

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**GENTAMİSİN İLE SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNDE CYCLOTRİCHİUM NİVEUM
EKSTRESİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Gazihan Harun ÖZSAYIN

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Ata SEÇİLMİŞ

ADANA-2019

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**GENTAMİSİN İLE SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNDE CYCLOTRİCHİUM NİVEUM
EKSTRESİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Gazihan Harun ÖZSAYIN

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Ata SEÇİLMİŞ

ADANA-2019

KABUL VE ONAY

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan “Gentamisin ile Sıçanlarda Oluşturulan Nefrotoksisite Üzerinde Cyclotrichium Niveum Ektresinin Koruyucu Etkisi” adlı çalışma, aşğıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 15/10/2019

TEZ SINAV JÜRİSİ

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süreci boyunca eğitimime değerli fikirleri ve katkılarıyla destek olan, bilimsel yaklaşımı ve yönlendirmeleri ile yoluma ışık tutan, tez konumun belirlenmesinde ve tezimin tamamlanmasında engin bilgisi ve tecrübesiyle emeklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Ata Seçilmiş'e saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Deney çalışmalarında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzman Dr. Özlem Özü ve Sayın Prof. Dr. Eda Kumcu hocalarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim. Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen ve bilimsel bir çalışma ortamı sağlayan Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ergin Şingirik'e en derin saygılarımı sunarım. Ayrıca, Farmakoloji Bölümü'nün değerli öğretim üyelerine ve emektar personellerine teşekkürü bir borç bilirim.

Deney çalışmasında emekleri olan Ç. Ü. T. F. Embriyoloji ve Histoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Sayın Yurdun Kuyucu'ya, Ç. Ü. Eczacılık Fakültesi Dr. Öğretim Üyeleri Sayın Serpil Demirci Kayıran ve Sayın Umay Merve Güven'e, Ç. Ü. Ceyhan Meslek Yüksekokulu Dr. Öğretim Üyesi Sayın Murat Türk'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmamın başından itibaren beni teşvik eden, özveri ve anlayışıyla destek olan sevgili eşim Demet Emre Özsayın'a, biricik kızım Saniye Alina'ya ve teyzem Aysel Emre'ye şükranlarımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Böbrek ve Nefrotoksiste.....	4
2.1.1. Böbreğin Fizyolojisi ve Fonksiyonları.....	11
2.1.3. Nefrotoksisite.....	14
2.1.3.1. Nefrotoksik Böbrek Hasarı.....	15
2.1.3.2. Aminoglikozit Nefrotoksisitesi.....	17
2.1.3.3. Gentamisin Nefrotoksisitesi	21
2.1.4. Böbrek Hasarı Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Belirteçler	25
2.1.4.1. Glomerüler Filtrasyon Hızı.....	26
2.1.4.2. Kan Üre Nitrojeni (BUN)	27
2.1.4.3. Kreatinin	28
2.1.5. Deneyisel Nefrotoksik Akut Böbrek Hasarı Modelleri.....	29
2.2. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	30
2.2.1. Serbest Radikaller	30
2.2.2. Oksidatif Stres.....	32
2.2.3. Antioksidan Sistem ve Antioksidan Maddeler	33
2.2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	35
2.2.3.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar.....	37
2.3. Cyclotrichium Niveum.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42

3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	42
3.1.1. Bitkinin Toplanması.....	42
3.1.2. Etanol Ekstresinin Hazırlanması.....	42
3.1.3. Uçucu Yağ Hazırlanması	43
3.1.4. Su Ekstresinin Hazırlanması.....	44
3.2. Pulegon Formülasyonu Hazırlanması.....	44
3.3. Kromatografik Ayırma ve Tanımlama	44
3.4. Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Analizleri	44
3.4.1. DPPH Yönteminin Uygulanması	45
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması	46
3.6. Kan Örneği ve Böbrek Dokularının Hazırlanması	48
3.7. Biyokimyasal Analiz.....	48
3.8. Histopatolojik İnceleme	48
3.8.1. Işık Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi.....	48
3.9. Deneyde Kullanılan İlaç ve Solüsyonlar.....	49
3.10. Sonuçların İstatistiksel Analizi.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Kromatografik Analiz Sonuçları.....	51
4.2. Antioksidan Aktivite Analizi Sonuçları	53
4.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları.....	56
4.3.1. BUN Sonuçları	56
4.3.2. Kreatinin Sonuçları.....	57
4.3.3. MDA Analizi Sonuçları.....	57
4.4. Histopatolojik İnceleme Sonuçları.....	58
4.4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	58
5.TARTIŞMA	70
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	73
7.KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Nefronun yapısı.....	5
Şekil 2.2. Glomerülün yapısı	6
Şekil 2.3. Nefronun temel fonksiyonları.....	8
Şekil 2.4. Tübüllerde gerçekleşen olaylar.....	9
Şekil 2.5. Cyclotrichium niveum bitkisinin genel görünüşü.....	39
Şekil 3.1. DPPH radikalının yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon.....	45
Şekil 4.1. C. niveumdan elde edilen uçucu yağın GC-MS yöntemiyle analizi sonucunda elde edilen bileşenleri gösteren grafik.....	51
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki askorbik asidin % inhibisyon değerleri.....	53
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki pulegonun % inhibisyon değerleri.....	54
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki su ekstresinin % inhibisyon değerleri.....	54
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki uçucu yağın % inhibisyon değerleri	55
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstresinin % inhibisyon değerleri	55
Şekil 4.7. Gentamisin ve farklı bitki ekstreleri uygulamalarının serum BUN düzeyi üzerindeki etkileri..	57
Şekil 4.8. Gentamisin ve farklı bitki ekstreleri uygulamalarının serum kreatinin düzeyi üzerindeki etkileri	57
Şekil 4.9. Gentamisin ve farklı bitki ekstreleri uygulamalarının MDA düzeyi üzerindeki etkileri	58
Şekil 4.10. Kontrol Grubu	60
Şekil 4.11. Kontrol Grubu	61
Şekil 4.12. Gentamisin Grubu.....	61
Şekil 4.13. Gentamisin Grubu.....	62
Şekil 4.14. Pulegon 50 mg Grubu	63
Şekil 4.15. Pulegon 50 mg Grubu	63
Şekil 4.16. Pulegon 100 mg Grubu	64
Şekil 4.17. Pulegon 100 mg Grubu	65
Şekil 4.18. Su ekstresi Grubu.....	66
Şekil 4.19. Su ekstresi Grubu.....	67
Şekil 4.20. Etanol 200 mg Grubu.....	68
Şekil 4.21. Etanol 200 mg Grubu.....	68
Şekil 4.22. Etanol 400 mg Grubu.....	69
Şekil 4.23. Etanol 400 mg Grubu.....	70

