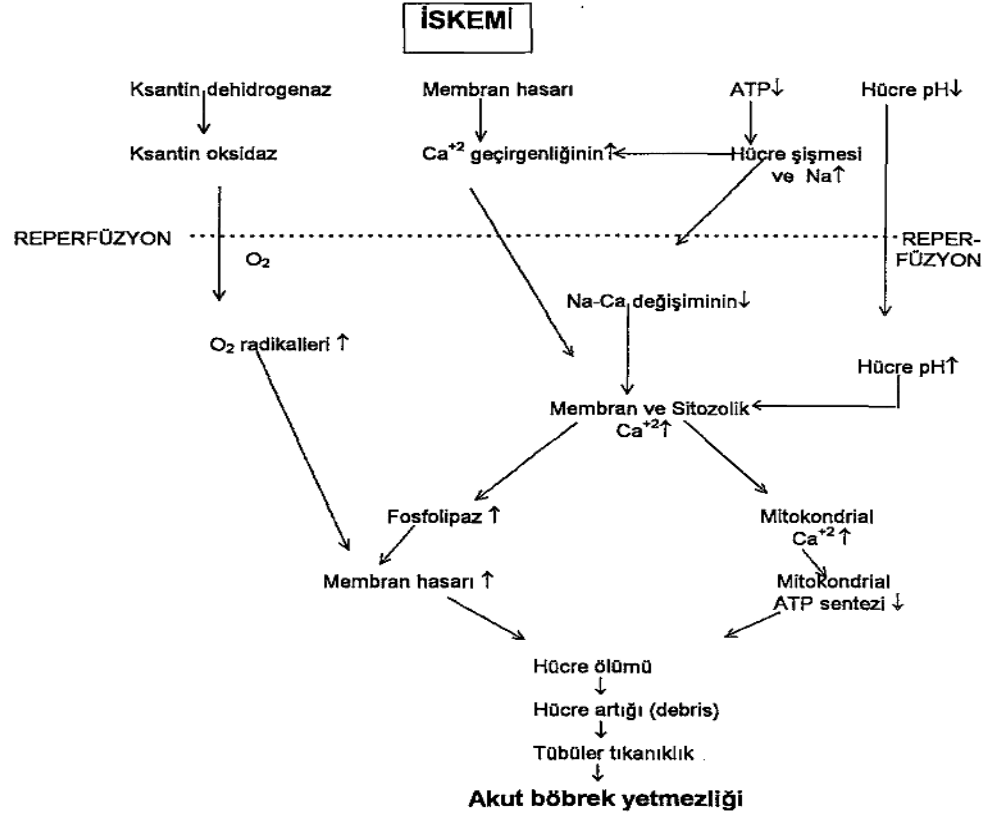
İskemi sonucunda “proksimal tübül brush border” membranlarında geriye dönüşlü hasar oluşmakta ve bu da reperfüzyon döneminde Ca^{+2} geçirgenliğinin artmasına bağlı olarak hücre içi Ca^{+2} artışına sebep olmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} artmasıyla mitokondrial hasar ve böbrek epitelinde hücre ölümü görülmektedir ^{93,119,120}.

Hücre hacim regülasyonunun kaybına bağlı olarak oluşan hücre şişmesi, plazma membranın Ca^{+2} a karşı geçirgenliğini arttırmaktadır. Ca^{+2} un membran fosfolipaz aktivitesini ve serbest yağ asitlerini arttırarak iskemik hasar oluşturduğu ve hücre membranlarında değişiklikler yaparak, bu hasarı şiddetlendirdiği gösterilmiştir ^{119,121}.

Mc Cord ¹¹¹, O_2 radikallerinin membran hasarındaki rollerini invitro ve invivo çalışmalarla ortaya koymuştur. İskemi sonucu oluşan $KD \rightarrow KO$ enzimatik dönüşümünde, Ca^{+2} un önemli bir faktör olduğunu bildirmiştir (Şekil 10).

Reperfüzyon dönemindeki, hücresel asit-baz dengesindeki değişiklikler ve yeniden oksijenlenmesinin hücre içi Ca^{+2} u arttırdığı ortaya konmuştur. İskemik dönemdeki düşük pH seviyelerinin, dokuyu iskemik hasardan koruduğu böbrek gibi birçok organda gösterilmiştir. Asidozun, anoksida artan Ca^{+2} un geri emilimini inhibe ederek, dokuyu hasardan koruması ve buna zıt olarak reperfüzyon döneminde pH yükselmesiyle hücre içi Ca^{+2} un artması, hücre içi pH değerlerinin Ca^{+2} a bağımlı doku hasarının oluşumunda önemli bir faktör olduğunu düşündürmektedir ¹¹⁹.

İskemi sonucunda ATP düzeylerinin düşmesi, endoplazmik retikulum ve mitokondrinin ATP bağımlı Ca^{+2} un sitozolik regülasyonunu oluşturmasına engel olur. İskemi-reperfüzyon döneminde, sitoplazmik Ca^{+2} regülasyonunun sağlanamaması ve hasarlı membranlarda Ca^{+2} geçirgenliğinin artması, fazla Ca^{+2} yüküne maruz kalan böbrek korteksindeki mitokondrilerde, oksidatif fosforilasyon işlevinin bozulmasına neden olur. Mitokondrial solunum yerine getirilemez ve artan Ca^{+2} miktarıyla işlev bozukluğu doğru orantılıdır. Böbrek tübüler epitelindeki iskemi-reperfüzyon modelinde bu mekanizmaların herbiri birbiriyle sıkı ilişkidir ve kısır bir döngü oluşturarak akut böbrek yetmezliğini oluştururlar ^{119,120} (Şekil 10).



Şekil 10. İskemi-reperfüzyon modelinde tübüler epitelde Ca^{2+} un rolü ve hasar oluşturuıcı mekanizmaları¹¹⁹.

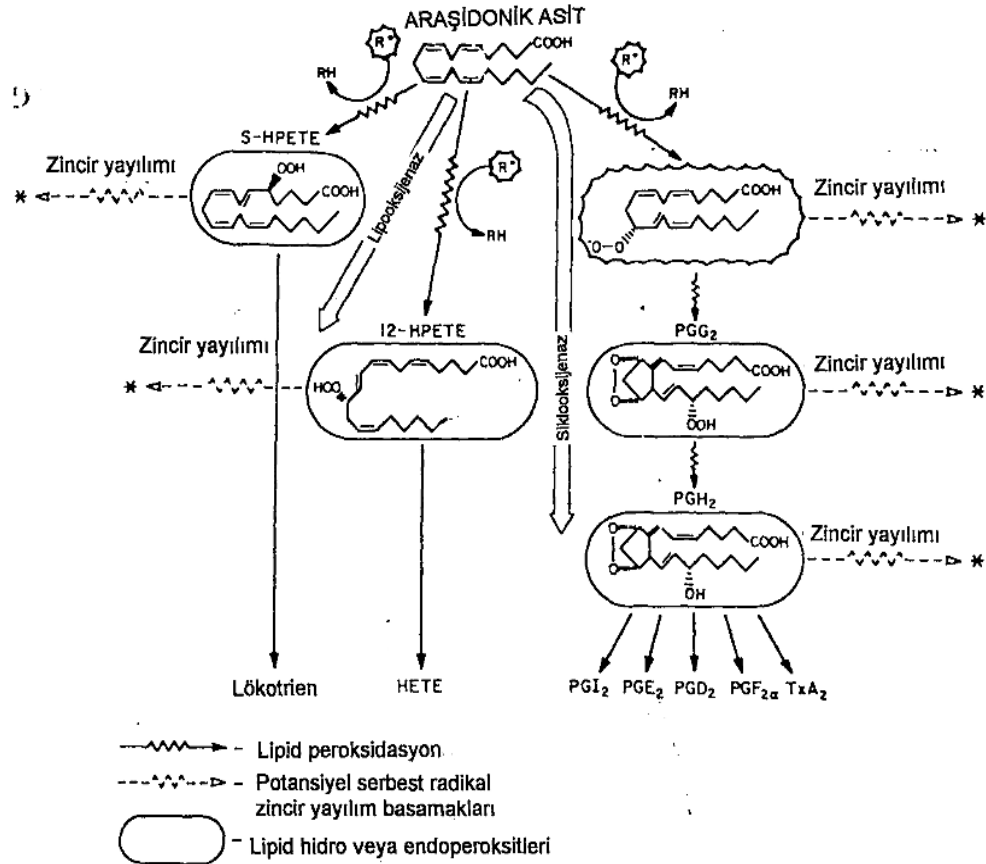
İskemi-reperfüzyon hasarında, Ca^{2+} -antagonistlerinin de yararlı etkilerinin tespit edilmesi, iskemi-reperfüzyon modelinde Ca^{2+} artışının doku hasarı oluşmasında önemli bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır^{119,120,121}.

2.6.4.5. Araşidonik Asit Metabolizması

Grower ve arkadaşları¹²² oksidan stres oluşturulmuş tavşan böbreklerinde, siklooksijenaz inhibitörü indometasin verilerek lipid peroksidasyonun azaltılması, Greene ve Paller' in⁸² postiskemik böbrek tübüler hücrelerinde $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin oluşumunda araşidonik asit metabolitlerinin sorumlu olabileceğinin bildirmesi ve 5-lipooksijenaz ürünlerinin artmış seviyelerinin postiskemik organlardaki tespiti, araşidonik asit metabolizmasının böbrek-iskemi reperfüzyon doku hasarında önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir¹²³. Araşidonik asit metabolizması hem radikal oluşumunda kaynak olması, hem de radikallerce aktive edilmesinden dolayı radikal kaynaklı doku hasarında önemli bir mekanizmadır¹⁰⁸.

Membran Ca^{+2} -ATP az enziminin çeşitli faktörlerle inhibe edilmesi ve hücre içi Ca^{+2} depolarının hasara uğramasıyla, hücre içi Ca^{+2} miktarı artar¹¹⁹. Hücre içi Ca^{+2} , un artması, fosfolipaz aktivitesini arttırarak, serbest araşidonik asit seviyesini yükseltir. Araşidonik asidin siklooksijenaz ve lipooksijenazla metabolizması sonucu, ikincil serbest radikaller, toksik lipid peroksitler ve bunların yanında prostoglandin ve lökotrienler oluşur^{108,119,124} (Şekil 11).

Hidroperoksitler siklooksijenaz aktivitesini arttırarak ve prostosiklin oluşumunu inhibe ederek, vazokonstriktör olan tromboksanın aktivite kazanmasına sebep olurlar. Lipooksijenaz yoluyla oluşan lökotrienler de vazokonstriksiyona sebep olur ve kapiller permabiliteyi arttırırlar. Lökositlerin kemotaksisi de lökotrienlerce arttırılmaktadır. Bu mekanizmaların tümü endotel doku hasarına yol açarak böbreklerde fonksiyonel bozukluklara neden olur¹⁰⁸.



Şekil 11. Araşidonik asit metabolizması ve radikal oluşumu¹⁰⁸.

2.6.4.6. Mikrovasküler Yapının Bozulması ve “Re-flow Paradoks Fenomeni”

O₂ radikallerinin ve PMN etkilerinin yanında, mikrovasküler yapı özellikle mikrovasküler endotel iskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasında önemli rol oynar. Mikrovasküler hasar, hipoksi sonucu enerji yetersizliğinin oluşmasıyla endotel bariyerinin bozulması, PMN aktivasyonu, radikal oluşumu, proteazların ve hidrolitik enzimler gibi yeniden akıma bağlı çeşitli faktörlerin intravasküler boşlukta oluşturdukları doku hasarıyla karakterizedir. Kompleks olaylar içeren iskemi kaynaklı mikrovasküler hasar, iki patofizyolojik mekanizmayı içerir. Bunlar; iskemik dönem içindeki doku hasarını ortaya koyan “no-reflow” fenomeni ve yeniden akıma bağlı oluşan “re-flow paradoks” mekanizmasını oluşturur¹¹⁵.

“No-reflow”

Eğer iskeminin süresi, postiskemik hiperemik cevabı önleyecek şekilde doku spesifik toleransını aşarsa, mikrovasküler doku perfüzyon bozukluğu önemli bir fenomen olarak karşımıza çıkar. Postiskemik mikrovasküler değişikliklerin tavşan beyinde dönüşü olmayan nokta kavramının ortaya konularak gösterilmesi, yeni bir kavram olan “no-reflow” fenomeninin ortaya çıkmasına neden olmuştur¹¹⁵.

Postiskemik reperfüzyon süresince mikrovasküler yetmezlik, adrenal, böbrek, çizgili kas ve myokard gibi doku ve organlarda gösterilmiştir. “No-flow” ve “no-reflow” fenomenlerinin hücresel ve mikrovasküler hasardaki mekanizmaları şekil 12’ de gösterilmektedir¹¹⁵.

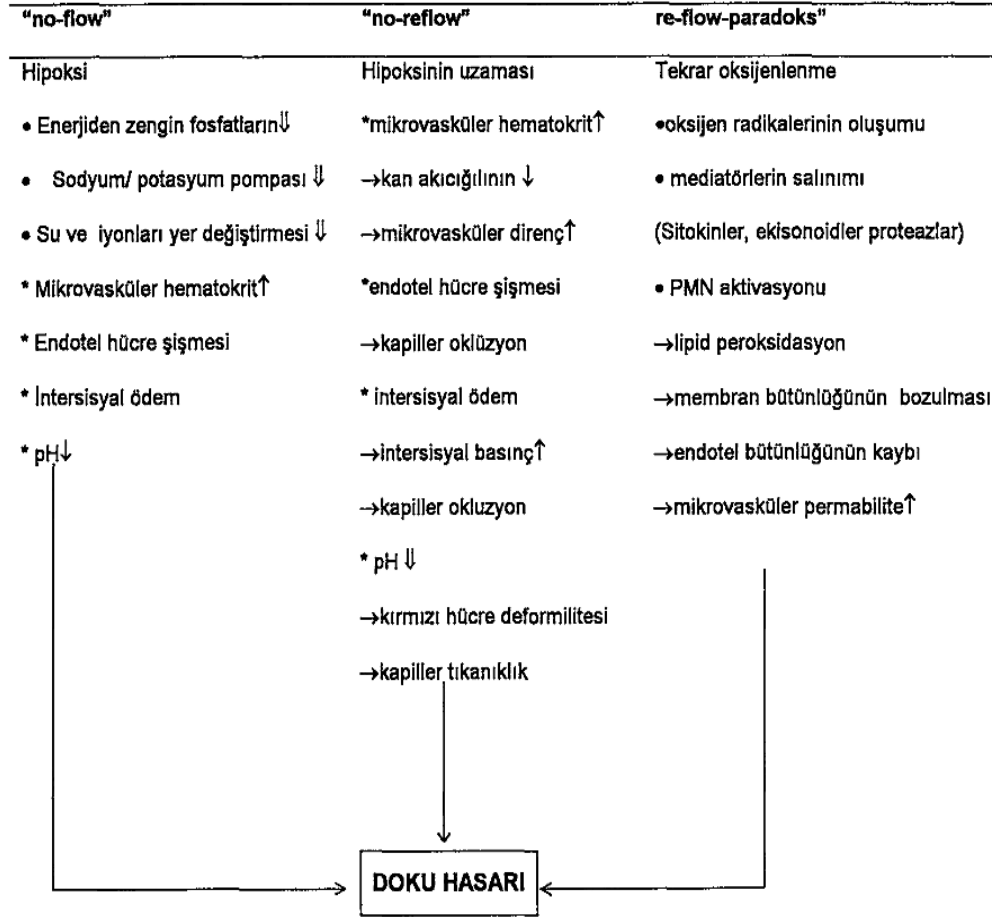
“Re-flow paradoks”

İskemiye takiben hipoksinin uzaması ve kapiller perfüzyon yokluğu “no-reflow” mekanizmasının oluşmasını sağlar.

Reperfüzyon hasarında “reflow paradoks” mekanizmasını O₂ radikalleri, lökotrien ve reperfüze damarlardaki tromboksan gibi reaktif mediatörlerin oluşturdukları ortaya konmuştur¹¹⁵ (Şekil 13). Bu mediatörlerin kemoatraktif hareketleri sonucunda, reperfüze küçük damarlarda fazla miktarlarda aktive olmuş PMN lökositlerin birikimi ve bu hücrelerin geçici veya devamlı olarak mikrovasküler endotelle ilişkileri gösterilmiştir.