Şekil 4.24. Uçucu yağ 200 mg Grubu	71
Şekil 4.25. Uçucu yağ 200 mg Grubu	71
Şekil 4.26. Uçucu yağ 400 mg Grubu	72
Şekil 4.27. Uçucu yağ 400 mg Grubu	73



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Nefrotoksik ajanlar ve böbrek üzerine etkileri.....	16
Tablo 2.2. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları.....	31
Tablo 2.3. Başlıca enzimatik endojen antioksidanlar.....	35
Tablo 2.4. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	36
Tablo 3.1. Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın miktarı ve verimi.....	43
Tablo 3.2. Işık mikroskopik doku takip işlemi.....	49
Tablo 4.1. C. niveum uçucu yağının GC/MS yöntemiyle analizi sonucunda elde edilen bileşenler....	52
Tablo 4.2. DPPH radikal süpürücü aktiviteleri araştırılan antioksidan bileşiklerin EC 50 değerleri..	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABH	Akut Böbrek Hasarı
ACE	Anjiotensin Converting Enzim
ADH	Antidiüretik Hormon
ATN	Akut Tübüler Nekroz
ATP	Adenozin trifosfat
BUN	Kan Üre Azotu
C. niveum	Cyclotrichium niveum
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
Ca	Kalsiyum
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
CAT	Katalaz
Cl	Klor
dk	Dakika
eV	Elektron volt
g	Gram
GBM	Glomerüler bazal membran
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
GIS	Gastrointesinal Sistem
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon-s-transferaz
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HOCl ⁻	Hipoklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit

i.m.	intramüsküler
i.v.	intravenöz
kg	kilogram
K	Potasyum
K ⁺	Potasyum iyonu
L	Litre
Li	Lityum
LOOH	Lipid hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
mg	miligram
Mg	Magnezyum
Mg ⁺²	Magnezyum iyonu
ml	mililitre
Na	Sodyum
Na ⁺	Sodyum iyonu
NaCl	Sodyum klorür
NH ₂	Amino
NO	Nitrik oksit
nm	Nanometre
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH ⁻	Hidroksil radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
p.o.	Per oral
ROM	Reaktif Oksijen Metabolitleri
Scr	Serum kreatinin
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri

ÖZET

Gentamisin ile Sıçanlarda Oluşturulan Nefrotoksisite Üzerinde Cyclotrichium Niveum Ekstresinin Koruyucu Etkisi

Aminoglikozit grubu bir antibiyotik olan gentamisin, Gram (-) aerobik bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde terapötik öneme sahiptir. Ancak, oksidatif stresle birlikte ortaya çıkan nefrotoksik yan etkisi gentamisin klinik kullanımını sınırlamaktadır.

Bu çalışmada, antioksidan etkisiyle bilinen ve endemik bir bitki olan *Cyclotrichium niveum*'un gentamisinle oluşan nefrotoksisite üzerindeki olası koruyucu etkisi araştırıldı.

İlk olarak, *C. niveum*'un içeriği analiz edildi ve yapılan kromatografik analizde en yüksek orana sahip olarak "pulegon" maddesi bulundu (% 79,6). Daha sonra, bitkinin etanol ekstresi, su ekstresi ve uçucu yağının antioksidan kapasitesi analiz edildi ve *C. niveum*'un hem ekstrelerinin hem de uçucu yağının antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Son olarak, aşağıdaki şekilde dokuz çalışma grubu oluşturuldu: Kontrol, gentamisin (100 mg/kg; im), gentamisin (100 mg/kg; im) + etanol ekstresi (200 mg/kg; po), gentamisin (100 mg/kg; im) + etanol ekstresi (400 mg/kg; po), gentamisin (100 mg/kg; im) + su ekstresi (200 mg/kg; po), gentamisin (100 mg/kg; im) + uçucu yağ (200 mg/kg; po), gentamisin (100 mg/kg; im) + uçucu yağ (400 mg/kg; po), gentamisin (100 mg/kg; im) + pulegon (50 mg/kg; po), gentamisin (100 mg/kg; im) + pulegon (100 mg/kg; po). Bu ekstreler ve ilaçlar 8 gün boyunca sıçanlara uygulandı.

Gentamisin verilen grupta BUN, serum kreatinin ve MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla artış görüldü. Bu artışlar Gentamisin (100 mg/kg; im) + etanol ekstresi (200 mg/kg; po), gentamisin (100 mg/kg; im) + etanol ekstresi (400 mg/kg; po), gentamisin (100 mg/kg; im) + uçucu yağ (200 mg/kg; po) ve gentamisin (100 mg/kg; im) + uçucu yağ (400 mg/kg; po) ile muamele edilen gruplarda tersine çevrildi. Bu bulgular histopatolojik sonuçlarla da desteklendi. Gentamisin (100 mg/kg; im) + pulegon (100 mg/kg; po) verilen grupta, BUN, serum kreatinin ve MDA seviyeleri uçucu yağ grubuna benzer şekilde azaldı. *C. niveum*'un su ekstresinin, gentamisin kaynaklı nefrotoksisite üzerinde önemli bir etkisi olmadı.

Bu bulgular, *C. niveum*'un, gentamisinle oluşturulan nefrotoksisite üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkiden pulegonun sorumlu olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan tedavi, böbrek yetmezliği, cyclotrichium niveum, gentamisin, nefrotoksisite.

ABSTRACT

Protective Effect of *Cyclotrichium Niveum* Extract on Gentamycin-Induced Nephrotoxicity in Rats

Gentamicine, an aminoglycoside antibiotic, has a therapeutic importance in treatment of Gram(-) aerobic bacteria infections. However, clinical use of gentamicine limited by its nephrotoxic side effect which is involved in oxidative stress.

In this study, possible protective effect of *Cyclotrichium niveum*, an endemic plant which is known as an antioxidant, was investigated on the nephrotoxicity induced by gentamicine.

Firstly, content of *C. niveum* was analyzed and rate of pulegone was found highest (% 79,6). Then, antioxidant capacity of ethanol extract, water extract and essential oil of *C. niveum* were analyzed and, it has been found that both the extract and essential oil of *C. niveum* have antioxidant activity. Finally, nine groups were performed according to the following groups: Control, gentamicin (100 mg/kg; im), gentamicin (100 mg/kg; im) + ethanol extract (200 mg/kg; po), gentamicin (100 mg/kg; im) + ethanol extract (400 mg/kg; po), gentamicin (100 mg/kg; im) + water extract (200 mg/kg; po), gentamicin (100 mg/kg; im) + essential oil (200 mg/kg; po), gentamicin (100 mg/kg; im) + essential oil (400 mg/kg; po), gentamicin (100 mg/kg; im) + pulegon (50 mg/kg; po), gentamicin (100 mg/kg; im) + pulegon (100 mg/kg; po). Rats were treated with these drugs and substances for 8 days.

In gentamicin treated group, BUN, serum creatinine and MDA levels were increased when compared with the control. These increases were reversed in groups treated with Gentamicin (100 mg/kg; im) + ethanol extract (200 mg/kg; po), gentamicin (100 mg/kg; im) + ethanol extract (400 mg/kg; po), gentamicin (100 mg/kg; im) + essential oil (200 mg/kg; p.o), gentamicin (100 mg/kg; im) + essential oil (400 mg/kg; p.o). These findings were supported by histopathological results. In gentamicin (100 mg/kg; im) + pulegon (100 mg/kg; po) group, levels of BUN, serum creatinine and MDA levels were decreased similar to those of essential oil groups. Water extract of *C. niveum* had not significant effect on the gentamicin-induced nephrotoxicity.

These findings suggest that, *C. niveum* has a protective effect on nephrotoxicity induced by gentamicin and pulegone may be responsible for this effect.

Key Words: Antioxidant treatment, kidney failure, cyclotrichium niveum, gentamicin, nephrotoxicity.

1. GİRİŞ

Vücut homeostazisinin düzenlenmesinde önemli fonksiyonlara sahip organlar olan böbrekler, yüksek orandaki kan perfüzyonu, metabolik yollardaki etkinlikleri ve ekspresyon fonksiyonları ile ilaçların ve toksinlerin etkilerine oldukça fazla maruz kalabilen, toksik maddeler için hedef organlardır¹. Bu etkilerden dolayı, ilaç tedavisi gören hastaların % 20'den fazlasında ortaya çıkan ilaç toksisitesi akut böbrek hasarı ile sonuçlanabilmektedir².

Akut böbrek hasarı (ABH), böbrek fonksiyonlarının, ani ve kısa süre içinde bozulması sonucunda birçok metabolizma son ürünlerinin vücuttan uzaklaştırılamaması, su ve elektrolit dengesinin aksaması olarak tanımlanmaktadır. Akut böbrek hasarı, hasarın derecesine bağlı olarak tamamen ya da kısmen geri dönüşü olabilen bir durumdur. Altta yatan primer neden ortadan kaldırılmazsa, sürecin uzaması durumunda hasarın geri dönüşü zorlaşabilmektedir³.

Gentamisin, micromonospora purpurea isimli, toprakta ve suda yaşayan gram(+) bir bakteriden izole edilerek elde edilen, aerobik gram(-) bakteri enfeksiyonlarında etkili olan aminoglikozit grubu bir antibiyotiktir. Bakterisit etkili olan gentamisinin klinik kullanımını sınırlayan başlıca yan etkisi böbrekler üzerine toksik etki göstermesidir⁴. İlacın terapötik dozlarda kullanımı bile gerek insan gerekse hayvanlarda % 10-20 oranında nefrotoksositeye neden olmaktadır^{5,6,7,8,9,10,11,12,13}.

Gentamisine bağlı nefrotoksik etkinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, ilacın proksimal tübüllerde birikerek oksidatif strese yol açtığı, apoptoz ve nekrozu indüklediği tespit edilmiştir¹⁴.

Gentamisin, böbreğin proksimal tübüler hücrelerinde birikerek fırçamsı kenar hasarına bağlı nefrotoksosite oluşturmaktadır¹⁵. Böbrekte serbest oksijen radikali oluşumu ve birikimi, antioksidan savunma mekanizmalarının tüketimi, glomerüler konjesyon ve akut tübüler nekroz sonucu kreatinin klirensinde azalma ve renal disfonksiyona sebep olabilmektedir^{7,16}. Gentamisin uygulanmasıyla oluşan nefrotoksitenin ortaya çıkmasına süperoksid anyonlarının birikiminin^{17,18}, lizozomal enzim değişikliklerinin¹⁹ ve intrinsik apoptozis yolağının indüklenmesinin²⁰ aracılık edebileceği ileri sürülmüştür.

Klinikte yaygın olarak kullanılmakta olan gentamisin nefrotoksik etkisini azaltmak/önlemek büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda çeşitli antioksidan maddelerin, gentamisine bağlı tübüler hasarı azalttığı saptanmıştır^{21,22}.

Yapılan bazı çalışmalarda ortaya çıkan bulgular, gentamisin nefrotoksitesinde reaktif oksijen metabolitlerinin rolü olduğunu göstermektedir²³. Mitokondrinin izolasyonu ile yapılan in-vivo çalışmalar Reaktif Oksijen Metabolitleri (ROM) üretiminin gentamisin alımı ile artabilir olduğunu göstermektedir²⁴. Aminoglikozitler, vankomisin ve sisplastin gibi çeşitli nefrotoksik ilaçlara bağlı olarak gelişen böbrek hasar modellerinde serbest oksijen radikallerinin hücre ölümüne neden olabildiği ve nefrotoksik etki oluşumunda oksidatif stresin ön planda olduğu gösterilmiştir^{25,26}. Aynı zamanda, yapılan çalışmalarda antioksidanların kullanımı ile nefrotoksitenin azaldığı gösterilmiştir²⁷. Reaktif oksijen radikallerinin azaltılması ile gentamisin meydana getirdiği renal fonksiyon bozuklukları düzeltilebilmektedir. Süperoksit dismutaz²⁸, desferroksamin¹⁸, poliasorbik asit²⁹, selenyum, melatonin³⁰, tempol³¹, E vitamini³², probukol, askorbik asit gibi antioksidanlar ile gentamisin glomeruler filtrasyon oranında oluşturduğu azalma önlenmektedir.