İSKEMİ

REPERFÜZYON

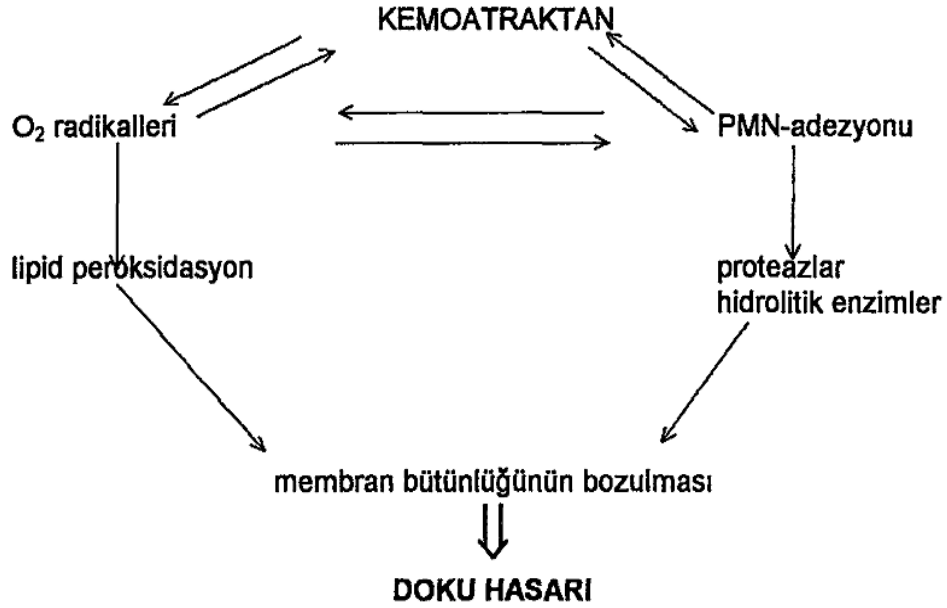


Şekil 12. Mikrovasküler ve hücrel hasarın iskemi ve postiskemik reperfüzyon dönemlerindeki patomekanizması ¹¹⁵.

İskemi-reperfüzyon döneminde hücre-hücre etkileşimi küçük damarlardaki akım durumunu, özellikle de endotel bütünlüğünü bozabilir. Birçok organda endotel yapının bozulması mikrovasküler permabilite artışı, makromoleküler sızıntı ve intersisyal ödemle birlikte ¹¹⁵.

Mikrovasküler dolaşımdaki üç önemli faktör; O₂ radikalleri, kemaatraktanlar, ve PMN endotel ilişkisi bir dairesel döngü oluşturacak şekilde "re-flow paradoks" fenomenini oluşturur (Şekil 13). Ancak bu döngüde hangi basamağın daha önemli olduğu belirsizdir ¹¹⁵.

"RE-FLOW-PARADOKS"



Şekil 13. "Re-flow paradoks" dönemindeki hücresel ve mikrovasküler hasarın patomekanizması ¹¹⁵

Granger ve arkadaşları ¹¹⁰ iskemi-reperfüzyon hasarının O_2 radikallerinin oluşumuyla tetiklendiğini, bunu hücre membranlarının lipid peroksidasyonunun takip ettiği, daha sonra kemoatraktanların salınmasının ve son olarak mikrovasküler endotele PMN adezyonu olduğunu göstermişlerdir.

Menger ve arkadaşları ¹¹⁵ son çalışmalarında, kemoatraktanların "re-flow paradoks" fenomeninde primer mediatör olduğunu, PMN adezyonunun $O_2^{\cdot-}$ radikalinin salınımını ve bazı proteazları aktive ederek doku hasarı yapabileceklerini iddia etmişlerdir.

Bu görüşler her ne kadar "re-flow paradoks" fenomeninde tetikleyici mekanizma olan O_2 radikallerinin rolünü ortadan kaldırmasa da, kemoatraktanların da önemli bir mekanizma olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu mekanizmaların tümü de besleyici mikrovasküler perfüzyonunu bozarak, iskemi-reperfüzyonu takiben gelişen doku canlılık kaybına neden olur ¹¹⁵.

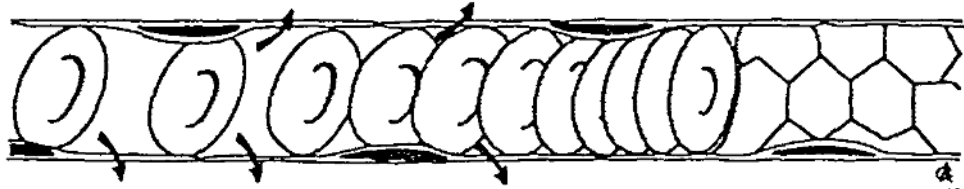
2.6.4.7. Eritrosit Tuzağı

Böbreklerde iskemi-reperfüzyon sonrası KO kaynaklı radikaller böbrek damarlarında kapiller membranın glukozaminoglikan yapısını bozarak plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına neden olurlar ¹²⁵.

Proteinlerin böbrek intersisyumuna sızması sonucunda transkapiller kolloid ozmatik basınç farkı azalır ve proteinler de dahil olmak üzere sıvı sızması ve intrakapiller hematokrit artışı gözlenir. Zona kortekste bulunan kısa kapillerlerde kapillerin distal kısımlarında bu mekanizmayla eritrositlerin konjesyonu oluşu (Şekil 14). Böbrek medullasının uzun kapillerlerinde plazmanın tümüyle damar dışına kaçışı gözlenir. Kırmızı hücreler birbiri ardına paket oluşturur ve kuartrohegzogonal kırmızı hücre birikimi gözlenir (Şekil 15). Buradaki oluşum kısa kapillerlerde görülen konjesyondan öte eritrosit tuzağı (trapping) olarak adlandırılmakta ilerleyen safhalarda tıkaç oluşumu ve kan akımının engellenmesiyle birlikte görülmektedir ¹²⁵.

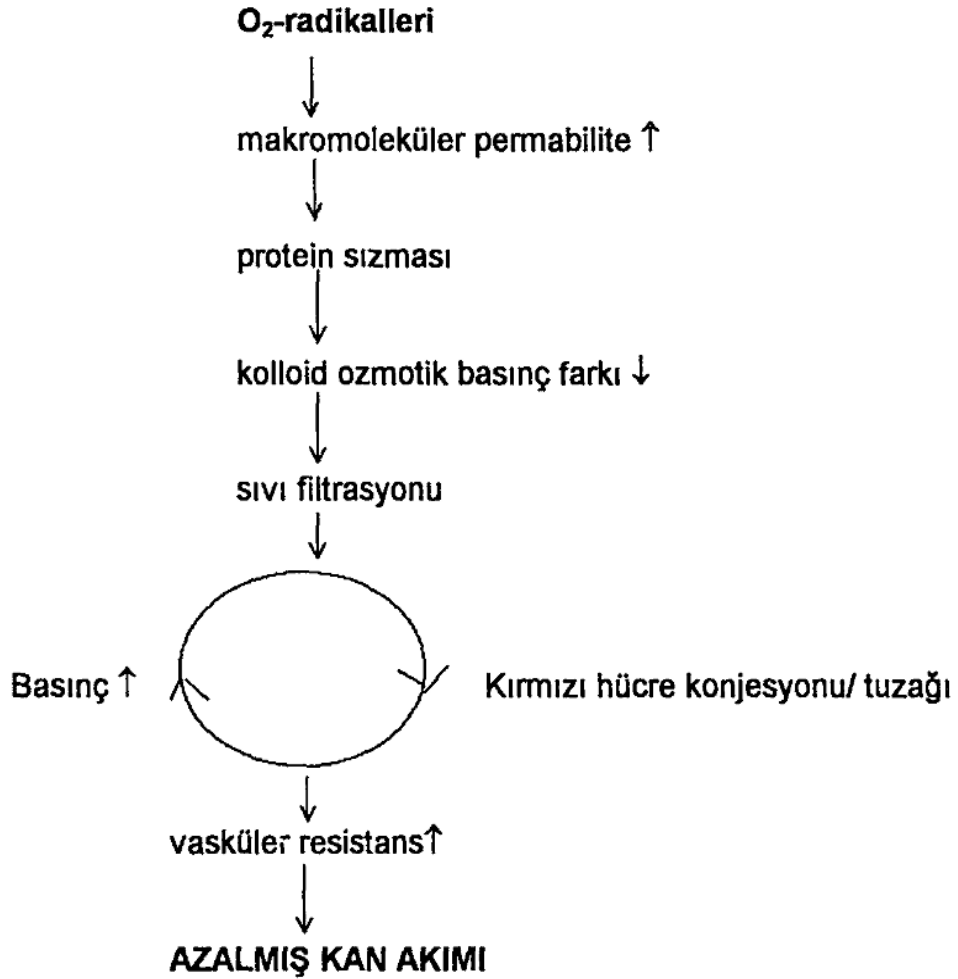


Şekil 14. Kısa kapillerde konjesyon görünümü



Şekil 15. Uzun kapillerde kuartrohegzogonal eritrosit paket birikiminin görünümü ¹²⁵

Tüm kapillerin paket halinde kırmızı hücrelerle tıkanması ve medullar kırmızı hücre hacminin artması, damarların tam olarak tıkanmasıyla sonuçlanır ¹²⁵. Eritrosit tuzağı mekanizması şekil 16' da gösterilmektedir.

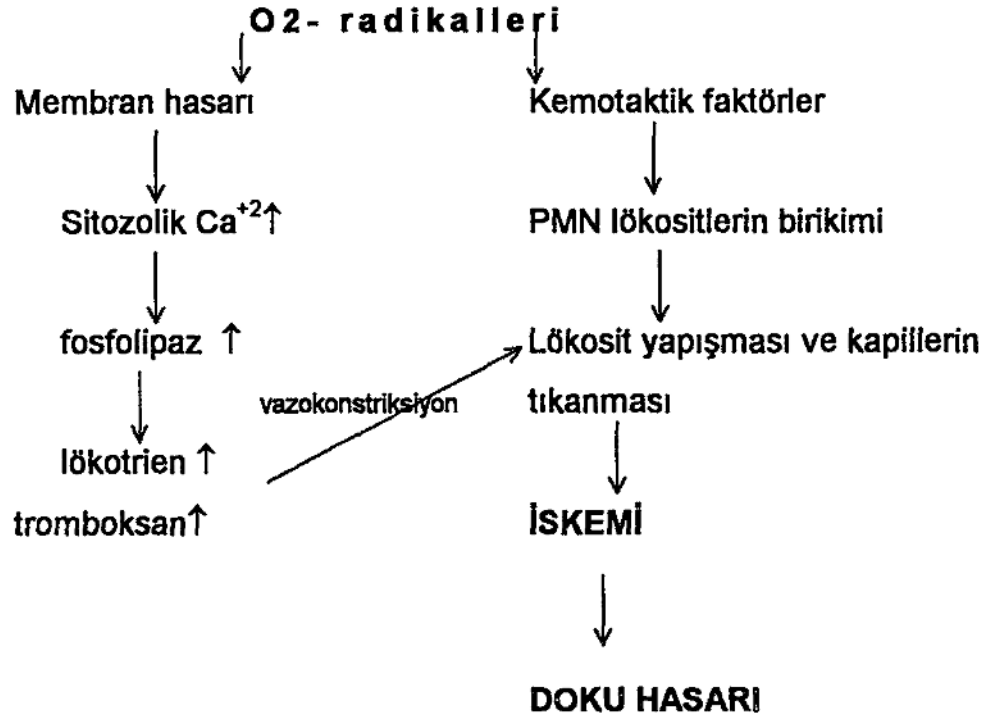


Şekil 16. Eritrosit tuzağı oluşma mekanizması ¹²⁵

Bu kapiller membran hasarının önlenmesinde SOD ve allopurinolün çok etkili olduğunun gösterilmesi ve bu patofizyolojik olayın oksijen radikallerince oluşturulduğunu düşündürmektedir ¹²⁵.

2.6.4.8. Lökosit Yapışması ve Lökosit Tıkacı

Lökosit yapışması (leukocyte sticking) kapiller damarların PMN lökositlerle invazyonu sonucu oluşan patofizyolojik bir olaydır. Bilinen en önemli oluşma mekanizması, iskemi-reperfüzyon kaynaklı O₂ radikallerinin kemotaktik faktörleri aktive etmesidir ¹²⁶ (Şekil 17).



Şekil 17. Lökosit yapışmasının hasar oluşturma mekanizması ¹²⁶.

Radikallerce granülosit birikiminin tetiklenip, hasarlı dokuya PMN lökositlerin adezyonu ve ileri safhada tam bir tıkaç oluşumuyla mikro dolaşımın bozularak reperfüzyon döneminde endotel hasarının oluşmasıyla karakterizedir ^{114,115,126}.

Schiller ve arkadaşları ¹⁰⁸ iskemi-reperfüzyon sonucunda, membran bütünlüğünün bozulup hücre içi Ca^{+2} un artması ve fosfolipaz aktivasyonu ile artan lökotrienlerin ve tromboksanın vazokonstriksiyon ve kemotaksise neden olarak lökosit yapışmasını oluşturabileceğini bildirmişlerdir (Şekil 17).

Gower ve arkadaşları ¹²² da aynı mekanizmayı böbreklerde lökotrienlerin kemotaksisi ve kapiller geçirgenliğini arttırdığını göstererek ortaya koymuşlardır.

2.6.5. Böbreklerde Antioksidan Sistem

Böbreklerde intrinsek antioksidan enzimlerin fonksiyonu gösterilmiştir. SOD (manganez ve çinko-bakır bağımlı formları) katalaz, glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve hem oksijenaz gibi antioksidan enzimlerinin hepsi böbreklerde tanımlanmıştır ⁷⁶.

GSHPx aktivitesi için gerekli bir metal olan selenyumun diyetle alınmamasının, sıçan böbreklerinde yapısal ve fonksiyonel hasara yol açması böbrek hastalıklarında antioksidan enzimlerin önemini göstermesi açısından iyi bir deneysel model olmuştur ¹⁰⁰.

Nath ve Paller ¹⁰⁰ iskemi-reperfüzyon modelinde selenyum ve vitamin E diyetinden yoksun bırakılan deney hayvanlarında, yapısal ve fonksiyonel böbrek hasarını göstermiş ayrıca bu hayvanlarda yüksek MDA seviyeleri tespit ederek, kontrollerde %0 olan mortalitenin diyetten yoksun bırakılan sıçanlarda %50 seviyelerine çıktığını ortaya koymuşlardır.

Dietilkarbomat ve dietilmalat kullanılarak SOD ve GSHPx üretiminin bloke edilmesi böbreklerde proteinüri ve böbrek fonksiyon kaybı oluşturarak doku hasarı meydana getirmiştir. Oksidan strese maruz kalan böbreklerde vazokonstriksiyon sık karşılaşılan bir bulgudur. Vazodilatör olan nitrik oksit oksidan stres sonucu oluşan $O_2^{\cdot-}$ radikallerince yıkılır. SOD enziminin $O_2^{\cdot-}$ radikalininin dismutasyona uğratarak indirekt olarak nitrikoksit yıkılımını önlemesi, SOD enziminin böbreklerde önemli bir antioksidan enzim olduğunu düşündürmektedir ¹²⁷.

Diğer hücreler gibi böbrek hücreleride, reaktif O_2 metabolitleri gibi biyolojik situmuluslara endojen antioksidan enzimlerini arttırarak cevap verir.

Sıçan glomerüler mezanşial hücreleri H_2O_2 ile inkübe edildiklerinde Mn-SOD aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Sıçanlarda izole edilen glomerüler hücreler iskemi-reperfüzyona maruz bırakıldıklarında total SOD, Mn-SOD, GSHPx ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin tümünün arttığı gösterilmiştir ¹²⁷.

Singh ve arkadaşları ¹²⁸ böbrek dokusunda iskemi-reperfüzyon gibi oksidan stres oluşturan durumlarda, transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde regüle edilebilen antioksidan enzimlerin, aktivitelerinin azalarak "down regülasyona" uğradıklarını göstermiştir. Glukokortikoidlerin özellikle metil prednizolon uygulananın böbreklerde tüm antioksidan enzimleri arttırarak antioksidan sistem üzerine "up regülasyon" sağladığı bildirilmiştir ¹²⁷.

Araştırmacılar böbrek dokusundaki antioksidan savunma sistemini ve önemini antioksidan enzimlerin endojen ve eksojen uyarımlarla üretimlerinin arttırılmasıyla ve eksikliklerinde çeşitli patolojilerin gösterilmesiyle ortaya koymuşlardır ^{76,80,127}.

2.7. Kekik ve Genel Özellikleri

2.7.1. Kekik

Kekik önemli ihraç ürünlerimizden biridir. Türkiye dünya kekik ticaretinin yaklaşık %70' ini elinde tutmaktadır ¹²⁹.

Türkiye' de "kekik" olarak tanımlanan Lamiaceae familyasına ait pek çok hoş kokulu bitki türü bulunmasına rağmen, özellikle uçucu yağı karvakrol ve timol içeren türler "kekik" olarak kabul edilmektedir ¹²⁹. Ayrıca Borneol, Cymol, Pimen, Tanen ve flavonlar içerdiği bilinmektedir ¹³⁰. Bu türler arasında Thymus, Origanum, Satureja, Thymbra ve Coridothymus cinsleri hem yayılış olarak hem de ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır ¹²⁹.

Dünya ticaretinde "Oregano" veya "Origanum" adı altında Origanum türlerinden başka bazı Lippia ve Thymus türleri de bulunmaktadır. Avrupa ve Amerika' da ekonomik öneme sahip fenolik türler: Türk kekiği (Origanum onites L.), Yunan kekiği (Origanum vulgare L. spp. viridi (Boiss)Hayak), İspanyol kekiği (Coridothymus capitatus L. Hoffmann ve Link) ve Meksika kekiği (Lippia graveolens HBK) dir. Ancak hiçbir zaman Origanum onites L. türü tek başına ihraç edilmemektedir ¹²⁹.