Bitkisel kaynaklı doğal beslenme ürünleri, antioksidan potansiyelleri ile ön plana çıkmaktadır. Doğal antioksidanların böbrekte hasar önleyici etkileri yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Türkiye’de doğadan toplanıp salatalarda çiğ olarak kullanılan veya bitki çayı olarak tüketilen *Cyclotrichium niveum* (dağ nanesi) bitkisi, antioksidan aktivitesinin yüksek olmasıyla dikkat çekmektedir. Bu bitki ile sıçan ileumunda ve mesanesinde yapılan bir çalışmada, bitkiden elde edilen esansiyel yağın hem antioksidan etkiye hem de mesane düz kaslarında ve ileum çizgili kaslarında gevşemeye yol açtığı görülmüştür³³. *C. niveum* ekstresi ile in vitro yapılan bir diğer çalışmada ise, bitki içeriğinde bulunan total flavonoid konsantrasyonu, total antioksidan aktivitesi, total redüksiyon kapasitesi, hidrojen peroksit temizleyici aktivitesi, radikal temizleyici aktivitesi, süperoksit anyon süpürücü aktivitesi ve anti mikrobiyal aktivitesi test edilmiş ve bitki ekstresinin hem antioksidan hem de antimikrobiyal etkilere sahip olduğu görülmüştür³⁴. Hücre kültürlerinde yapılan bir başka çalışmada ise, adı geçen bitkinin anti kanser özelliklere sahip olduğu kaydedilmiştir³⁵.

Gentamisine bağlı olarak ortaya çıkan nefrotoksisiteyi onlemeye dönük çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında da gentamisin ile deneysel nefrotoksisite oluşturularak, böbrekte oluşan hasarın, *C. niveum* bitkisinin ekstresi ile onlenmesi hedeflenmiştir.

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda antioksidan özelliği gösterilmiş olan *C. niveum* bitkisinin ekstresinin, gentamisinin neden olduğu böbrek hasarı üzerinde, antioksidan etkinliği aracılığıyla koruyucu rolünün olabileceği düşünülerek, ekstrenin ratlarda gentamisin nefrotoksisitesine karşı koruyucu etkisi olup olmadığını belirlemek ve etkin bir tedavi yöntemi oluşturmak amacıyla biyokimyasal ve histopatolojik testler içeren bu tez çalışması yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek ve Nefrotoksisite

Böbrekler, karın arka duvarında, vertebral kolonun her iki tarafında yer alan bir çift organdır. Böbrekler vücut sağlığının devamı için gerekli pek çok işlevin düzenli olarak gerçekleşmesini sağlamaya çalışmaktadırlar. Sıvı ve elektrolit dengesinin sağlanması ve metabolizma artıkları ile toksik maddelerin atılması başlıca görevleridir. Ayrıca elektrolit atılımının düzenlenmesinde ve kırmızı kan hücrelerinin oluşmasında rol oynayan bazı madde ve hormonların sentezini gerçekleştirmektedirler³⁶.

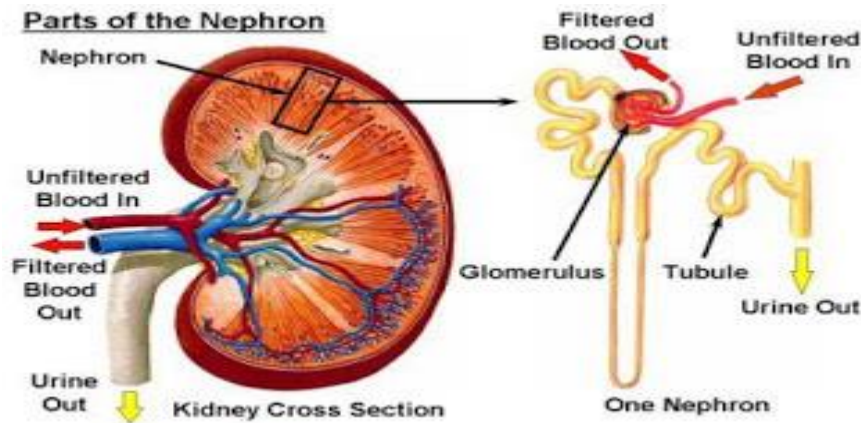
Böbrek hasarı ve nefrotoksisite konularının daha iyi anlaşılabilmesi için böbreğin yapısı ve işlevi hakkında bilgi verilmesi gerekmektedir. Bu amaçla bu bölümde, organizma için önemli fonksiyonları yerine getiren böbreklerin anatomisi, fizyolojisi ve böbrekte hasar oluşumunun mekanizmaları ele alınmıştır.

2.1.1. Böbreğin Fizyolojisi ve Fonksiyonları

Böbrekler, periton zarı arkasında bulunan organlardan olup paravertebral alanda yer almaktadırlar. 12. torakal vertebra ile 2. lomber vertebra arasına yerleşmişlerdir. Karaciğerin pozisyonu nedeniyle sağ böbrek sol böbreğe oranla daha aşağıda bulunmaktadır. Sağ böbreğin boyu sol böbreğe kıyasla daha kısadır. Böbreklerin uzun eksenleri beslenme alışkanlıklarına göre farklılık gösterebilmekle birlikte bu uzunluk 12-14 cm, ortalama ağırlıklarıysa 140-170 g kadardır. Makroskobik olarak incelendiğinde böbreğin en dış kısmında fibröz bir kapsül, kapsülün altında korteks ve en iç kısımda ise medulla, internal pelvis ve kaliksler bulunmaktadır³⁷. İnsanlarda sayıları 10-18 arasında değişen konik veya piramidal şekilli medullar piramitler renal medullayı oluşturmakta ve her bir medullar piramidin alt kısmında kortekse kadar uzanan tübülüs demetleri ve medullar ışınlar çıkmaktadır³⁸.

Böbrekler vücutta kan dolaşımının en çok olduğu organlardandır ve vücut ağırlığının sadece % 0,4'ünü oluşturmalarına rağmen ortalama olarak kalp debisinin % 20'sini almaktadırlar. Dolayısıyla bu organlar, tüm vücuttaki organlar arasında gram doku başına en fazla kanlanan doku olma özelliğine sahiptirler³⁹.

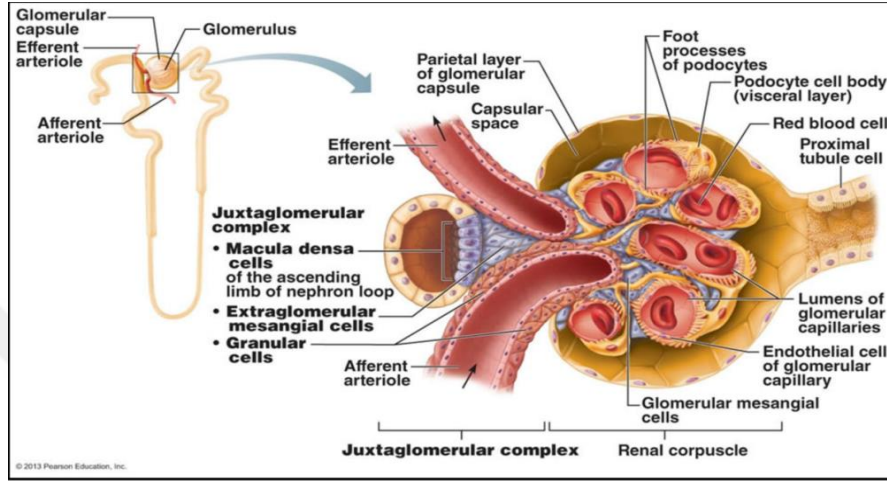
Böbreklerin en küçük fonksiyonel birimi nefronlardır ve her bir böbrek, sayı olarak yaklaşık 1.000.000 - 1.300.000 nefrondan oluşmaktadır. Nefronların temel görevleri filtrasyon, sekresyon ve reabsorpsiyondur. Her nefron, filtrasyonun başlangıcı için önemli olan kan akımını sağlayan “glomerül”, filtrasyonun başladığı “Bowman kapsülü”, sekresyon ve reabsorpsiyonun olduğu “proksimal” ve “distal” tübülüsler, bu tüpleri birleştiren “Henle Kulpu” ve oluşan idrarın mesaneye drenajını sağlayan “üreter”e ulaştıran “toplayıcı kanallardan” oluşmaktadır⁴⁰(Şekil 2.1). Renal stroma; gevşek bağ dokusu, kan damarları, kapiller, lenf kanalları ve sinirleri içermektedir. Böbrek arterleri, anterior ve posterior arterler olarak iki kanala ayrılır. Posterior arterler böbreğin arka ve orta kısmını, anterior arterlerse böbreklerin kalan diğer tüm kısımlarını besleyen arter kanallarıdır. Renal sinirler böbrek damarlarına eşlik ederek renal sinir ağından çıkmaktadırlar. Renal sinir ağına 11. ve 12. spinal sinirlerin dorsal köklerinden duyu, sempatik ve splanknik sinirler, vagus sinirlerinden ise parasempatik lifler gelmektedir^{37,41}.



Şekil 2.1. Nefronun yapısı

Yaklaşık 200 µm çapında olan glomerül; kapiller kümelerinin nefronun geniş ve kör ucundaki Bowman kapsülü içine girmesi ile oluşmaktadır. Glomerülü oluşturan kapiler kümeleri nefrona büyük miktarlarda kan akımı sağlanmasından sorumludurlar.

Bowman kapsülünde kan ve glomerüler filtrat birbirinden 2 ayrı hücresel tabaka ile ayrılmaktadır: kapiller endotel ve tübülüs epiteli (podositler). Bu iki tabaka arasında ise “glomerüler bazal membran” (GBM) yer almaktadır (Şekil 2.2). Endotel hücreleri ile bazal membran arasında ise glomerülün hücresel matriksini ve destek yapısını oluşturan mezenkimal hücreler bulunmaktadır⁴².



Şekil 2.2. Glomerülün yapısı

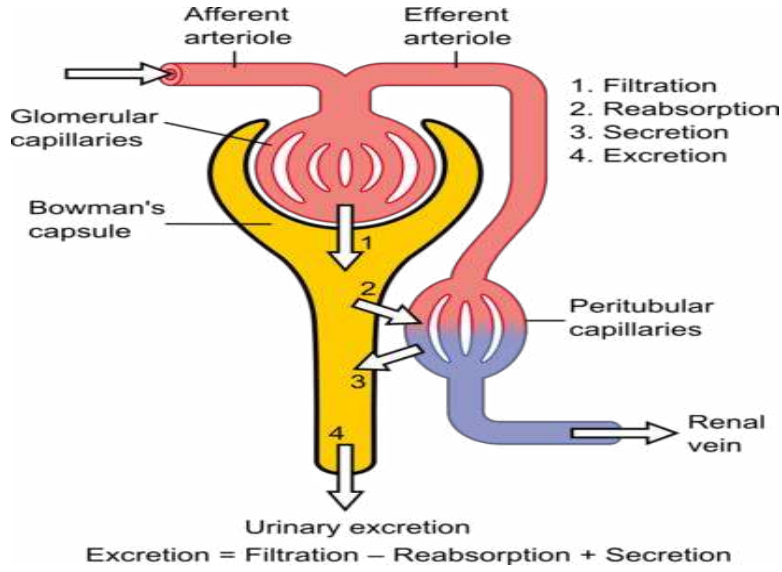
Böbrekler, “üreter” adı verilen bir tüp aracılığı ile idrarın depolandığı “mesane”ye bağlanırlar. Böbreklerde oluşturulan idrar üreterler yoluyla, düz kaslardan oluşan ve idrarın gerektiğinde dışarı atılmasını sağlayan mesaneye aktarılır. Nefronlar tek başına idrar üretebilme özelliğine sahiptirler³⁶.

Böbreklerin temel fonksiyonlarından birisi, vücut sağlığının devamı için gerekli olan sıvı ve elektrolit dengesini sağlamaktır. Vücuttaki sodyum, potasyum, klor, bikarbonat, hidrojen, kalsiyum ve fosfat gibi elektrolitlerin plazma düzeylerinin ayarlanması ve tansiyonun dengelenmesinde birinci derecede aktif rol oynamaktadırlar. Böbrekler su-elektrolit dengesini ayarlayarak vücut sıvısının; tonisite, hacim, asit-baz dengesi ve kimyasal bileşimini düzenlemektedirler³⁷.

Hücredeki metabolik işlevlerin maksimum etkinlikte gerçekleşebilmesi için hücre içi sıvı bileşiminin dar bir aralıkta tutulması gereklidir. İntraselüler sıvı, hücreyi çevreleyen ekstraselüler sıvının bileşiminden büyük oranda etkilenmektedir. Ekstraselüler sıvı içeriği, solunum sistemi ve böbrekler tarafından düzenlenmektedir.

Akciğerler, parsiyel basınçları ve asit-baz sisteminin solunumsal komponentini oluşturan kan gazlarının konsantrasyonlarını denetlerken, böbrekler uçucu olmayan maddelerin konsantrasyonlarını belirlemektedir⁴³. Böbrekler ayrıca, renin ve prostaglandin gibi hormonları salgılayarak elektrolit düzeylerinin dengelenmesinde ve eritropoetin gibi hormon salgılayarak kırmızı kan hücrelerinin üretiminde görev almışlardır^{44,45}.