Türkiye'den ihraç edilen Origanum türlerinin başında ise Origanum onites L, Origanum minutiflorum Schwrd et Davis, Origanum majorana L., Origanum syriacum var. bevanii (Holmes) Ietswaart, Origanum vulgare ssp. hirtum (Link) Ietswaart'ın geldiği belirtilmektedir. Türkiye'den ihraç edilen kekik türleri içerisinde İzmir kekiği (Origanum onites L.) en büyük paya sahiptir ¹²⁹.

Ege ve Akdeniz Bölgesinden toplanan kekik türleri arasında Origanum onites (İzmir kekiği), Origanum majorana (beyaz kekik), Origanum minutiflorum (Sütçüler kekiği, endemik bir tür), Origanum syriacum var. bevanii, Thymbra spicata veya T. sintenisii (Zahter, Kara kekik, Sivri kekik), Satureja cuneifolia ve Coridothymus capitatus (İspanyol kekiği) yer almaktadır ¹²⁹.

Birçok araştırmacıya göre "Oregano" adı bir türden çok, tipik bir yaprak baharat aromasını nitelemede kullanılmalıdır ¹²⁹.

İzmir kekiğinin özellikle Akdeniz Bölgesini kapsayan geniş bir yayılma alanı vardır. Daha çok Yunanistan, Adalar ve Güney-Batı Anadolu esas yayılma alanıdır. Deniz seviyesinden 1400 m. yüksekliğe kadar doğal olarak yayılış göstermektedir. Origanum onites L. de çok enteresan olan mevsimsel dimorfismus bulunmaktadır. Bu, bitkinin adaptasyon yeteneğinin bölge koşullarına göre değişmesi olarak tanımlanmaktadır.

Örneğin; aşırı kurak yaz dönemini geçirebilmek için iki esas yaprak tipi oluşmaktadır. Yazın kurak aylarda küçük, kısa yapraklar oluşurken, sıcak ayların dışında oluşan esas yapraklar çok daha büyüktür ¹²⁹.

2.7.2. Kekiğin Etkileri ve Kullanım Alanları

Öncelikle baharat olarak kullanılır. Yağlı ve ağır yemeklerin tadını zenginleştirir, sindirimi kolaylaştırır. Şifalı bitki olarak kekik; öncelikle kramp çözücü, dezenfekte edici ve balgam söktürücü olarak kullanılır. Akciğer ve bronşlar, mide ve bağırsaklar, kekiğin başlıca kullanım alanlarıdır. Bitkinin önemli etken maddesi olan eterli uçucu yağlar kana karışıp, bronşiyal kasları etkileyerek, krampları çözebilir. Aynı zamanda o bölgelerde bakteri oluşumunu önler. Öksürük ve üst solunum yolları iltihabında çay içimi ve gargara biçiminde kullanılabilir. Kekik iştah açar ve sindirim sistemini uyarır. Sindirim sisteminde görülen ekşimeler ve kramplı ağrılar bir bardak kekik çayı ile geçirilebilir, kötü kokulu ve yumuşak dışkı normalleşir. Boğmaca ve öksürük, sinir sistemi zafiyeti, romatizma ve bağırsak hastalıklarına karşı, çay içiminin yanısıra, kekik banyoları da çok yararlıdır. Güçsüz, zayıf ve solgun çocuklara da kekik banyosu yaptırılabilir. Kekik çayı ile ayrıca adet kanamaları dengelenebilir, adet zamanlarındaki kramplı ağrılar geçirilebilir, ergenlik sivilceleri iyileştirilebilir. Kekik çayı içimi ve kekikle karıştırılmış bal yenmesiyle organizma güçlendirilebilir ve dengeye kavuşturulabilir. Kekik tentürü friksiyonları ile (ovarak sürme) romatizmal ağrılar, sinirsel rahatsızlıklar ve organ titreklilikleri tedavi edilebilir. Sıcak kekik yastıkları ağrılı bölgenin üstüne konularak büyük rahatlıklar sağlanabilir. Bu küçük bitki yastıklarını herkes hazırlayabilir. Kekik, öksürük ve mide rahatsızlıklarına karşı başka bitkilerle karıştırılarak daha da başarılı biçimde kullanılabilir ¹³¹.

Kekik, içerdiği maddelerle hücrelerden salgılanan serbest radikalleri bağlayarak sağlık açısından birçok fayda oluşturmaktadır. Kekik, içeriğindeki maddelerle vücutta hücre koruma sistemlerini geliştirmesiyle antioksidan, kanser oluşumunu engellemesiyle antikanserojen, diyabet hastalığını engellemesiyle antidiyabetik ve vücuttaki kolesterol oranını ayarlamasıyla antikolestremik özellikler taşımaktadır. Bu özellikleri ile kekik, yaşlılığı geciktirmekte, tümör oluşumunu engellemekte, şeker hastalığına iyi gelmekte ve gıdaların bozulmasını doğal yollarla engellemektedir ¹³².

2.8. Taurin

2.8.1. Taurinin Genel Özellikleri

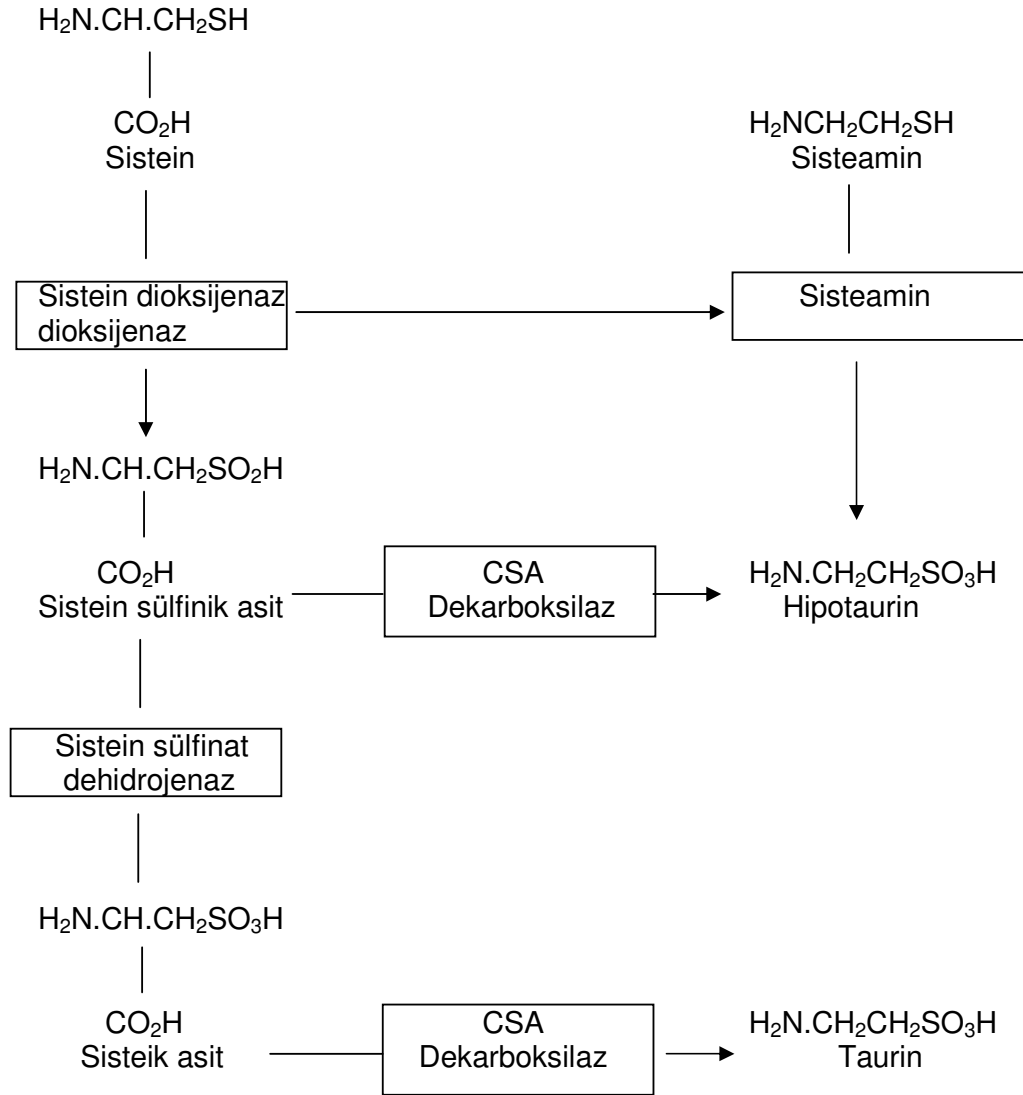
Taurin; renksiz, suda ereyebilme özelliğine sahip, molekül ağırlığı 125 dalton olan nonesansiyel bir β amino asittir ^{133,134,135,136}. İlk kez öküz safrasından elde edilmiştir ¹³⁷.

Taurinin amin grubu ($-NH_2$), 2. veya β karbon halkasına oturmuştur ¹³⁸. Taurin yüksek asidite taşır ve fizyolojik pH sınırında tam olarak iyonize halde bulunur. Tersine karboksilik gruplar bu aralıklarda noniyonize durumdadır. Taurinin “eş” iyonik özelliği ona düşük lipofilik özellik kazandırır. Bu nedenle taurin için lipofilik membranlardan difüzyon yavaştır. Taurinin biyolojik membranlarda permeabilitesinin olmaması, bu membranlardan geçmek için yüksek konsantrasyon gradiyenti sağlanması zorunluluğunu getirir. Örneğin retina için bu konsantrasyon gradiyenti 400 / 1, beyin için 500/ 1’dir. Taurinin hücreye transportu Na^+ iyonu ile birlikte olup her taurin molekülü transport edildiğinde 1-3 Na^+ hücre içine taşınır ve bu Na^+ , Na^+-K^+ ATPaz ile geri pompalanır ¹³⁴.

Taurin; organizmada metionin, sistein gibi sülfür içeren amino asitlerin metabolizmasından elde edilir ^{133,137}. Organizmadaki taurin havuzu diyetle alınan kükürtlü amino asitlerin endojen metabolizması ile belirlenir ¹³⁴. Taurin esas olarak beyin ve karaciğerde sentez edilmektedir (Şekil 18) ^{137,138}.

Taurin yüksek konsantrasyonlarda beyin gelişimi için önemlidir. Ortalama 70 kg’lık bir insanda 70 gr taurin bulunur ¹³⁸.

Taurin ilk defa Jacobsen ve Smith (1968) tarafından tanımlanmıştır. Safra asit sentezinde sınırlayıcı, osmoregülatör, enerji verici ve santral sinir sisteminde nöroinhibitör etkili olduğu gösterilmiştir ¹³⁵. Bugün taurinin pek çok önemli fonksiyonlarının olduğu saptanmıştır (Tablo 3) ¹³⁴.



Şekil 18. Taurin Biyosentez Yolu

Safra asit konjugasyonu için düşük miktarlarda taurine ihtiyaç vardır. Taurinin veriliş dozu artınca idrarla atılımı da artar. Diyetteki taurin artışı, kas harabiyeti, radyasyon ve kortikosteroidler hipertaurinemiye neden olan etkenlerdir. Taurinin idrarla atılımı artsa bile kas, beyin, karaciğer, kalp gibi dokularda taurin miktarı değişmemektedir ¹³⁸.

Taurinin, kalpte insülin reseptörleri ile etkileşerek glükoz ve glikojen metabolizmasını değiştirdiği gösterilmiştir ^{137,139}.

Tablo 3. Taurinin çeşitli sistemlere etkisi

Kardiyovasküler sistem	-Antiaritmik -Düşük Ca^{+2} düzeylerinde pozitif inotropik -Yüksek Ca^{+2} düzeylerinde negatif inotropik -Dijital pozitif inotropisinin güçlendirilmesi -Kalsiyum paradoksunun antagonizması -Hipotansif etki (merkezi ve periferel) -Aşırı Ca^{+2} yükü kardiyomyopatisinde koruyucu -Agregre trombosit direncini artırma
Beyin	-Antikonvülzan -Nöronal uyarılabilirliğin korunması -Serebellar fonksiyonların korunması -Kimyasal uyaranlara karşı savunma -Termoregülasyon -Antiagresif etki -Kardiorespiratuar cevapların merkezi düzenlenmesi -Öğrenme -Motor davranış değişikliği -Uyku süresini değiştirme -Antitremor etki -Yeme ve içmenin baskılanması -Anoksi ve hipoksiye direnç
Retina	-Fotoreseptör dış segment ve tapetum lusidumun yapı ve fonksiyonlarının korunması
Karaciğer	-Safr tuzu sentezi
Üreme sistemi	-Sperm motilite faktörü
Kas	-Membran stabilizasyonu
Genel	-Nörotransmitter ve hormon salınımının düzenlenmesi -Osmoregülasyon -Glikoliz ve glikoneogenezin stimülasyonu -Hiperkolesteroleminin azaltılması -Hücre proliferasyonu ve yaşayabilirliği -Antioksidan -Fosforilasyonun düzenlenmesi -Ksenobiotiklerin konjugasyonu

Taurin aynı zamanda insanlar için tek üriner aminoasittir. Çünkü sulfonik amino asitlerin % 99'u geri emilirken, taurinin % 90-95'i geri emilmemektedir ¹³⁸.

Taurinin yarılanma ömrü serbest diyetle, visseral organlarda 8.7 ± 2 gün, taurinden zengin diyetle 4.8 ± 2 gün, rat için 12- 13 gündür ¹³³.

Yapılan araştırmalara göre anne sütünü de içine alan birkaç vücut sıvısında taurin önemli miktarlarda bulunmaktadır. Tersine bazı hazır besinlerde, inek sütünde çok az ya da hiç yoktur ¹³⁷.

Okisidanların sıklıkla oluştuğu bir doku olan retina da taurin bol miktarda bulunmaktadır ¹⁴⁰. Retinal rod dış segmentlerinin membranları doymamış yağ asitlerinden zengin ve peroksidatif hasara karşı korumasızdır. Taurin rod dış segmentlerinin fonksiyonları üzerine koruyucu etki gösterir ¹⁴¹.

Taurin; trombositlerde, sekretuar yapılarda, özellikle uyarılabilen dokularda ve sıklıkla oksidatif hasara maruz kalan dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Ancak plazma düşük miktarlarda taurin içermektedir (Tablo 4) ¹³⁸. Ayrıca yenidoğan sıçanlarda kalbin taurin içeriği yüksektir ve yaşamın ilk beş gününde hızla azalır ¹³³.

Tablo 4. Çeşitli dokulardaki taurin konsantrasyonu (mM/kg doku).

Kalp	30	Mide	9
Akciğer	13	Timus	11
Karaciğer	2	Serebellum	3
Böbrek	11	Pons	4
Dalak	16	Orta beyin	3
İncebarsak	15	Frontal korteks	6
Kalınbarsak	12	Spinal kord	4
Kas	15		

2.8.2. Taurinin Genel Etkileri

2.8.2.1. Taurinin Membran Stabilize Edici Fonksiyonu

Taurinin membran stabilize edici fonksiyonu aşağıdaki altı örnekte incelenebilir:

- 1) Hayes ve ark. taurin eksikliği olan kedilerde fotoreseptör hücrelerinde bozukluklar olduğunu göstermiştir.
- 2) Kurbağa retinasında oksidanlara karşı koruyucu olduğu bildirilmektedir.
- 3) Tavşan spermatozoalarında lipit peroksidasyonunu önleyerek antioksidan özellik gösterir.
- 4) Karbontetraklorüre karşı karaciğer hücrelerini koruyucu etkisi vardır.
- 5) Taurinin iskelet kası harabiyetine karşı eksternal koruyucu bir ajan olduğu ileri sürülmektedir.
- 6) Taurinin membran stabilize edici fonksiyonu lenfoblastik hücre kültürlerinde çalışılmış ve bu hücreleri demir-askorbat ile oluşturulan hasardan koruduğu gösterilmiştir ¹³³.

Taurin membran stabilize edici fonksiyonunu; amin grubu ile zararlı ajanlarla reaksiyona girip, bunları detoksifiye ederek ve hücre harabiyet ve ölüme neden olan iyon ve su geçirgenliğinin direkt etkilerini önleyerek gerçekleştirir ^{133,134}.

2.8.2.2. Taurinin Hücre Ca^{+2} Homeostasisi Üzerine Etkisi

Taurin Ca^{+2} modülatör etkisini, Ca^{+2} a hassas olan sistemlere Ca^{+2} sağlanmasındaki değişimlerle veya Ca^{+2} a olan hassasiyeti değiştirerek gösterir. Sinyal şiddeti değiştikçe sitozolik Ca^{+2} miktarında da değişiklikler oluşur. Cevabın şiddetinin değişikliği ise Ca^{+2} bağlayan troponin, kalmodulin, Ca^{+2} bağlayan miyozin ATPaz ve diğer Ca^{+2} bağımlı ATPaz'ların afinitesinin değişmesine neden olur ¹⁰¹. Taurin, sarkoplazmik retikulum, mitokondri ve diğer organellerin Ca^{+2} depolama kapasitesini arttırır ve Ca^{+2} a bağımlı ATPaz pompalarının pompalama hızını stimüle ederek Ca^{+2} un veziküllere depolanma kapasitesini ve pompanın turnover hızını artırır ¹³⁴.

Taurinin iskelet kasında da Ca^{+2} akışının regülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir ¹³⁴. Bu membran stabilize edici etkisi, sarkoplazmik retikulumu denervasyona bağlı hasardan korur ve sarkoplazmik

retikulumun Ca^{+2} -ATPaz aktivitesini hızlandırarak, Ca^{+2} transport kaybı hızını azaltır ^{138,142}.

2.8.2.3. Taurinin Lipit Metabolizması Üzerine Etkisi

Taurinin önemli fizyolojik rollerinden biri fosfolipit metabolizması üzerindeki modülatör etkisidir. Sebring ve Huxtable (1986) taurinin primer etkileşiminin nötral fosfolipitlerle olduğunu bildirmişlerdir ¹⁴³.

Taurinin, protein kinaz C aktivasyonu için gerekli diaçilgliserol miktarını etkileyerek; bu reaksiyonun diğer ürünü olan IP3 ve intrasellüler Ca^{+2} salınımını kontrol edebildiği de bildirilmektedir ¹⁴³.

Taurinin etkilediği diğer bir fosfolipit metabolizması ise fosfatidiletanolaminin metilasyonu reaksiyonudur. Taurin kimyasal yapısı itibarıyla, fosfatidiletanolaminin yüklü baş gruplarına benzer ve bundan dolayı seçilen katabolik bölgeye bağlanabilir. Bu da metilasyon reaksiyonunu kompetitif inhibisyonla sonuçlandırır. Yani taurin sarkolemmal fosfolipit metiltransferaz enzim aktivitesini inhibe eder. Fosfatidiletanolamini, fosfatidilkoline çeviren bu enzim Na^{+} - Ca^{+2} alış veriş sisteminden etkilenir. Böylece taurin, bu metilasyon reaksiyonunu inhibe ederek Na^{+} - Ca^{+2} alış veriş sisteminin aktivitesini korur ^{133,144}. Fosfatidiletanolaminin membrana Ca^{+2} bağlanmasında etkili fosfolipitlerden biridir. Taurinin azalması halinde bu fosfolipitin de azalması ile nöronal membranda destabilizasyon meydana gelebileceği ileri sürülmektedir ¹⁴⁵.

2.8.2.4. Taurinin Antiosidan Özelliği

Taurinin in vivo ve/veya in vitro şartlarda antioksidan olarak davrandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır ^{133,141,146}.

Taurin ve öncüllerinin özellikle oksidatif hasara maruz kalan dokularda bol bulunduğu dikkat çekicidir. Taurin ve hipotaurin dişilerde folliküller ve uterus, erkek üreme sisteminde ise spermatozoa, özellikle semen sıvısı ve prostatta yüksek konsantrasyonlarda bulunur ^{147,148,149}. Memeli spermi glutatyon redüktaz ve katalazdan yoksundur. Oysa spermde taurin ve hipotaurin oldukça yüksek düzeydedir. Bilindiği gibi süperoksit sperm için oldukça toksiktir, lipit peroksidasyonuna ve motilite azalmasına yol açar. Böylece taurin ve hipotaurin aracılığıyla sperm motilitesi korunmuş olmaktadır. Hatta taurin ve hipotaurin farelerde "sperm motilize edici faktör" olarak kabul edilmektedir ¹⁴¹. Diğer taraftan taurin insan akrozomlarında bulunan majör amino asitlerden biridir ^{141,147}.

Taurinin, retina rod dış segmentlerini aydınlatma yolu ile oluşan oksidanlara karşı koruduğu tespit edilmiştir ^{134,150}.

Güçlü bir oksidan olan hipokloröz asit (HOCl), nötrofillerin aktiviteleri sırasında salgıladıkları myeloperoksidaz enziminin katalizlemesiyle, klor iyonu (Cl^-) ve H_2O_2 'den oluşmaktadır ^{133,134,150}. HOCl ise karbohidratlar, amino asitler, nükleik asitler, peptit zincirleri gibi biyolojik olarak önemli substratları direkt okside edebilme özelliğindedir. HOCl, primer aminlerle reaksiyona girerek kloraminleri oluşturur. Bu reaktif aminlerden biri de taurindir. 1 mol HOCl anyonu ile 1 mol taurin reaksiyona girerek, taurinin amin grubunun 1 veya 2 Cl^- iyonu kazanmasıyla, N-klorotaurini oluşturur. Bu bileşiğin yarılanma ömrü 2.5 gündür ^{133,134}.

HOCl özellikle aminlerle ($-\text{NH}_2$) ve sülfür içeren ($\text{R}-\text{SH}$) moleküllerle çok hızlı reaksiyona girmektedir. HOCl'in hedef hücre membranındaki zararlı etkisi; membranın $-\text{SH}$ veya $-\text{NH}_2$ gruplarına hücum etmesi ile ortaya çıkmakta, sonuçta bu olayı membranın denatürasyonu izlemektedir. Thomas ve ark. (1984) N-Klorotaurinin ekstrasellüler ortamdan anyon transport sistemi ile eritrosit içine transport edildiğini göstermişlerdir. N-Klorotaurin eritrosit içinde glutatyon ile indirgenir ^{150,151}.

Taurinin HOCl ile oluşturulan korneal hasarın iyileştirilmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler taurinin biyolojik sistemlerde HOCl temizleyicisi olduğunu desteklemektedir ^{134,151}.

Taurinin, hipoksi ve reoksijenasyonda serbest radikallere karşı kalp kasını ve beyini koruduğu ileri sürülmektedir ¹⁵². Bu etki taurinin intrasellüler rollerinden biri olarak, membran lipit peroksidasyonunu engellemesi ile ortaya çıkar ^{153,154}. Hipoksi ve reperfüzyonda beyinde, tiyol içeren amino asitlerin ve sistein ve sisteamin gibi aminlerin artışı sonucu taurinin de arttığı gösterilmektedir. Reperfüzyondan sonra bu maddelerin oksijenden türeyen serbest radikallerle okside olarak taurinin oluşturduğu tespit edilmiştir ¹⁵⁵. Taurin, postiskemik dokuda sadece serbest radikal düzeylerini azaltmakla kalmayıp; aynı zamanda hücreye Ca^{+2} girişini engelleyerek, lipit peroksidasyon oluşumunu ve membran fonksiyonlarının bozulmasını da engellemektedir ^{133,155}.

Taurinin CCl_4 ile indüklenmiş karaciğer ve karaciğer mikrozomlarındaki MDA yapımını azalttığı, pnömotoksik maddelere bağlı sekonder olarak akciğerde gelişen lipit peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir ¹⁴¹. Ayrıca taurin, doksorubisin gibi antikanser ilaçların kalpte lipit peroksidasyonunu artırıcı etkilerini önlemektedir ¹⁵⁶.

Ayrıca taurinin yanı sıra onun metabolik öncüleri olan sisteik asit, sistein sülfonik asit ve sisteaminin de in vivo antioksidan olarak rol aldığı ve oksijen radikal türlerini inaktive ettiği gösterilmiştir ¹⁵⁷.

Sonuç olarak; taurinin biyolojik sistemler üzerindeki antioksidan ve membran stabilizatör etkisi aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 1)** Taurin HOCl ile reaksiyona girerek HOCl'i temizler. Böylece membran denatürasyonunu önler ¹⁵⁰.
- 2)** Membran stabilize edici etkisi ile membranı permeabilite ve transport değişikliklerine karşı korur ^{150,158}.
- 3)** Direkt antioksidan etkisi ile, membran fosfolipitleri ile etkileşerek, lipid peroksidasyonunu engeller ¹⁵⁸. Lipid peroksidasyonunun son ürünü ve göstergesi olan MDA düzeyini azaltır ^{134,138,159}.
- 4)** Taurinin aynı zamanda sulfonik asit grubuyla, serbest metal iyonları ve oksidan metallerle bağlanarak indirekt bir antioksidan etki de yaratabildiği bildirilmektedir ¹⁵⁹.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda erkek, 2,5-3 aylık Swiss albino erkek fareler kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan tüm fareler, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (GÜDAM) bünyesinde, normal musluk suyu ve standart fare yemi ile serbest olarak beslendi. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 12.12.2006 tarihli ve 06.075 nolu kararı ile kabul edilmiştir. Karar örneği ektedir.

3.1.2. Kullanılan Aletler

- Homojenizatör (Virtis-Virtishear, The virtis Company, INC. USA)
- Hassas terazi (Schimadzu, Libror AEG 220)
- Santrifüj (Damon IEC, B-20A Hermle Z 323 K, soğutmalı Germany)
- Spektrofotometre (Schimadzu UV 1601)
- Vortex (Heidolph Reax 2000)
- Benmari (Heto Maxi-Shake)
- Derin dondurucu (Sanyo CFC Free Japan)
- pH-metre (Nel Elektronik) (Nel)
- Santrifüj (Hermle Z 380 K)
- Evaporatör
- Soxhlet Apereyi

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hidroklorik asit, asetik asit, fosforik asit, amonyum sülfat, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaOH, EDTA, etanol, metafosforik asit, n- butanol, KHCO_3 , KOH, TBA (Tiyobarbitürik asit), KCl, tetraetoksipropan, kloroform, ksantin, ksantin oksidaz, NBT, Na_2CO_3 , BSA, CuCl_2 , DTNB, KI, Na-K tartarat, CuSO_4 , Folin ciocalteu.

Kullanılan kekik türü (Thymus sipyleus Boiss. subsp. sipyleus var. sipyleus) çiçeklenme döneminde, Ankara Ayaş Karayolları mevkiinden toplanmıştır.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Fareler, Tablo 5' de gösterildiği şekilde altı gruba ayrıldı.

Tablo 5. Çalışma grupları ve özellikleri

No.	Grup	Uygulama	Denek Sayısı
1	Kontrol (sağlıklı)	Serum Fizyolojik	6
2	Kontrol (tümörlü)	Serum Fizyolojik	6
3	Deney (tümörlü)	Kekik (Koruma)	6
4	Deney (tümörlü)	Kekik (Tedavi)	6
5	Deney (tümörlü)	Taurin (Koruma)	6
6	Deney (tümörlü)	Taurin (Tedavi)	6

Enjektör yardımıyla donör farenin periton boşluğundan, Erlich ascites tümörü hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı alınarak, deney grubu farelerine subkutan yolla 0,5 ml enjekte edildi ve katı tümör oluşumu sağlandı. Bir fareye yaklaşık olarak $1,5 \times 10^5$ tümör hücresi transplante edildi.

Thymus sipyleus Boiss. subsp. sipyleus var. sipyleus (kekik türü) metanol ekstraktı, Soxhlet apareyi ekstraksiyonu (sıcakta) ile hazırlandı. Hazırlanan ekstraktın metanolü evaporatör ile uçurularak uygulamaya hazır hale getirildi.

Grup 1 (Kontrol grubu) : Kanseri oluşturulmayan ve sadece bazal diyetle beslenen grup. Serum fizyolojik farelere, 0,5 ml olarak 1. günden itibaren 17 gün süreyle intraperitoneal olarak enjekte edildi. Grup 18. gün feda edildi.

Grup 2 (Tümör - Kontrol grubu) : Subkutan bölgeden 0,5 ml Ehrlich ascites tümörü enjeksiyonu yapıldı ve 1. günden itibaren 17 gün süreyle farelere 0,5 ml serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edildi. Denekler, 18. gün feda edildiler.

Grup 3 (Kekik – Koruma grubu) : Ehrlich ascites tümörü ile subkutan bölgeden enjeksiyon yapıldı ve 1. günden itibaren 17 gün süreyle farelere 200 mg / kg / gün kekik ekstraktı intraperitoneal olarak enjekte edildi. Denekler, 18. gün feda edildiler.

Grup 4 (Kekik – Tedavi grubu) : Erlich asit tümörü ile subkutan bölgeden enjeksiyon yapıldı ve tümör gelişimiyle birlikte 11. günden itibaren 7 gün süreyle farelere 200 mg / kg / gün kekik ekstraktı intraperitoneal olarak enjekte edildi. Denekler, 18. gün feda edildiler.

Grup 5 (Taurin – Koruma grubu) : Erlich asit tümörü ile subkutan bölgeden enjeksiyon yapıldı ve 1. günden itibaren 17 gün süreyle farelere 200 mg / kg / gün taurin 0,5 ml serum fizyolojik ile çözülerek, intraperitoneal olarak enjekte edildi. Denekler, 18. gün feda edildiler.

Grup 6 (Taurin Tedavi grubu) : Erlich asit tümörü ile subkutan bölgeden enjeksiyon yapıldı ve tümör gelişimiyle birlikte 11. günden itibaren 7 gün süreyle farelere 200 mg / kg / gün taurin 0,5 ml serum fizyolojik ile çözülerek, intraperitoneal olarak enjekte edildi. Denekler, 18. gün feda edildiler.

Böbrek dokuları çıkartıldı, serum fizyolojik içinde yıkandı ve alüminyum folyolara sarılarak, sıvı azotta dondurulup analiz süresine kadar -80⁰ C’ de saklandı.

3.2.2. Metodların Uygulanması

3.2.2.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeyinin Ölçülmesi

Uchiyama ve Mihara'nın MDA çalışma yöntemi esas alınarak uygulandı ¹⁶⁰. Bu yöntem lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehidin TBA ile oluşturduğu kompleksin spektrofotometrik olarak 520 ve 535 nm’de tespiti esasına dayanan bir yöntemdir.

Reaktifler

- Homojenizasyon çözeltisi: % 1,15 KCl çözeltisi
- Tiyoobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: % 0,6 (w/v)
- % 1’ lik fosforik asit çözeltisi
- n-Butanol
- Standart: Tetraetoksipropan

Deneyin Yapılışı

Homojenat çözeltisi olarak hazırlanan % 1,15’ lik KCl kullanılarak buzlu su banyosu içinde % 10’ luk doku homojenatları hazırlandı. Bu homojenatın 0,5 ml’ si santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 3 ml

%1' lik fosforik asit ve % 0,6' lık TBA çözeltisi ilave edildi. Karıştırılmanın ardından kaynamakta olan su banyosunda 45 dakika bekletildi. Soğutma işleminden sonra 4 ml n-butanol ilave edilerek santrifüj yoluyla ayrılan butanol fazın 520 ve 535 nm' de absorbans değerleri elde edildi. Standart olarak tetraetoksipropan kullanıldı.

Hesaplama

Optik dansite farkı esas alınarak sonuçlar, nmol/g doku olarak hesaplandı.

3.2.2.2. Böbrek Dokusu SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

Doku SOD aktivitesinin ölçümünde, Sun' ın yöntemi kullanılmıştır¹⁶¹. Yöntemin temeli, ksantin, ksantin oksidaz ile reaksiyona girip oksijen oluşturmaya, oluşan oksijenin NBT ile renkli bir bileşik meydana getirmesi ve bu rengin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır. Dokuda, SOD aktivitesi ne kadar çok ise SOD dokudan o oranda oksijeni ortadan kaldırır. Bu açıdan numune tüpündeki SOD ne kadar fazla ise, tüpte oluşan renk o oranda açık olur.

Reaktifler

- Kloroform
- Etanol
- Ksantin: 3 mmol/l, 6-7 damla 2,5 N NaOH eklenir.
- EDTA: 0,6 mmol/l
- NBT: 150 µmol/l
- Na₂CO₃: 400 mmol/l
- BSA: 1g/l
- CuCl₂: 0,8 mmol/l
- Ksantin Oksidaz: 16,66 Ü/ml' lik aktiviteye sahip çözeltiden 20µ alınır, üzerine 2 ml, 2M (NH₄)₂SO₄ eklenir.
- Reaktif Karışımı : 4 ml ksantin + 36 ml distile su, 20 ml EDTA, 20 ml NBT, 12 ml Na₂CO₃ ve 6 ml BSA.

Deneyin Yapılışı :

Doku örnekleri, 900 ml distile su ile eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenat 5000 g (7000 rpm)' de, +4 °C' de, 30 dakika santrifüj edilmiştir. Alınan süpernatant, 1/1 (hacim/hacim) olacak şekilde, kloroform/etanol karışımı ile seyreltilerek, tekrar 5000 g' de, +4 °C' de, 2 saat santrifüj edilmiştir. Her bir numune tüpüne, 2900 ml reaktif karışımı, 50 µl ksantin oksidaz eklenmiştir. Tüpler benmaride 25 °C' de 20 dakika inkübe edildikten sonra, her bir tüpe 1 ml CuCl₂ eklenmiş, 560 nm' de distile suya karşı absorbans ölçülmüştür.

Hesaplama :

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Kör \text{ Absorbansı} - \text{Numune Absorbansı}) / Kör \text{ Absorbansı}] \times 100$$

Hesaplama, 1 ünitelik aktivitenin, % 50 inhibisyon yaptığı düşünülerek yapılmıştır. Aktivite, Lowry yöntemiyle elde edilen proteine göre ünite / mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.3. Böbrek Dokusu Glutasyon Düzeyinin Ölçülmesi

Doku glutasyonunun ölçümü, Ellman'ın yöntemiyle yapıldı¹⁶². Bu yöntem, hafif alkali ortamda, 5,5' ditiyobis 2-nitrobenzoik asidin (DTNB, Ellman reaktifi), dokudaki alifatik tiyol bileşikleriyle reaksiyonu sonucu her molekül tiyol başına oluşan, p-nitrofenol anyonunun miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Reaktifler

- Metafosforik asit: 0,5 M
- Fosfat tamponu: 1M, pH: 8,0
- Ellman reaktifi: DTNB: 160 µM ve KHCO₃: 319 µM, pH: 8,0 olacak şekilde KOH ile ayarlandı.