Böbrekler temel fonksiyonlarını filtrasyon, reabsorbsiyon ve sekresyon özellikleriyle gerçekleştirirler (Şekil 2.3). Glomerülde gerçekleşen glomerüler filtrasyon, kandaki atık ürünlerin damardan ayrılarak Bowman kapsülüne geçiş işlemidir. Glomerüldeki kanın yaklaşık 1/5'i glomerüler membrandan tübüler sistem içerisine filtre edilmektedir. Tübüler sekresyon, vücut için zararlı olan, istenmeyen maddelerin atılmasını sağlayan önemli bir mekanizmadır. Sekresyon, nefron duvarında epitelyum hücre stoplazmalarındaki maddelerin tübüler lümene doğru hareketidir. Böylece hücre içerisindeki bazı maddeler tübüler sıvı içine sekresyon yoluyla emilmiş olurlar. Bu maddeler doğrudan epitelyum hücrelerinin sentezlediği maddeler olabildiği gibi, böbrek epitelyum hücrelerini çevreleyen interstisyum bölgesinden de gelebilirler⁴⁰. Reabsorbsiyon, lümene geçmiş olan maddelerin epitelyumu aşarak interstisyuma doğru geri akışıdır. Geri emilen maddeler interstisyumdan kan damarlarına doğru hareket ederler. Kısaca reabsorbsiyonda maddeler lümeninden interstisyuma, oradan da kana geçerler³⁷. Böylece filtre edilen sıvı, tübüllerden geçerken vücut için gerekli olan maddeler kapiler ağındaki plazma içine tekrar emilmiş olur. Bu emilimden arda kalan sıvı da idrar olarak dışarı atılmaktadır.



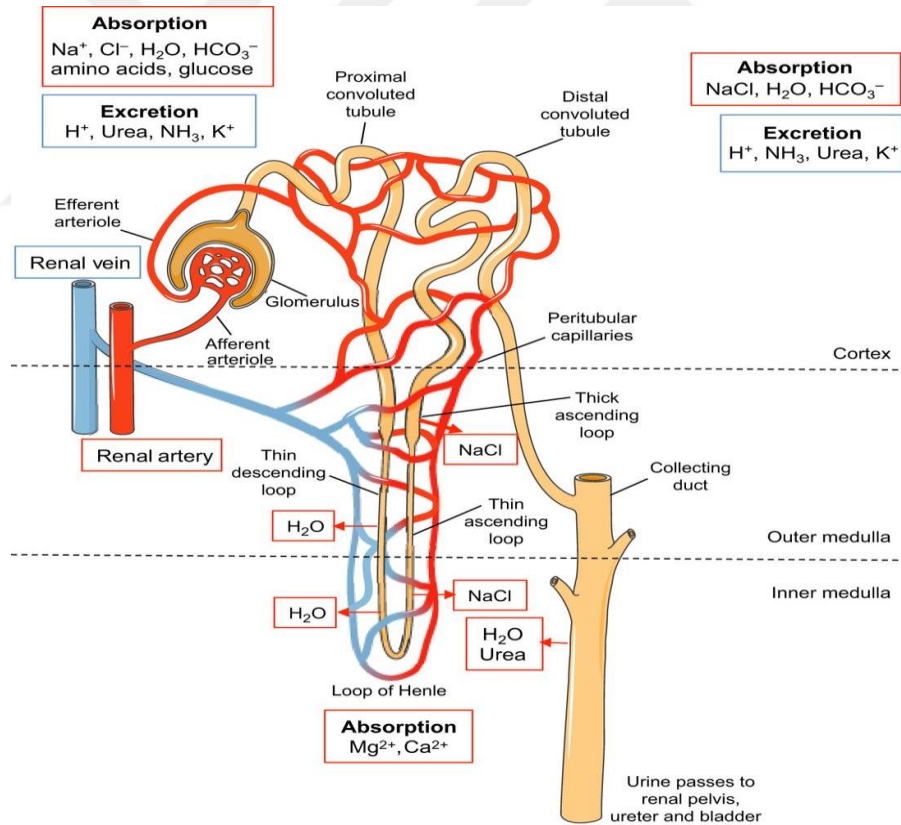
Şekil 2.3. Nefronun temel fonksiyonları

Glomerüler bazal membran (GBM), işlevsel olarak glomerüler kapillerlerinin geçirgenliğini düzenler ve ancak 4 nm'den daha küçük çaptaki nötral maddelerin difüzyonuna izin verir. Böylece albümin ve albümininden daha büyük moleküllerin idrara geçişini önler. Kandaki düşük moleküler ağırlıklı maddeler ise GBM aracılığı ile kapiller duvarı ve ardından Bowman kapsülünü geçerler. Bu süzme işlemi, dolaşım sistemindeki yüksek kan basıncının etkisi ile sıvıdaki elektrolitlerin ve diğer küçük moleküllerin membrandan geçişinin sağlandığı bir pasif difüzyon olayıdır. İdrar oluşumunun bu filtrasyon aşaması enerji gerektirmeden gerçekleşmektedir⁴⁶.

Glomerüler süzüntü kimyasal yapısı bakımından kan plazmasına benzer, ancak protein ve proteine bağlı maddeleri taşımaz. Eğer bütün filtrat organizmadan dışarı atılsa, bu işlem ölümle sonuçlanırdı. Bu nedenle, vücut için gerekli olan maddeler tekrar emilerek kan dolaşımına geçmektedir. Gereksiz ve zararlı maddelerin çoğu ise filtratta kalarak idrar halinde dışarı atılmaktadır^{36,47}.