Deneyin Yapılışı

Böbrek örnekleri, 1/5 ağırlık/hacim (w/v) olacak şekilde metafosforik asitle seyreltilip, homojenize edildi. Homojenatlar, 3500 rpm' de, 10 dakika santrifüj edildi. Her bir numune tüpüne, 0,2 ml süpernatant, 0,1 ml distile su, 0,3 ml fosfat tamponu, 2,4 ml Ellman reaktifi konularak karıştırıldı, 410 nm' de kör tüpüne karşı, absorbans ölçüldü.

Hesaplama

$\Delta A = \Sigma \times \Delta c \times l$ eşitliğinde, p-nitro fenolat için $\Sigma = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değeri ve Lowry yöntemi ile bulunan mg protein değeri kullanılarak, glutasyon miktarı $\mu\text{mol GSH/mg protein}$ olarak hesaplandı.

3.2.2.4. Böbrek Dokusu AOPP Düzeyinin Ölçülmesi

Doku AOPP (Advanced oxidation protein products) düzeyleri Witko-Sarsat¹⁶³ ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre tayin edildi.

Böbrek doku örneklerinde AOPP düzeyleri ölçüleceği zaman dokular derin dondurucudan çıkartıldı ve 1/5 oranında 20 mM Tris-HCl (pH=7,4) tamponunda, buz içinde, soğukta homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 5000 g' de 10 dakika +4°C' de santrifüj edildi. Süpernatant 1/5 oranında 20 mM (pH=7,4) fosfat tamponu ile sulandırıldıktan sonra deneyde kullanıldı.

Alınan 400 μl homojenata, 1600 μl fosfat tamponu, 100 μl potasyum iyodür konarak 2 dakika oda ısısında bekletildi. Kör olarak da 2000 μl fosfat tamponu üzerine 100 μl potasyum iyodür konarak bekletildi. Son olarak 200 μl asetik asit eklenerek köre karşı 340 nm de okundu.

Kullanılan Reaktifler :

- 20 mM Fosfat tampon ($\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$; pH= 7,4).
- 1,16 M Potasyum iyodür (KI); distile su içerisinde hazırlandı.
- Asetik asit (AA)

Hesaplama :

AOPP için 340 nm' de molar absorpsiyon katsayısı $261 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Doku protein tayini Lowry metodu¹⁶³ ile BSA standardı kullanılarak tayin edildi.

$$\text{AOPP (nmol/mg protein)} = [(\text{Abs}/261) \times (2,3/0,4)] / \text{protein (mg/ml)}$$

3.2.2.5. Lowry Protein Tayini

Doku protein düzeyleri, sığır serum albumini (BSA)' nin standart olarak kullanıldığı Lowry yöntemine göre ölçüldü¹⁶⁴. Deney alkali ortamda bivalent bakırın (Cu^{2+}), peptit bağı tarafından, Cu^{1+} forma dönüştürülmesi, Cu^{1+} , tirozin, sistein ve triptofan radikallerinin fenolik folin

reaktifi ile kompleks oluşturarak, stabil olmayan indirgenmiş molibdenum/tungsten mavisini oluşturması prensibine dayanır.

Reaktifler

- % 2' lik Na_2CO_3 içinde 0,1 N' lik NaOH (A)
- %2' lik Na-K tartarat (B1)
- %1' lik CuSO_4 (B2)
- Folin ciocalteu's fenol reaktifi

C Reaktifi = 33 ml (A) + 1 ml (B1) + 1 ml (B2) karışımı olarak hazırlandı.
Standart olarak 1 mg/ml sıgır serum albumini (BSA) kullanıldı

Deneyin Yapılışı

Her bir numune tüpüne 10 µl süpernatant, 90 µl distile su, 2 ml alkali reaktifi eklenip, karıştırıldı. Tüpler oda ısısında, karanlıkta 15 dakika inkübe edildikten sonra, 0,2 ml Folin Ciocalteu's fenol reaktifi eklenip, karıştırıldı. Tüpler oda ısısında, karanlıkta 1 saat inkübe edildi. 750 nm' de köre karşı absorbans ölçüldü. BSA' nın ölçülen absorbansı, standart olarak kullanıldı.

Hesaplama

Protein Miktarı = (Numune abs. / Standart abs.) x Standart Konsant.

Sonuçlar mg/ml cinsinden verilir.

3.2.2.6. Sonuçların Analizi

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi "SPSS for Windows 10.0" (Statistical Program for Social Sciences) paket programı kullanıldı. Bütün sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edildi. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, Ehrlich asit tümörü enjekte edilmiş farelerde, koruma - tedavi amaçlı olarak kekik ve taurin uygulamalarından sonra böbrek dokusunda oksidan stresin göstergesi olarak MDA düzeyleri, SOD aktivitesi, antioksidan fonksiyon göstergesi olarak GSH düzeyleri, protein oksidasyonunun belirteci olarak da AOPP düzeyleri incelendi.

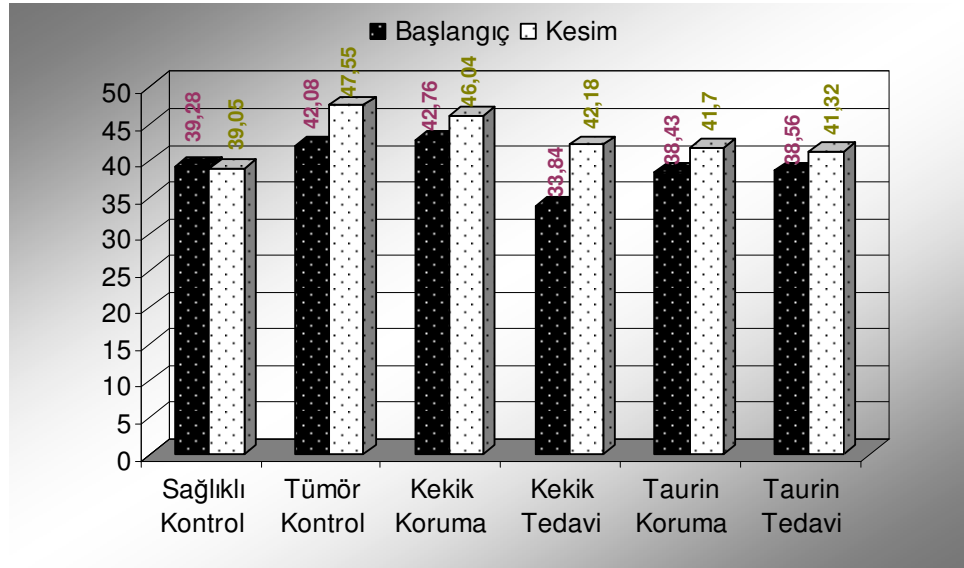
Tüm gruplara ait malondialdehit düzeyi (MDA) nmol / g doku, süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD) ünite / mg protein, glutatyon düzeyi (GSH) μ mol GSH / mg protein, doku ileri protein oksidasyon düzeyleri (AOPP) nmol / mg protein olarak hesaplanmıştır.

Tablo 6. Tüm gruplara ait istatistiksel sonuçlar (ortalama $\pm$ standart sapma)

<u>Gruplar</u>	<u>MDA</u> (nmol/g doku)	<u>SOD</u> (Ü/mg protein)	<u>GSH</u> (μ molGSH/mg)	<u>AOPP</u> (nmol/mg pro.)
<u>Sağlıklı Kontrol</u>	33,50 $\pm$ 11,42	10,59 $\pm$ 0,94	0,012 $\pm$ 0,004	187,67 $\pm$ 28,82
<u>Tümör Kontrol</u>	34,17 $\pm$ 13,09	8,83 $\pm$ 1,76	0,011 $\pm$ 0,004	203,06 $\pm$ 25,98
<u>Kekik (koruma)</u>	22,00 $\pm$ 7,52	11,04 $\pm$ 3,82	0,009 $\pm$ 0,004	204,55 $\pm$ 60,94
<u>Kekik (tedavi)</u>	34,20 $\pm$ 16,16	8,71 $\pm$ 1,92	0,011 $\pm$ 0,003	205,67 $\pm$ 23,66
<u>Taurin (koruma)</u>	16,17 $\pm$ 5,91	19,13 $\pm$ 2,11	0,009 $\pm$ 0,008	181,73 $\pm$ 37,25
<u>Taurin (tedavi)</u>	35,20 $\pm$ 21,97	59,44 $\pm$ 10,91	0,011 $\pm$ 0,004	245,15 $\pm$ 33,85

Tablo 7. Tüm gruplara ait ağırlık istatistikleri

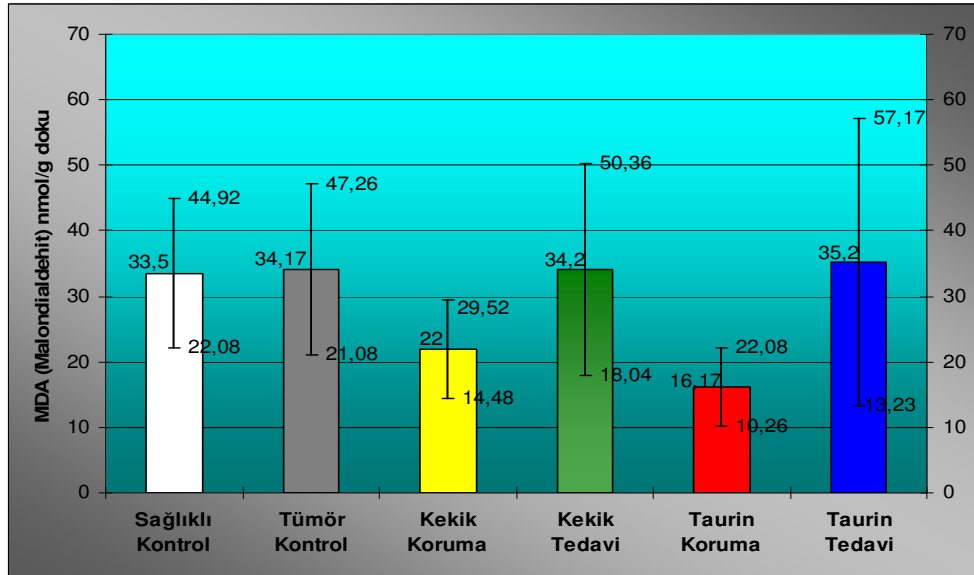
<u>Gruplar</u>	<u>Başlangıç</u>	<u>Kesim</u>
<u>Sağlıklı Kontrol</u>	39,28 $\pm$ 3,07	39,05 $\pm$ 2,37
<u>Tümör Kontrol</u>	42,08 $\pm$ 1,25	47,55 $\pm$ 3,81
<u>Kekik Koruma</u>	42,76 $\pm$ 3,97	46,04 $\pm$ 9,15
<u>Kekik Tedavi</u>	33,84 $\pm$ 2,07	42,18 $\pm$ 7,89
<u>Taurin Koruma</u>	38,43 $\pm$ 6,07	41,70 $\pm$ 5,49
<u>Taurin Tedavi</u>	38,56 $\pm$ 2,56	41,32 $\pm$ 2,34



Grafik 1. Tüm gruplara ait ağırlık istatistikleri

Tüm grup ağırlıkları, çalışma öncesi ve çalışma sonrası olarak değerlendirildiğinde, sağlıklı kontrol haricinde, her grup içerisinde belirgin bir artış görüldü. İstatistiksel değerlendirme yapıldığında da, tümör kontrol ve kekik tedavi gruplarında anlamlı bir artış bulundu ($p<0,05$).

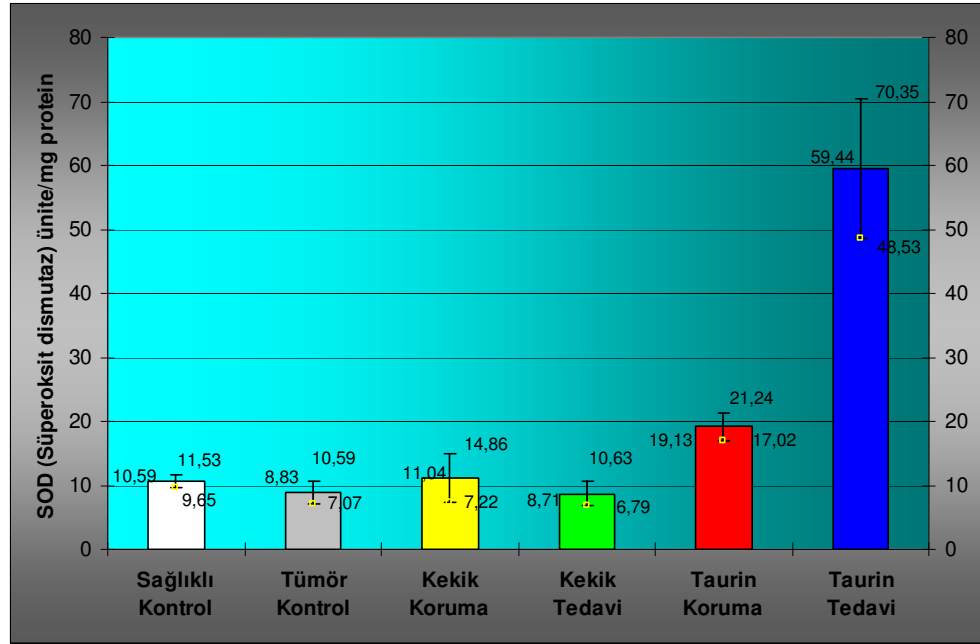
4.1. Böbrek Dokusu MDA Sonuçları



Grafik 2. Tüm gruplara ait böbrek dokusu MDA ortalamaları (nmol/g dokü)

Sağlıklı ve tümör kontrol grupları MDA düzeyleri karşılaştırıldığında belirgin bir değişiklik görülmemiştir. Taurin koruma ($p=0,006$) ve kekik koruma grupları ($p=0,045$), tümör kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, böbrek MDA düzeyleri arasında anlamlı bir azalma bulundu ($p<0,05$). Taurin tedavi grubu ($p=0,855$) ve kekik tedavi grubu ($p=0,714$), tümör kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise böbrek MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

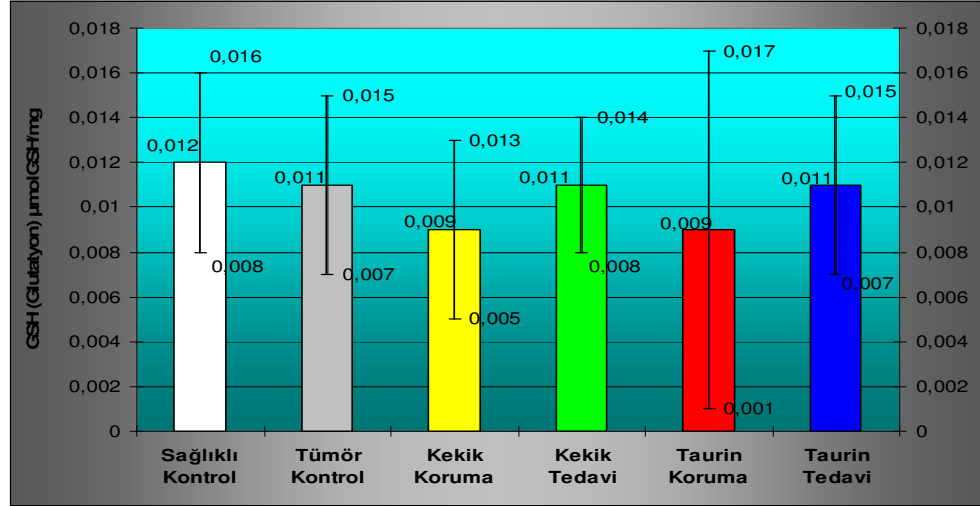
4.2. Böbrek Dokusu SOD Aktivitesi Sonuçları



Grafik 3. Tüm gruplara ait böbrek dokusu SOD ortalamaları (ünite/mg protein)

Sağlıklı ve tümör kontrol grupları SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında, tümör kontrol grubunun SOD aktivitesinin, anlamlı olmasada ($p=0,078$), sağlıklı kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Taurin koruma ($p=0,004$) ve tedavi gruplarının ($p=0,006$), tümör kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, böbrek SOD aktivite düzeyleri arasında anlamlı bir artış bulundu ($p<0,05$). Kekik tedavi ($p=0,715$) ve koruma gruplarının ($p=0,273$), tümör kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise böbrek SOD aktivite düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

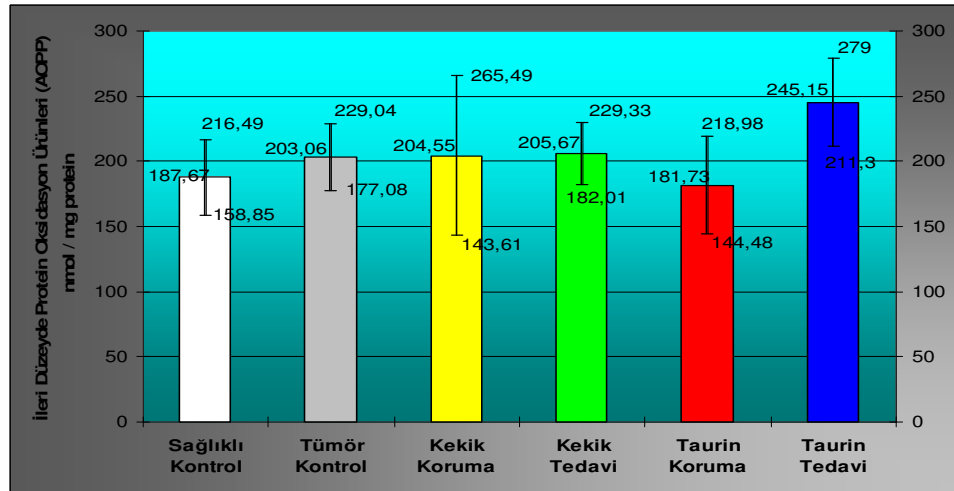
4.3. Böbrek Dokusu Glutasyon Sonuçları



Grafik 4. Tüm gruplara ait böbrek dokusu GSH ortalamaları ($\mu\text{mol} / \text{mg}$ protein)

Sağlıklı kontrol ve tümör kontrol gruplarının GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, anlamlı olmasada ($p>0,05$), tümör kontrol grubu GSH düzeyinde belirgin bir azalma görülmüştür ($p=0,337$). Tüm deney grupları, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında GSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Ancak Taurin tedavi grubu ve kekik tedavi gruplarının GSH düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu GSH düzeyleri seviyesinde olduğu görüldü.

4.4. Böbrek Dokusu AOPP Sonuçları



Grafik 5. Tüm gruplara ait böbrek dokusu AOPP ortalamaları (nmol/mg protein)

Sağlıklı kontrol ve tümör kontrol AOPP seviyeleri karşılaştırıldığında ($p>0,05$), tümör kontrol grubu AOPP düzeyinin belirgin bir şekilde arttığı görüldü ($p=0,262$). Taurin tedavi grubunun ($p=0,045$) kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, böbrek AOPP düzeyleri arasında anlamlı bir artış bulundu ($p<0,05$). Taurin koruma grubunun ($p=0,522$), tümör kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir azalma olmamasına karşın belirgin bir fark görüldü.

5. TARTIŞMA

Kanser nedenleri arasında lipit peroksidasyonunun düşünölmeye başlanması; çalışmaları çeşitli besinsel antioksidanların kanser oluşumu üzerine etkilerini araştırmaya yöneltmiştir¹⁶⁵. Antioksidanların karsinogenezin başlama ve gelişme dönemini inhibe ettikleri, hücre ölümü ve transformasyonunu önledikleri bulunmuştur¹⁶⁶.

Sebze, meyve ve şıfalı bitkiler, antioksidan etkiye sahip fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler vs.), nitrojen bileşikler (alkaloidler, aminler vs.) vitaminler, terpenoidler gibi birçok serbest radikal temizleyiciyi içerirler. Doğal antioksidanların alımı kanser, kardiovasküler hastalıklar, diabet ve yaşa bağlı diğer hastalıkları azalttığı savunulmaktadır. Ancak bu alanda hala çelişkili düşünceler vardır. Halen birçok kanserin tedavisini sağlayacak çok sayıda ilaç mevcut değildir, üstelik, çoğu kanserin tedavisi de oldukça pahalıdır. Yıllardır bitkilerin antitümör aktiviteleri araştırılmakta ve şıfalı bitkilerden izole edilen birçok doğal bileşim yeni antikanser ilaçların kaynağı olarak kullanılmaktadır¹⁶⁷. Deneysel çalışmalar gibi klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda da singlet oksijen (O_2^1), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi reaktif oksijen metabolitlerinin kanser etyolojisinindeki rolünü desteklediği gösterilmiştir. ROS'un mutageniz, sitotoksik ve gen ekspresyonundaki değişiklikler ile sonuçlanacak çok miktarda hücre ve moleküler etkileri mevcuttur¹⁶⁸.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile reaksiyonu sonucu ortaya çıkan lipit peroksidasyonunun son ürünü mutlak bir aldehit olan MDA, lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile çapraz bağlanmaya neden olmaktadır¹⁶⁸. Lipit peroksidasyonu; kanser, ateroskleroz, romatoid artrit, inflamasyon, reperfüzyon hasarı, diabetus mellitus ve lupus gibi bir grup hastalığın oluşumuna sebep olur¹⁷¹. Lipit peroksidasyonunun ikincil ürünü olan MDA, doku zincir reaksiyonlarının hız belirleyicisidir. Lipit peroksidasyon ürünlerinin DNA hasarına yol açtığı belirlenmiştir. Lipit hidroperoksitler direkt olarak DNA zincir kırılmasını yol açarken, lipit peroksil ve alkoksil radikalleri DNA' da baz oksidasyonuna neden olur. İn vivo olarak peroksit ve hidroperoksitlerin tümör ilerletici etki gösterdikleri ispatlanmıştır. Ayrıca lipit peroksidasyonunun prokarsinogenleri son karsinogene çevirmede indirekt rol alabileceği gösterilmiştir. Portakal ve ark.¹⁷², yaptıkları çalışmada meme kanserli dokunun MDA düzeylerini, çevre normal dokuya göre yüksek olarak bulmuşlar ve bu yüksekliğinde nekroz varlığında yetersiz kanlanma sonucunda ortaya çıktığını düşünmüşlerdir.

Doğal meydana gelmiş bazı antioksidanlar, antioksidan enzimleri etkiler ve serbest radikallerin neden olduğu zarara karşı koruma sağlar. Taurin, intraselüler önemli bir serbest β -amino asittir ki bir

antioksidan ve bir zar-stabilize ajanı olarak bilinir. Taurinin memeli hücrelerin, özellikle beyincik, retina ve böbrek hücrelerinin gelişimi ve hayatta kalması için gerekli olduğu görülmüştür. Son çalışmalar göstermiştir ki taurin ve taurin taşıyıcı böbrek gelişimde önemli bir rol oynar ^{173,174}. Taurin, patolojik durumları akla getiren çeşitli serbest radikallerden korumada umut vaat etmiştir ^{175,176}. Taurin, ilaçların neden olduğu zararlara karşı koruyucu bir etkiye sahip olabilir denilmiştir ¹⁷⁷. Taurin, nefrotoksikliğe neden olan antikanser ilaçlarını hafiflettiği ve tübüler atropi ve apoptozisden renal tübüler hücreleri koruduğu bildirilmiştir ^{178,179}.

Biyolojik sistemlerde antioksidan olarak rol alan taurin, bu etkisini iyon membranlarını stabilize ederek, reaktif oksijen türlerini engelleyerek ve membrandaki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu azaltarak gösterir ¹⁸². Diyetle taurin eklenmesi kan şekeri düzeylerini düşürerek hiperinsülinemiyi ve lipid peroksidasyonunu azaltır ¹⁸³.

Taurinin diğer dokularda ve iskelet kasında fonksiyonu ve etki mekanizması benzer olup membran stabilizasyonu ve Ca^{+2} modülasyonu yaparak; dolayısıyla hücre zarlarının Ca^{+2} a karşı geçirgenliğini sınırlandırarak; sitozolik Ca^{+2} un sarkoplazmik retikulumu pompalanma kapasitesini artırarak etki yapar ^{17,21,175,191}. Taurin bu özelliklerinden dolayı artmış Ca^{+2} a bağlı lipid peroksidasyon sentezinin ve dolayısıyla oksijen radikallerinin sınırlandırılmasında da bir antioksidan olarak görev yapar ^{133,151,155,158,184,185,186}.

Taurinin peroksidatif hasara maruz kalan dokularda antioksidan özellik gösterip, lipid peroksidasyonunu azalttığı bilinmektedir ¹⁸⁷. Taurin eksikliğinde belirgin MDA artışı meydana geldiği gösterilmiştir ²².

Yaptığımız çalışmada grup 1 (sağlıklı kontrol grubu), grup 2 (tümör kontrol grubu), grup 3 (koruma amaçlı kekik verilen grup) ve grup 4 (tedavi amaçlı kekik verilen grup), grup 5 (koruma amaçlı taurin verilen grup), grup 6 (tedavi amaçlı taurin verilen grup) arasında MDA düzeylerindeki değişimlere baktık. Kontrollü gruplar arasında belirgin bir değişiklik görülmezken, grup 3 ve grup 5 MDA düzeylerinin tümör kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu tespit ettik ($p<0.05$). Grup 4 ve grup 6' nın MDA düzeyleri tümör kontrol grubu MDA düzeylerine çok yakın bulundu. Tümör kontrol grubuna göre, grup 3' te MDA düzeylerindeki anlamlı bir azalma, kekiğin etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu önlediği şeklinde yorumlanabilir. Grup 5 MDA düzeylerinin tümör kontrol grubu değerlerinden daha düşük olması taurinin etkisiyle oksidatif stresin azalmasından dolayıdır. Koruma amaçlı verilen kekik ve taurin çalışmamızda böbrek MDA düzeyine etkinliği açıkça görülmüştür.

Heena ve ark.¹⁸¹, göğüs kanseri tedavisinde kullanılan bir ilaç olan Tamoxifen (TAM)' in nefrotoksik etkisi sonucu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların tüketilmesine karşı, taurinin hafifletici etkisini araştırmışlardır. TAM tedavisinin, kontrol grubuna kıyasla böbrek doku MDA' larında belirgin bir artışa neden olduğunu, ayrıca taurin öncü-tedavisinin, TAM verilen grupla kıyaslandığında, böbreklerde MDA düzeylerinde belirgin bir azalma olduğunu tespit ettiler. Taurin-öncü tedavisinin böbrek MDA düzeylerindeki azalmaya etkisi çalışmamızdaki sonucu desteklemektedir.

Böbrek dokusu, aşırı oksijen metabolitlerin oluşturduğu zararı önleyen antioksidanlara sahiptir. Bu antioksidanlar, hem peroksitleri ayrıştırma ile hem de serbest radikalleri yakalama ile harekete geçer. SOD, hücreleri süperoksit radikallerinin toksik etkisine karşı korur^{189,190}.

SOD süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden antioksidan bir metalloproteinazdır. Mn-SOD mitokondri matriksinde lokalizedir. Mn-SOD, hücrel metabolizmanın ürünü olan ve yüksek reaktif bir oksidan olan O₂ 'in hücrel konsantrasyonunun düzenlenmesinde ve oksidatif hücre hasarına karşı korumada rol alır. Birçok tümör hücresinde Mn-SOD ekspresyonunun düşük olduğu gösterilmiştir. Mn-SOD' ın insan melanoma hücrelerinde meme kanser hücrelerinde ve glioma hücrelerindeki overekspresyonu, tümör oluşumunu baskılayan tümör süpresör gen olabileceğini düşündürmüştür¹⁹¹.

Yaptığımız çalışmada grup 1 (sağlıklı kontrol grubu), grup 2 (tümör kontrol grubu), grup 3 (koruma amaçlı kekik verilen grup) ve grup 4 (tedavi amaçlı kekik verilen grup), grup 5 (koruma amaçlı taurin verilen grup), grup 6 (tedavi amaçlı taurin verilen grup) arasında SOD aktivitesindeki değişimlere baktık. Sağlıklı kontrol ve tümör kontrol karşılaştırılmasında beklendiği gibi, tümör kontrol grubunda belirgin bir aktivite kaybı görülmüştür. Grup 5 ve grup 6' nın SOD aktivitelerinin kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğunu tespit ettik (p<0.05). Grup 3 ve grup 4' ün SOD aktivitelerinde, kontrol gruplarının SOD aktivitelerine kıyasla anlamlı bir artış bulunamadı (p>0,05). Buna göre kekiğin böbrek SOD aktivasyonunda herhangi etkinliğine rastlanılmadı.

Heena ve ark.¹⁸¹, yaptıkları çalışmada Tamoxifen (TAM)' in verilmesi, fare böbreğinde SOD' un aşırı kullanımına neden olmuş oksijen radikalini çok geniş miktarlarda üreterek mitokondri zarlarını etkilemiştir. Hücre içindeki ROS (O₂⁻, H₂O₂)' un aşırı hızlı dönüşümü, meydana gelen türleri tespit etmeyi zorlaştırabilmektedir. Mitokondriyel solunum zinciri, süperoksit radikallerinin üretimi için esas yordur¹⁹². TAM tedavili hayvanlarda renal dokuda azaltılmış SOD ve CAT aktivitesinin nedeni

olarak, artmış olan oksidatif strese karşı, bu enzimlerin aşırı tüketiminin bir sonucu olarak gösterilebilir. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında da, böbrek SOD aktivasyonundaki artış, taurin koruma ve tedavi gruplarında anlamlı olarak görülmektedir.

Pushpakiran ve ark., sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, taurinin etanol ile artan oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak, 28 gün boyunca verilen taurinin karaciğer, plazma, beyin, böbrek ve kalp dokusunda TBARS düzeylerini düşürdüğünü ve kontrol değerlerine yaklaştırdığını saptamışlardır. Buna karşılık etanole bağlı olarak azalan antioksidan SOD, CAT ve GPx aktivitelerini ise artırdığını tespit etmişlerdir ¹⁸⁰.

Hücrelerde GSH yüksek konsantrasyonlarda bulunur, reaktif oksijen ürünlerine ve toksinlere karşı koruyucudur. Hücrelerin redoks durumu glutatyonun redükte halde korunmasına bağlıdır ^{169,170,193}.

GSH, hücrelerde en çok bulunan enzimatik olmayan antioksidandır ki hücre yaralanmasının neden olduğu oksidatif strese karşı savunmada kritik bir rol oynar. GSH seviyesinin azalması, hastalık gelişimine etki edebilir ¹⁸⁸. GSH'ın bitirilmesi, hücreleri oksidatif strese daha fazla maruz bırakan GPx' in inhibe edilmesine neden olur. GSH, ROS' a karşı hücreleri koruyan önemli bir antioksidandır. Aynı zamanda hücrelerin detoksifikasyonunu sağlayan çok önemli bir unsurdur.

Yaptığımız çalışmada grup 1 (sağlıklı kontrol grubu), grup 2 (tümör kontrol grubu), grup 3 (koruma amaçlı kekik verilen grup) ve grup 4 (tedavi amaçlı kekik verilen grup), grup 5 (koruma amaçlı taurin verilen grup), grup 6 (tedavi amaçlı taurin verilen grup) arasında GSH seviyelerindeki değişimlere baktık. Gruplar arasında anlamlı farklar görülmesede, tümör kontrol grubu GSH düzeyinde bir azalma görüldü. Grup 4 ve grup 6 GSH seviyeleri kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olmamasına karşın, aynı seviyelerde kaldığı görüldü. Buna göre kekik ve taurinin tedavi amaçlı kullanımının anlamlı olmasada, GSH düzeyini yüksek tutmaya çalıştığı söylenebilir.

Heena ve ark. ¹⁸¹, yaptıkları çalışmada, TAM tedavisinin, böbrekteki GSH ($p<0,001$) ve T-SH ($p<0,01$) içeriğinde belirgin bir azalmaya neden olduğunu saptadılar. Taurin+TAM tedavili grubun, TAM tedavili grupla kıyaslandığında, böbrekteki GSH ($p<0,01$) ve T-SH ($p<0,05$) aktivitelerinde belirgin bir artış olduğu görüldü. Taurin tedavili grupta, kontrol grubu ile kıyaslandığında enzimatik olmayan antioksidanların değerlerinde belirgin bir fark gözlenmedi. Taurin tedavili grupta da, kontrol grubuyla kıyaslandığında belirgin bir fark gözlenmedi. Taurin + TAM tedavili grup, TAM tedavili grupla kıyaslandığında böbrekteki GST ($p<0,01$), GPx ($p<0,01$), GR ($p<0,001$) aktivitelerinde belirgin bir artış

gösterdi. Taurin tedavisi, oksidatif yaralanmaya karşı koruma sağlarken TAM tedavisi, oksidatif doku zararına sebep olur. Bu zarar, böbrekte azaltılmış GSH ve T-SH seviyeleriyle tespit edilir. Hücrelerin ROS' a karşı daha hassas olabileceği önerilirken, TAM tarafından desteklenen GSH seviyelerindeki belirgin azalma, hücresel redoks durumunda bir değişikliği işaret eder ve antioksidan enzim savunma sisteminin etkinliğinin azalmasına yol açar. TAM' a maruz bırakma glutasyon redoks sistemine zarar verir. Glutasyon redoks sistemi bir cephe hattı gibi hücresel savunma sistemi olduğundan, GSH' ı metabolize eden enzimlerin aktivitesindeki herhangi bir değişiklik, hücrelerin bütünlüğünün ve onların çeşitli elemanlarının bozulmasına yol açar ¹⁹⁷. Yaptığımız çalışmada Ehrlich asit tümörü ile böbrekte oluşan hasar sonucu GSH düzeyindeki azalma, bu çalışmadaki TAM' ın neden olduğu GSH düzeyindeki azalmaya kıyasla daha düşük seviyede kalmıştır. Buna göre de taurin tedavisinin bu çalışmadaki etkinliği, böbrek GSH seviyesinde belirgin olarak anlamlı bulunmuştur. TAM' ın etkin olarak stres oluşturduğu bilinmektedir.