Glomerülden geçen sıvı, proksimal tüplere geçtiğinde ilk oluşan olay "reabsorpsiyon"dur. Proksimal tüplerin duvarı apikal yüzde sıkı bağlantılar aracılığı ile birleşen tek sıralı bir hücre tabakasından oluşmaktadır. Bu hücrelerin lümene bakan yüzünde çok sayıda mikrovilüsün bir araya gelmesi ile oluşan fırçamsı kenar yer almaktadır. Burada glomerüllerden süzülen sıvının yaklaşık üçte ikisi tübüler sıvının

ozmolalitesini değiştirmeden geri emilir. Yani, bu bölgedeki sıvı geri emilimi izoozmotiktir ve Na^+ 'un aktif transportu ile birliktedir. Na^+ geri emilimine Cl^- ve HCO_3^- geri emilimi de eşlik eder. Proksimal tüplerin baslangıç kısmındaki HCO_3^- geri emilimi fırçamsı kenar membranındaki Na^+/H^+ değiştirici mekanizması ile gerçekleşir ve karbonik anhidraz enzimine bağımlıdır. Aynı şekilde, glukoz, aminoasitler ve diğer bazı organik maddeler de Na^+ 'a bağlı bir ko-transport işlemi ile geri emilirler. Glukoz ve Na^+ membranda ortak bir taşıyıcıya bağlanırlar ve Na^+ elektriksel ve kimyasal gradyent boyunca hücre içine girerken glukoz da beraberinde taşınır. Su ise tübül içi sıvının ozmolalitesinin sabit tutulması amacı ile pasif olarak geri emilir. Glomerüllerden süzülen sodyum bikarbonatın % 85'i, sodyum klorür'n % 40'ı, suyun % 60'ı, organik maddelerin ise tamamına yakını proksimal tübülde geri emilmektedir. Bu nedenle, böbrekler tarafından günde 170 - 190 L civarında sıvı filtre edilmesine rağmen bu miktarın ancak 1-2 L si idrarla vücuttan atılmaktadır^{48,49}.



şekil 2.4. Tübüllerde gerçekleşen olaylar

Proksimal ve distal tübülüsler “Henle kulpu” tarafından birleştirilmiştir. Henle kulpu inen ve çıkan kollardan oluşmaktadır. Çıkan kolun ince ve kalın segmentleri bulunmaktadır. İnen kol suya yüksek oranda geçirgendir. Burada su ozmotik güçlerin etkisi ile pasif olarak geri emilir. Çıkan kol suya çok az geçirgendir. Çıkan kolun kalın segmentinde NaCl aktif olarak geri emilirken su geri emilimi gerçekleşmez. Bu da tübüler sıvının ozmolalitesinin azalmasına neden olur. Bu nedenle bu bölgeye “dilüsyon segmenti” de denmektedir. Henle kulpunda başlayan bir başka işlemde “sekresyon”dur. Cl iyonları ve bir miktar Na^+ kan dolaşımından tübülüs içerisine aktif transportla taşınır. Henle kulpundan geçiş esnasında tübüler sıvı hacmi % 5 oranında azalır ve plazmaya göre daha hipotonik hale gelir⁴⁸.

Distal tübüllerden suyun geri emilimi organizmanın ihtiyacı oranında gerçekleşmektedir. Bu bölgede, reabsorpsiyon az da olsa devam ederken daha çok sekresyon ön plana çıkmaktadır. H^+ ve K^+ tübüler sekresyona uğrarken düşük miktarda (filtre edilen miktarın % 10’u) Na^+ ise yeniden geri emilir. Vücutta asit-baz dengesini düzenleyen sistemin bir parçası olarak amonyak sekresyonu da burada gerçekleşir. NaCl geri emilimi ise elektriksel olarak nötral olan Na^+ ve Cl kotransportu şeklindedir. Yine, lümenin bu kısmında yer alan apikal Ca^{+2} kanalları ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici sistemi aracılığı ile Ca^{+2} geri emilir. Bu işlem paratiroid hormonu tarafından düzenlenmektedir. Bu bölümdeki su reabsorpsiyonu ise antidiüretik hormon (ADH) etkisine bağlıdır. ADH yokluğunda su geri emilimi söz konusu olamamaktadır. Bu nedenle idrar dilue hale gelir. ADH varlığında ise distal tüplerin son kısmının suya geçirgenliği artar. NaCl geri emilimi ise aldosteron tarafından düzenlenmektedir^{48,49}.

Distal tübülüsler toplayıcı tüplere (kollektör kanal) boşalırlar, bunlar ise biraraya gelerek toplayıcı kanalları oluştururlar. Nefronun bu bölümü idrardaki son NaCl konsantrasyonunu belirler. Toplayıcı tüplerde 2 ayrı hücre tipi yer alır: Bunlar Na^+ reabsorbe eden ve K^+ sekrete eden ana hücreler ve H^+ iyonu sekresyonundan sorumlu olan interkale hücrelerdir. Buradaki Na^+ geri emiliminden sorumlu olan ana hücrelerin apikal membranı, diğer tübülüs segmentlerinden farklı olarak Na^+ ve diğer iyonlar için ko-transport sistemleri yerine, Na^+ ve K^+ için özgül iyon kanalları içermektedir. Nefronun bu bölümü “sıkı” epitelle döşeli olup iyonlara ve suya karşı geçirgenliği azdır. Bu

nedenle, bu nefron segmentinde iyon ve su hareketleri birbirinden bağımsız olarak düzenlenir ve aldosteron ve ADH gibi hormonların etkisi altındadır⁴⁸.

2.1.2. Akut Böbrek Hasarı

İnsan ve hayvanlarda böbrek hasarları genel olarak “akut” ve “kronik” olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır^{50,51}. Daha öncesinde “akut böbrek yetmezliği” olarak isimlendirilen “akut böbrek hasarı” (ABH); genel olarak saatler veya günler içerisinde, nitrojenli artıkların atılamaması, metabolik, elektrolit ve sıvı homeostazisinin bozulması sonucu diğer vücut sistemlerini de olumsuz etkileyen bir durumdur. Böbrek fonksiyonlarında ani bir bozulma ile karakterizedir^{52,53}. Böbrek kan akımının ani düşüşü ve GFR’de meydana gelen azalmaya bağlı olarak, kreatinin, kan üre azotu (BUN) ve diğer üremik toksinlerin vücutta birikmesi ve konsantre idrar çıkarılması ile karakterize klinik bir tablodur^{2,54,55,56}. Akut böbrek hasarının klinik bulguları; idrar çıkışının azalması, metabolik asidoz, hiperkalemi ve hiperfosfatemi oluşumuna eğilim şeklindedir. ABH bir hastalık değil, farklı hastalıkların yol açtığı klinik bir tablodur. Bu durumun, tamamen ya da kısmen geri dönüşümlü olduğu kabul edilmektedir. Akut böbrek hasarı geçiren hastaların bir kısmında, uzun dönemde kalıcı hasar olduğu gösterilmiştir. ABH’nin uzun vadeli kötü sonuçları; ölüm, kronik böbrek hastalığı, böbrek fonksiyonlarının tam kaybı şeklindedir^{57,53}.

Böbrek dokusu, kan akışının fazlalığı, konsantrasyon yüksekliği, metabolik aktivitenin fazla olması, zararlı maddelerin vücuttan uzaklaştırılması ve aktif transport fonksiyonlarından dolayı birçok ilaç ve toksik madde için hedef organ durumundadır. ABH’nin en önemli nedeni, birçok madde ve ilaca bağlı olarak gelişen nefrotoksisitedir¹.