Azaltılmış taurin ile öncü-tedavi uygulanması ve PC içeriği, tükenmiş enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları onarır. Bu sonuçlar açıkça oksidatif stresin rolünü gösterir ve farede TAM' ın neden olduğu nefrotoksikliğe karşı taurinin koruyucu bir etkisini gösterir ¹⁸¹.

Taurin ile protein oksidasyonu aracılığıyla oksidatif zararın hafifletilmesi, böbrekte hücresel proteinlerin yıkımını ve zar geçirgenlik kaybını önler ¹⁸¹.

Yaptığımız çalışmada grup 1 (sağlıklı kontrol grubu), grup 2 (tümör kontrol grubu), grup 3 (koruma amaçlı kekik verilen grup) ve grup 4 (tedavi amaçlı kekik verilen grup), grup 5 (koruma amaçlı taurin verilen grup), grup 6 (tedavi amaçlı taurin verilen grup) arasında AOPP seviyelerindeki değişimlere baktık. Tümör kontrol grubunda beklediği gibi, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla AOPP seviyesi artmış bulundu. Diğer tüm deney gruplarında anlamlı bir sonuç bulunamadı.

Heena ve Ark. ¹⁸¹, TAM' ın kontrol grubuna göre farenin böbreğindeki PC içeriğini belirgin bir şekilde ($p<0,001$) artırdığını tespit ettiler. Taurin (100 mg/kg vücut ağırlığı) tedavisinin, kontrol grubu ile kıyaslandığında PC içeriğini değiştirmedeği görülmüş. Taurin ile beraber TAM verilmiş farede, PC içeriğinin, sadece TAM verilmiş fareye göre belirgin bir şekilde ($p<0,05$) daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda Ehrlich asit tümörünün meydana getirdiği protein oksidasyonuna kekik ve taurinin etkinliği görülmedi. Bu çalışmada TAM' ın meydana getirdiği protein hasarına karşı taurin tedavisi anlamlı olarak protein hasarını azaltıcı yönde etki etmiştir. Çünkü TAM, belirgin bir şekilde protein oksidasyonunu azaltmıştır ve taurin etkisi anlamlı bulunmuştur.

Gelişen tümör boyutlarına baktığımızda; gruplar arasında belirgin farklılıklar görülmemekle birlikte, kekik uygulanan gruplarda, tümör kontrol grubuna kıyasla küçülme görülmüştür. Gruplardaki ağırlıkların, başlangıç ağırlıklarına göre artış sebebinin, tümör boyutuyla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen bulgular göstermiştir ki; böbrek dokusunda MDA düzeyindeki azalma ve SOD aktivitesindeki artış, koruma amaçlı verilen taurin grubunda anlamlı olarak görülmüştür. Tedavi amaçlı verilen taurin de SOD aktivitesinde anlamlı bir artış meydana getirmiştir. AOPP düzeyi taurin ve kekik grubunda değişiklik oluşturmasada kontrol seviyesinde kalmıştır. GSH düzeyi, gruplarda herhangi bir farklılıkta ortaya çıkmamıştır. Çalışmada kullanılan kekiğin ancak koruma amaçlı kullanıldığında, MDA düzeyini azaltmakta etkili olabileceği düşünülmektedir.

7. ÖZET

Farelerde Ehrlich Asit Solid Tümör Modelinde Thymus Sipyleus ve Taurinin, Böbrek MDA, Glutasyon, AOPP düzeylerine ve SOD Aktivitesine Etkileri

Bu çalışmada kekik ve taurinin, koruma ve tedavi amaçlı oluşturulmuş fare gruplarında, böbrek malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon (GSH) ve oksidatif protein hasarı (AOPP) üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır

Çalışma için, 2,5-3 aylık Swiss albino erkek fareler seçilerek, her grupta 6 fare olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Grup-1; sağlıklı kontrol, grup-2; tümör kontrol, grup-3; kekik koruma, grup-4; kekik tedavi, grup-5; taurin koruma, grup-6; taurin tedavi grubu olarak ayrılmıştır.

Kekik ve taurin koruma grupları ile kontrol grupları arasında, böbrek MDA düzeyleri bakımından anlamlı farklar bulundu ($p<0,05$). Buna karşın bütün grupların GSH düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). SOD aktivasyonu, yalnızca taurin tedavisi uygulanan gruplarda etkin iken ($p<0,05$), kekik tedavisi uygulanan gruplarda herhangi bir etki görülmedi ($p>0,05$). AOPP düzeyi tüm gruplar içerisinde anlamlı bir düşüş göstermezken, sadece taurin koruma grubunda azalma meydana gelmiştir.

Sonuç olarak tümör oluşturulan farelerde oksidatif stres artmış, böbrek dokusunda serbest radikaller artarken antioksidan savunmanın azaldığı gözlemlenmiştir. Eksojen olarak taurin verilmesinin serbest radikal artışını önlerken, antioksidan savunmayı da artırdığı gözlemlenmiştir. Eksojen taurinin MDA düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü, SOD aktivitesini anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir. Kekik tedavisinin de böbrek dokusunda yalnızca MDA düzeyine etkin olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Taurin, kekik, serbest radikaller, antioksidanlar, oksidatif stres.

8. SUMMARY

The Effects of Thymus Sipyleus and Taurine on Kidney MDA, Glutathione, AOPP Levels and SOD Activity in Mice Ehrlich Ascites Solid Tumor Model

The present study was aimed to investigate the effects of taurine and thyme on kidney malondialdehyde (MDA) superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and advanced oxidation protein products (AOPP) in tumor injected mice constituted with the purpose of protection and treatment.

Study was conducted in Swiss albino male mice 2,5-3 months old. Animals were divided into 6 groups and each group consisted of 6 animals. Group-1 as healthy control group, group-2 as tumor control group, group-3 as thyme protective group, group-4 as thyme treatment group, group-5 as taurine protective group, group-6 as taurine treatment group.

There were significant differences on kidney MDA levels between the control groups and the taurine protective as well as the thyme protective groups ($p < 0,05$). However, there was not any significant difference between GSH levels among all the groups ($p > 0,05$). While SOD activity was effective only in the taurine-treatment group ($p < 0,05$), no influence was observed in the thyme treatment groups ($p > 0,05$). While AOPP levels did not show any significant decrease among all the groups, but a significant decrease was observed only in the taurine protective group.

In conclusion, a decrease in the antioxidant defenses was observed in kidney tissue of tumor-exposed animals, while the free radicals were increased. The exogenously administered taurine inhibited free radical increase, therefore it reinforced antioxidant defenses. It was determined that exogenously administered taurine significantly decreased MDA levels and significantly increased SOD activity. It was observed that thyme treatment was effective only on MDA levels in the kidney tissue.

Key words : Taurine, thyme, free radicals, antioxidants, oxidative stress.

9. KAYNAKLAR

1. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. CA Cancer J Clin. 2001; 51:15-36.
2. Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. Lancet. 1995; 346: 883-887.
3. Abdullaev FI. Plant-driven agents against cancer. In: Gupta SK, editor. Pharmacology and therapeutics in the new millennium. New Delhi: Narosa Publising House; 2001. p 345-54.
4. DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. Fundam Clin Pharmacol 2003; 17: 405-17.
5. Takeoka GR, Dao LT. Antioxidant constituent of almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] hulls. J Agric Food Chem 2003; 51: 496-501.
6. Kirtikar KR, Basu BD. Indian medicinal plants. Vol 2, 2nd ed. Dehradun, India: Bishen Singh Mahendra Pal Singh; 1975. p. 842–844.
7. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simoncic, M., Knez, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry. 89: 191-198.
8. Rice-Avans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. Free Radical Research. 22 (4): 375-383.
9. Pekkarinan, S.S., Heinonen I.M., Hopia, A.I. 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+) – catechin as antioxidants in methyl linoleate. J. Sci. Food Agric. 79: 499-506.
10. Burda, S., Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 2774-2779.
11. Akgül, A., Ayar, A. 1993. Yerli baharatların antioksidan etkileri. Doğa-TR. J. of Agriculture and Forestry. 17: 1061-1068.
12. Javanmardi, J., Stushnoff, C., Lücke, E., Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Acimum* Accessions. Food Chemistry. 83:547-550.
13. Başer, K.H.C. 2001. Her derde deva bir bitki kekik. Bilim ve Teknik. Mayıs. 74-77.

14. Botsoglou, N.A., Grigoropoulou, S.H., Bostoglou, E., Govaris, A., Papgeorgiou, G. 2003b. The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*. 65: 1193-1200.
15. Chesney R.W.: Taurine: Its biological role and clinical implications, *Adv Pediatr.*,1985; 32, 1-42
16. Wright C.E., Tallan H.H., Lin Y.Y.: Taurine biological update, *Ann Rev Biochem.*,1986; 55, 427-453
17. Huxtable R.: Physiological actions of taurine, *Physiol Rev.*,1992; 72(1), 101-163
18. Russel W.C.: Taurine: Its biological role and clinical implications, *Adv Pediatr.*,1985; 32, 1-42
19. Jacobsen J.G., Smith L.H.: Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives, *Physiol Rev.*,1968; 48, 424-451
20. Grisham, M.B., Granger N.: Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Medicine* 1989;10 (1), 71-81
21. Huxtable R.J.: Physiological actions of taurine, *Physiol Rev.*,1992; 72 (1), 101-144
22. Harada H., Cusack B.J., Olson R.D., Stroo W., Azuma J., Hamaguchi T., Schaffer S.W.: Taurine deficiency and doxorubicin: interaction with the cardiac sarcolemmal calcium pump. *Biochemical Pharmacology*, 1990; 39 (4), 745-751
23. Milei J., Ferreira R., Liesuy S., Forcada P., Covarrubias J., Boveris A.: Reduction of reperfusion injury with preoperative rapid intravenous infusion of taurine during myocardial revascularization, *Am Heart Journal*, 1992; 123(2), 339-345
24. Chan D.W.Sell S.: Tumor Markers. In: "Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2th Edition. Ed. Burtis C.A. and Ashwood E.R. W.B. Soundes Company, Philadelphia.: 1994; 897-927.
25. Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L.: Neoplasia Ln: Robbins SI (ed), *Basic Pathology*, WB Saunders – Philadelphia. 1995; 171-216.

26. Surh Y.J.: Molecular Mechanisms of Chemopreventive Effects of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances. *Mutation Res.* 1999; 428: 305-327.
27. Manson M.M., Gecher A., Hudson E.A. and et al.: Blocking and Supressing Mechanisms of Chemoprevention by Dietary Constituents. *Toxiology Letters.* 2000; 112-113: 449-505.
28. Ames B.N., Gold L.S.: Too Many Rodent Carcinogens. *Proc. Natl. Acad Sci.* 1997; 7772-7781.
29. Farber E.: Chemical Carcinogenesis, a Biologic Perspective. *Amer. J. Path.* 1982; 2: 271-296.
30. Handerson B.E., Ross R.K., Pike M.C.: Toward the Primery Prevention of Cancer. *Science.* 1991; 24:1131-1138.
31. Yuspa S.H., Poirier M.C.: Chemical Carcinogenesis: from Animal Models to Molecular Models in One Decade. *Adv. Cancer Res.* 1988; 50: 25-70.
32. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004; 44: 275–295
33. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik gelişim.*1998; 11: 336–341.
34. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 1996; 46:15–32.
35. Sözman EY. Yaşlanma biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sözman ET (editörler). *İnsan Biyokimyası.* 1.Baskı, Ankara: 2002; 667–672.
36. Cheeseman KH. Slater TF. An Introduction to radical biochemistry. *Br. Med. Bull* 1993; 49: 481–493.
37. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik gelişim* 1998; 11: 342 –334.
38. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31:1287–1312
39. Var A. Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda oksidan ve antioksidan sistemlerin incelenmesi. Uzmanlık Tezi Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya bölümü, 1999.

40. McCord J M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108: 652–659.
41. Slater TF. Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury. *Biochem. J.* 1984; 222: 1–15.
42. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305: 761–70.
43. Y.Baykal, F.Kocabalkan. Serbest radikalleri ve hücre hasarı. *Sendrom.* 2000; 9: 31 36.
44. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995: 1-110.
45. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res.* 1996; 25: 57–74.
46. Alderman CJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med.* 2002 Mar 1; 32 5: 377-85.
47. Friedlander MA, Witko-Sarsat V, Nguyen AT, Wu YC, Labrunte M, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. The advanced glycation endproduct pentosidine and monocyte activation in uremia. *Clin Nephrol.* 1996 Jun; 45 6 : 379-82.
48. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003 Dec; 25 3-4: 207-18. Epub 2003 Jul 29.
49. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* 1999; 4: 339–345.
50. Seven A. Candan G. Antioxidan Defense Systems. *Cerrahpaşa J Med.* 1996; 27: 41–50.
51. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003; 189: 41–54.
52. Steinberg D. Is there a potential therapeutic role for vitamin E or other antioxidants in atherosclerosis? *Curr Opin Lipitol.* 2000 Dec; 11 6: 603-7.
53. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 1996; 16: 33-50.

54. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res.* 1999 Jul; 38 4: 309-36.
55. Mendiratta S, Zhi-chao Qu, James M. Enzyme Dependent Ascorbate Recycling in Human Erythrocytes: Role of Thioredoxin Reductase Free Radical Biology and Medicine. 1998 Jul; 25 2: 221-228
56. Gruszecki WI, Strzalka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta.* 2005 May 30; 1740 2: 108-15. Epub 2004 Dec 16.
57. Droge K, Schulze-Osthoff S, Mihm D, Galter H, Schenk HP, Eck S. Roth, Gmunder H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 1994; pp. 1131–1138.
58. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress, *Free Radic. Res.* 1999; pp. 273–300.
59. Haddad JJ, Olver RE, Land SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 2000; pp. 21130–21139.
60. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Permanetter B, Gerlach E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest.* 1991; 100: 176-181
61. Stocker R. Antioxidant Activities of BilePigments. antioxidants & redox signaling. 2004; 6: 5.
62. Aydogan S, Yerer Betül M, Goktas A. Melatonin and nitric oxide Pag.281Journal of Endocrinological InvestigationVol. 29, March 2006 nr. 3
63. Stolc S, Bauer V, benes L, Tichy. 1983 medicine with antiarrhythmic antihypoxic activity and its method of preparation. Patent: CS229067, SWED.8204693-9, BELG.894148, SWISS 671 754, BRD p 3231088, SPAIn 553017, JAP.151 4040.
64. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 4290–4302.

65. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29: 1106–1114.
66. Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys*. 2004; 430: 97–103.
67. Güler N. Meme kanserinde kemoprevansiyon. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 1999; 4: 292–293.
68. Kökoğlu E. Serbest radikal reaksiyonlarının kanserdeki rolü. *Klinik gelişim* 1998; 11: 358– 364.
69. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362: 709– 715.
70. Okada F. Inflammation and free radicals in tumor development and progression. *Redox Rep*. 2002;7: 357–68.
71. Werlen G, Belin D, Conne B, Roche E, Lew DP, Prentki M. Intracellular Ca²⁺ and the regulation of early response gene expression in HL–60 myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*. 1993; 268: 16596–16601.
72. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett*. 1995; 358: 1-3.
73. Uluş NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, Bali M, Stefek M, Stolc S, Gajdosik A, Karasu C. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res*. 2003 Jun; 28 6: 815-23.
74. Loo G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem*. 2003;14: 64–73.
75. Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH: Oxygen Consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am J Physiol* 258: F1354-F1362, 1990.
76. Waz WR, Feld LG: Reactive oxygen molecules in the kidney. *Adv Exp Med Biol* 366:171-183, 1994.
77. Baud L, Ardaillou R: Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* 251: F765-F776, 1986.

78. Baud L, Ardaillou R: Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *British Med Bulletin* 49:621-630,1993.
79. Stratta P, Canavessa C, Dogliani M, Mazzucco G, Manga G, Vercellone A: The role of free radicals in the progression of renal disease. *Am J Kid Diseases* 17 (Supl.1): 33-37, 1991.
80. Andreoli SP: Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatri Nefrol* 5: 733-742,1991.
81. Rovin BH, Wurst E, Kohan DE: Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney Int.* 37:1509-1514,1990.
82. Greene EL, Paller MS: Oxygen free radicals in acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 17: 124-132, 1991.
83. Andreoli SP, McAteer JA. Reactive oxygen molecule-mediated injury in endothelial and renal tubular epithelial cells in vitro. *Kidney. Int* 38: 785-794, 1990.
84. Paller MS, Neumann TV: Reactive oxygen species and renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation *Kidney Int* 40:1041-1049,1991.
85. Boyce NW, Tipping PG, Holdsworth SR: Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 35: 778-782, 1989.
86. Shah SV: Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int.* 35:1093-1106,1989.
87. Rable H, Khoschsorur G, Colombo T, Petritsch P, Rauchenvald M, Költringer P, Tatzber F, Esterbauer H: A multivitamin infusion prevents lipid preoxidation and improves transplantation performance. *Kidney Int.* 45: 912-917, 1993.
88. Johns RJ, Klebanoff SJ, Ochi RF, Adler S, Baker P, Sparks L, Couser WG: Participation of the myeloperoxidase-H₂O₂-halide system in immune complex nephritis. *Kidney Int* 32: 342-349, 1987.
89. Parvez Z, Ruhman M, Moncada R: Contrast media-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Investigative Radiology* 24:697-702, 1989.
90. Kumar V, Robbin S.L: *Robbin's Basic Pathology*, 4. baskı, 1987, S.593-639.

91. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 74:1156-1164, 1984.
92. Bulkley GB. Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function. *Lancet* 344: 934-936, 1994.
93. Thornton MA, Zager RA: Brief intermittent reperfusion during renal ischemia: Effect on adenine nucleotides, oxidant stress, and the severity of renal failure. *J Lab Clin Med* 115: 564-571, 1990.
94. Bulkley GB: Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. *Br J Cancer* 55 (Supl. 8): 66-73, 1987.
95. Arıcıoğlu A, Aydın Selvin, Türközkan N, Durmuş O: The effect of allopurinol on Na⁺ K⁺ ATPase related lipid peroxidation in ischemic and reperfused rabbit kidney. *Gen Pharmac* 25: 341-344, 1994.
96. Augustin AJ, Lutz Jaachim: Intestinal, hepatic and renal production of thiobarbituric acid reactive substances and myeloperoxidase activity after temporary aortic occlusion and reperfusion. *Life Sciences* 49: 961-968, 1991.
97. Durmuş O, Arıcıoğlu A, Güven T, Oğuz M, Yel M, Türközkan N: The effect of allopurinol on the liver ultrastructure, reduced glutathione and lipid peroxide levels during liver ischemia in guinea pigs. *Gen Pharm* 25: 781-786, 1994.
98. Konya L, Bencsath P, Szenasi G, Takacs L, Schaff Z, Vereckel A, Feher J: Effect of free radicals in ischaemic renal failure in the dog. *Acta Physiologica Hungarica* 76: 319-331, 1990.
99. Konya L, Bencsath P, Szenasi G, Feher J: Lack of effect of antioxidant therapy during renal ischemia and reperfusion in dogs. *Experientia* 49:235-237, 1993.
100. Nath KA, Paller MS. Dietary deficiency of antioxidants exacerbates ischemic injury in the rat kidney. *Kidney Int* 38:1109-1117, 1990.
101. Paller MS, Hebbel RP: Ethane production as a measure of lipid peroxidation after renal ischemia. *Am J Physiol* 251: F839-F843, 1986.
102. Kaur A, Sethi AK, Ganguly NK, Majumdar S: Concentration dependent function of superoxide dismutase in oxygen free radicals mediated tissue injury in renal brush border membrane. *Biochemistry International* 19: 385-395, 1989.

103. Baker GL, Corry RJ, Autor AP: Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. *Ann Surg* 202: 628-641, 1985.
104. Greene EL, Paller MS: Xanthine oxidase produces $O_2^{\cdot-}$ in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 263:F251-F255, 1992.
105. Koyama I, Bulkley GB, Williams M, Im MJ: The role of oxygen free radicals in mediating the reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. *Transplantation* 40: 590-595, 1985.
106. Linas SL, Whittenburg D, Pepine JE: Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol* 258:F711-F716, 1990.
107. Rangan U, Bulkley GB: Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *British Med Bulletin* 49: 700-718, 1983.
108. Schiller HJ, Andreoni KA, Bulkley GB: Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. *Klin Wochenschr* 69: 1083-1094, 1991.
109. Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81:22-29, 1981.
110. Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 255:H1269-H1275, 1988.
111. McCord JM: Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine* 17:159-163, 1985.
112. Linas SL, Whittenburg D, Repine JE: O_2 metabolites cause reperfusion injury after short but not prolonged renal ischemia. *Am J Physiol* 253: F685-F691, 1987.
113. McKelvey TG, Hollwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U, Jones HP: Mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol* 254: G753-G760, 1988.
114. Hernandez LA, Grisham MB, Twahig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN: Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 253: H699-H703, 1987.

115. Menger MD, Lehr HA, Messmer K: Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury. *Klin Wochenschr* 69: 1050-1055, 1991.
116. Yoshida N, Granger DN, Anderson DC, Rothlein R, Lane C, Kuiety PR: Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 262: H1891-H1898, 1992.
117. Bulkley GB: Endothelial xanthine oxidase: a radical transducer of inflammatory signals for reticuloendothelial activation. *Br J Surg* 80:684-686, 1993.
118. Linas SL, Whittenburg D, Parsons PE, Repine JE: Mild renal ischemia activates primed neutrophils to cause acute renal failure. *Kidney Int* 42: 610-616, 1992.
119. Schrier RW, Arnold PE, Putten VJV, Burke TJ: Cellular calcium in ischemic acute renal failure: Role of calcium entry blockers. *Kidney Int* 32:313-321, 1987.
120. Karasawa A, Kubo K: Protection by benidipine hydrochloride (KW-3049), a calcium antagonist of ischemic kidney in rats via inhibitions of Ca-overload, ATP-decline and lipid peroxidation. *Japan J Pharmacol* 52: 553-562, 1990.
121. Geeraerts MD, Dupal MFR, Lemasters JJ, Herman B: Cytosolic free Ca^{+2} and proteolysis in lethal oxidative injury in endothelial cells. *Am J Physiol* 261 :C889-C896, 1991.
122. Gower JD, Healing G, Fuller BJ, Simpkin S, Green CJ: Protection against oxidative damage in cold-stored rabbit kidneys by desferoxamine and indomethacin. *Cryobiology* 26:309-317, 1989.
123. Lehr HA, Gohlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K: Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 87: 2036-2041, 1991.
124. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F, Alberini A: Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 53:215S-222S, 1991.
125. Wolgast M, Bayati A, Hellberg O, Kallskog Ö, Mygrenk Öjteg G: Oxygen radicals in postischemic damage in the kidney. *Klin Wochenschr* 69: 1077-1082, 1991.

126. Schoenberg MH, Beger HG: Oxygen radicals in intestinal ischemia reperfusion. *Chem Biol Interactions* 76:141-161,1990.
127. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T: Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney Int* 45:1-9,1994.
128. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh A: Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 125: 97-104, 1993.
129. Cetiner R. Kekik [internette] 2007 [02.12.2007 okundu] elektronik adresi: www.rasimcetiner.com/Bilginotlar/Diger/Kekik.pdf
130. Kekik [internette]. 2007 [02.12.2007 okundu]. elektronik adresi: www.bitkisel-tedavi.com/kekik.htm
131. Benli M., Yigit N. Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (Thymus vulgaris) Bitkisinin Antimikrobiyel Aktivitesi. *Orlab On-Line Mikr. Derg.* [düzenli elektronik dergi]. 2005– Agu [02.12.2007 izlendi]. 3: [8 ekran]. URL adresi: www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050801.pdf
132. Sagdic O. Kekik Mucizesi [internette]. 2005 [02.12.2007 okundu] elektronik adresi: www.habervitrini.com/haber.asp?id=172234
133. Wright C.E., Tallan H.H., Lin Y.Y.: Taurine biological update, *Ann Rev Biochem.*,1986; 55, 427-453
134. Huxtable R.: Physiological actions of taurine, *Physiol Rev.*,1992; 72(1), 101-163
135. Jacobsen J.G., Smith L.H.: Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivates, *Physiol Rev.*,1968; 48, 424-451
136. Gruener R., Markovitz D., Huxtable R., Bressler R.: Excitability modulation by taurine, *J Neurol Sci.*,1975; 24 351-360
137. Chesney R.W.: Taurine: Its biological role and clinical implications, *Adv Pediatr.*, 1985; 32, 1-42
138. Russel W.C.: Taurine: Its biological role and clinical implications, *Adv Pediatr.*, 1985; 32, 1-42
139. Scaffer S.W., Azuma J.: Myocardial physiological effects of taurine and their significance, *Taurine*,1992; 105-120

140. Orr H.T., Cohen A.I., Lowry O.H.: The distribution of taurine in the vertebrate retina, *J Neurochem*, 1976; 26,609-611
141. Huxtable R.J.: Physiological actions of taurine, *Physiol Rev.*, 1992; 72 (1), 101-144
142. Huxtable R., Bressler R.: Effect of taurine on a muscle intracellular membrane, *Biochim Biophys Acta*, 1973; 323, 573-583
143. Schaffer S.W., Azuma J.: Myocardial physiological effect of taurine and their significance, *Taurine*, Lombardini, J.B., 1992; 105-119, Plenum Press, New York 1992.
144. Hamaguchi T., Azuma J., Schaffer S.: Sarcolemmal action of taurine linked to altered phospholipid N- methylation, *Taurine*, Lombardini, J.B., 1992; 121, Plenum Press, New York 1992.
145. Lombardini J.B.: Recent studies on taurine in the central nervous system, *Adv Exp Med Biol.*, 1992; 245-251
146. Grisham, M.B., Granger N.: Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Medicine* 1989; 10 (1), 71-81
147. Meizel S., Lui C.W., Workin, P.K., Mersyn R.J.: Taurine and hypotaurine: Their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm invitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Development, Growth and Differentiation*, 1980; 22(3), 483-494
148. Velazquez A., Delgado N.M., Rasodo A.: Taurine content and amino acid composition of human acrosome, *Life Sci.*, 1986; 38, 991-995
149. Kochakian C.D.: Hypotaurine: regulation of production in seminal vesicles and prostate of guinea-pig by testosterone, *Nature*, 1973; 241, 202-203
150. Nakamari K., Koyama I., Nakamura T., Yoshido T., Umeda M., Inea K.: Effectiveness of taurine in protecting biomembrane against oxidant, *Chem Pharmacol Bull.*, 1990; 38(11), 3116-3119
151. Thomas E.L., Grisham M.B., Melton F.D., Jefferson M.M.: Evidence for a role of taurine in the in vitro oxidative toxicity of neutrophils toward erythrocytes, *J Biol Chem.*, 1985; 260(6), 3321-3329

152. Airaksinen E.M., Paljarvi L., Partanen J., Collan Y., Laakson R., Pentikainen T.: Taurine in normal and diseased human skeletal muscle, *Acta Neurol Scand.*, 1990; 81, 1-7
153. Hochacka R.W.: Defensive strategies against hypoxia and hypothermia, *Science*, 1986; 231, 234-241
154. Tseng M., Liu K., Radthe N.: Facillilated ERG recovery in taurine treated bovine eyes on ex vivo study, *Brain Res.*, 1990; 509, 153- 155
155. Schurr A., Tseng M.T., West C.A., Rigor B.M.: Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: An invitro study, *Life Science*, 1987; 40, 2059-2066
156. Harada H., Cusack B.J., Olson R.D., Stroo W., Azuma J., Hamaguchi T., Schaffer S.W.: Taurine deficiency and doxorubicin: interaction with the cardiac sarcolemmal calcium pump. *Biochemical Pharmacology*, 1990; 39 (4), 745-751
157. Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J.: The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors, *J Biochem.*, 1988; 256, 251-255
158. Banks M.A., Porter D.W., Martin W.G., Castronova V.: Taurine protect against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes, *Taurine Lombardini, J.B.*, 1922; 341-354, Plenum Press, New York
159. Tractman H., Pizzo R.D., Fulter W.S., Levine D., Rao P.S., Valderoma E., Sturman J.: Taurine attenuates renal disease in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy, *Am J Physiol Renal Physiol.*, 1992; 31, F117-F123
160. Uchiyama M., Mihara M.: Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Annals of Biochem.*, 1978; 86, 271- 278
161. Sun Y, Oberley W, Li Y, A sample method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem* 1988, 34:497- 500.
162. Ellman G.L.: Tissue sulfydryl groups, *Arch Biochem Biophys.*, 82, 70-77 (1959)
163. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996 May; 49 5: 1304-13.

164. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Far A.L., Randall R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent, *J Biol Chem.*, 1951; 193, 265-275
165. Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr.* 1992; 12: 139–159.
166. İşcan M, Çoban T. Normal ve neoplastik meme dokusunda antioksidan enzimler. *Klinik Gelişim.*1998; 11: 392–395.
167. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004; 74: 2157– 84.
168. Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, Husain SA. Lipit peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 59: 163–170.
169. DeLeve L., Kaplowitz N.: Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity, *Pharmacol Ther.*, 1991; 52,287-305
170. Pennincks M.: A short review on the role of glutathione in the response of yeast nutritional, environmental and oxidative stresses, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000; 26, 737-742
171. Gonenc A, Ozkan Y, Torun M, Simsek B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *J Clin Pharm Ther.* 2001; 26: 141–144.
172. Portakal O, Ozkaya O, Erden Inal M, Bozan B, Kosan M, Sayek I. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem.* 2000; 33: 279–284.
173. Heller-Stilb B, Van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Haussinger D. Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J* 2002; 16: 231–33.
174. Han X, Budreau AM, Chesney RW. The taurine transporter gene and its role in renal development. *Amino Acids* 2000; 19: 499–507.
175. Waterfield CJ, Mesquita M, Parnham P, Timbrell JA. Cytoprotective effects of taurine in isolated rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 1994; 8: 573–75.

176. Timbrell JA, Seabra V, Waterfield CJ. The *in vivo* and *in vitro* protective properties of taurine. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 453–62.
177. Hamaguchi T, Azuma J, Awata N, Ohta H, Takihara K, Harada H, Kishimoto S, Sperelakis N. Reduction of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by taurine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1988; 59: 21–30.
178. Han X, Chesney RW. Regulation of TauT by cisplatin in LLC-PK1 renal cells. *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 1067–72.
179. Smith KE, Borden LA, Wang CH, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 563–69.
180. Pushpakiran G., Mahalakshmi K., Anuradha C.V.: Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues, *Amino Acids*, 2004; 27(1),91-96
181. Heena T., Suhel P., Hasibur R., Basu D. B., Detlef S. and Sheikh R. et al. Nephrotoxicity and its prevention by taurine in tamoxifen induced oxidative stress in mice. *Human & Experimental Toxicology* 2007; 26: 509–518
182. Banks M.A., Porter D.W., Martin W.G., Castranova V.: Taurine protects against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes. In: Lombardini J.B., Schaffer S.W., Azuma J., Taurine: Nutritional Value and Mechanisms of Action, 1992; 341-59, Plenum Press, New York 1992
183. Singh RP, Banerjee S, Kumar PV, Raveesha KA, Rao AR. *Tinospora cordifolia* induces enzymes of carcinogen/ drug metabolism and antioxidant system, and inhibits lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine* 2006; 13: 74–84.
184. Gordon E.R., Heller R.F.: Taurine protection of lungs in hamster models of oxidant injury: A morphologic time study of paraquat and bleomycin treatment, Taurine, Lombardini J.B., 1992; 319-328, Plenum Press, New York 1992
185. Gordon E.R., Shaked A.A., Salona D.F.: Taurine protects hamster bronchioles from acute NO₂ induced alterations, *Am J Pathol.*, 1986; 125, 585-600
186. Pasantes M.H., Cruz C.: Taurine and hypotaurine inhibit light induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure, *Brain Res.*, 1985; 330, 154-157

187. Ohta H., Azuma J., Awata N., Hamaguchi T., Tanaka Y., Sawamuro A., Kishimoto S., Seperelakis N.: Mechanism of protective action of taurine against isoprenaline induced myocardial damage, *Cardiovascular Research*, 1988; 22, 407-413
188. Brittebo EB, Darnerud PO, Eriksson C, Brandt I. Nephrotoxicity and covalent binding of 1,1- dichloroethylene in buthionine sulfoximine-treated mice. *Arch Toxicol* 1993; 67: 605–12.
189. Fadillioglu E, Erdogan H, Sogut S, Kuku I. Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Appl Toxicol* 2003; 23: 71–74.
190. Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 234–38.
191. Mukhopadhyay S, Das SK, Mukherjee S. Expression of Mn-Superoxide Dismutase Gene in Nontumorigenic and Tumorigenic Human Mammary Epithelial Cells. *J Biomed Biotechnol*. 2004; 2004: 195–202.
192. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 2000; 80: 315–60.
193. Wu G., Fang Y.Z., Yang S.: Glutathione metabolism and its implications for health, *J Nutr.*, Mar, 2004; 134(3), 489-92

10. EKLER

EK-1: Etik Kurulu Kararı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

12/12/2006

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/119-17828
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Nedret KILIÇ
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-06.075 kod numaralı ve "Normal ve Tümör Oluşturulan Farelerde Egzersizin Tümör Oluşumuna Etkisi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-06.075 and entitled "The Effects of Exercise on Tumor Development in Mice" is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

Uz.Vet.Hek.Şeyda DİKER

EK-2: Sertifika

	T.C. GAZİ ÜNİVERSİTESİ KATILIM SERTİFİKASI
Sayın, <i>Hocam Dr. Gökhan ALPŞAN</i>.....	
Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile G.Ü. Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından 20-21-22 Kasım 2006 tarihleri arasında düzenlenen "<i>Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu II</i>"'na katılarak Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu Sertifikayı almaya hak kazanmıştır.	
<i>Gökhan Alpşan</i> Prof. Dr. Gökhan ALPŞAN ETİK KURUL BAŞKANI	<i>Kadri Yamaç</i> Prof. Dr. Kadri YAMAÇ REKTÖR
	<i>Engin Çalgüner</i> Prof. Dr. Engin ÇALGÜNER MERKEZ MÜDÜRÜ

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Salih
Soyadı : Sarı
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara - 09.06.1982

Eğitim - Mezuniyet Yılı

Y.Lisans - 2008 : Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Lisans – 2005 : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyokimya Bölümü

Lise – 1999 : Bursa Erkek Lisesi
Fen Bilimleri

Yabancı dili : İngilizce