Çeşitli araştırmalara göre ABH’nin gelişiminde rol oynayan patofizyolojik faktörlerin; glomerüler kapiller geçirgenlikte azalma, glomerüler filtratın geri kaçıışı, intrarenal vazokonstriksiyon ve tubuler tıkanma olduğu bildirilmektedir^{58,59,55}.

Fizyopatolojilerine göre ABH; prerenal, renal ve postrenal olmak üzere üç farklı alt gruba ayrılmaktadır. Bu sınıflama aynı zamanda ABH’nin tanı ve tedavisi için de önem taşımaktadır^{59,60}.

Prerenal akut böbrek hasarı: İntravasküler volümün ya da etkin kan volümünün azalması nedeniyle böbreklerin kanlanması bozulması sonucu ortaya çıkan tablodur. Gerçek bir böbrek hasarı olmayıp, kan volumü ve hemodinamik durumlar etkin kompensasyon mekanizmasıyla düzeltilindiğinde hasar ortadan kalkabilmektedir. Nedenler ortadan kaldırılmazsa renal ABH ile sonuçlanmaktadır⁶¹.

Renal (intrensek) akut böbrek hasarı: Hipoksi, uzamış iskemi ve nefrotoksinler renal ABH'nin en önemli sebepleri arasında yer almaktadır. Patogenezi tam olarak bilinmese de renal ABH başlamasıyla tübülüs hücrelerinde intrasellüler ATP azalması, birçok metabolik reaksiyonun başlamasını tetiklemektedir. Hasarın oluşmasında hücre içi kalsiyum, nitrik oksit ve reaktif oksijen bileşikler konsantrasyonlarındaki artışın etkili olduğu düşünülmektedir⁶².

Renal ABH'nin pekçok nedeni vardır. İskemi ve/veya nefrotoksik ajanlara bağlı gelişen akut tübüler nekroz (ATN) renal ABH'nin en yaygın nedenidir⁵⁵. Renal ABH'de tubul hücrelerinin iskemi ve toksinlerle hasar görmesi ve intrarenal hemodinamide meydana gelen değişiklikler GFR'de ani düşüşe neden olmaktadır^{59,60}. Azalmış GFR ve vazokonstriksiyon renal oksijenasyonu bozmakta ve meydana gelen iskemi renal kan akımı ve GFR'yi daha da azaltmaktadır. Böylece endotel kaynaklı vazodilatörlerin (NO, prostasiklin) sentezi bloke olurken, vazokonstriktörlerin (endotelin) salınımı ise artmaktadır^{2,54}.

Renal ABH olaylarında meydana gelen patolojik durum, prerenal ABH'den farklı olarak böbrek kan akımının düzeltilmesi ile hemen düzelmemektedir. Genelde geri dönüşümlü bir olay olmasına rağmen, kortikal nekroz oluşturacak düzeyde bir işlev bozukluğu mevcut ise kalıcı böbrek yetmezliği söz konusu olabilmektedir⁶⁰.

İskemi, toksinler, çeşitli ilaçlar (aminoglikozitler, amfoterisin-B, acyclovir, sülfonamidler, non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar, vankomisin, methoxyflurane, methotrexate, ACE inhibitörleri, anjiyotensin II reseptör antagonistleri), radyo kontrast maddeler, çeşitli endotoksinler (myoglobin, hemoglobin), etilen glikol, çeşitli ağır metaller, glomerüler hastalıklar (glomerülonefrit, IgA nefropatisi, endokardit, poststreptokokal infeksiyonlar), çeşitli vasküler hastalıklar (ateroembolik hastalıklar, hemolitik üremik sendrom, trombotik trombositopenik purpura), renal arter tıkanıklığı,

anevrizma ve bazı interstisyel hastalıklar (sistemik lupus eritematozus, piyelonefrit, lenfoma, lösemi) bu tür renal yetmezliğe yol açan başlıca nedenlerdir^{2,59,60}.

İskemik Akut Tübüler Nekroz: İskemik akut tübüler nekroz, prerenal ABH de böbrek perfüzyonundaki azalmaya bağlı olarak gelişmektedir. İskemik akut tübüler nekrozda farklı olarak özellikle tübüler epitelyumun katıldığı böbrek parankiminde iskemik hasar mevcuttur. En sık, ciddi kanamalar, ciddi volüm kayıpları, ciddi travmalar ve yanıklarda, majör kardiyovasküler cerrahi geçiren hastalarda görülmektedir. İskemik ABH gelişiminde; hemodinamik faktörler, endotel ve tübül hücreleri ile ilişkili faktörler ve inflamatuvar faktörler rol almaktadır⁵⁵.

Toksik Akut Tübüler Nekroz: ABH yapan bir ilaç kullanılmaya başlandıktan birkaç gün sonra oligürük/anürük ABH gelişebileceği gibi sadece serum kreatinin düzeyinde artışla da seyredebilir. Bu durum doz azaltımı ile dramatik bir şekilde gerilemektedir. Bu ilaçlar birkaç yolla ABH gelişimine neden olmaktadır⁶³:

- 1) Afferent arteriyollerde vazokonstriksiyon ile böbrek kan akımında ve glomerüler filtrasyonda azalmaya neden olmaktadır.
- 2) Mezengial hücrelerde kontraksiyona ve sonuç olarak glomerüler geçirgenlikte bozulmaya neden olmaktadır.
- 3) Tübüler hücreleri etkilemek suretiyle sodyum retansiyonu, potasyum ve ürik asit atılımının azalması, magnezyum tübüler sekresyonunun artması ve hiperkloremik metabolik asidoza neden olmaktadır.

Epitel hücrelerine doğrudan hasar vererek ve/veya intratübüler alanda tıkanıklığa yol açarak ABH gelişimine neden olan önemli ajanlar; aminoglikozitler, amfoterisin B, asiklovir, foskarnet gibi antibiyotikler, sisplatin, karboplatin, ifosfamid gibi kemoterapötik ilaçlardır. Aminoglikozitler terapötik dozda kullanıldığında bile % 10-30 oranında ABH gelişebilmektedir. Amfoterisin B doz ilişkili olarak intrarenal vazokonstriksiyon ve doğrudan proksimal tübül epiteline toksik etki ile ABH'ye neden olmaktadır. Sisplatin ve karboplatin de proksimal tübül hücrelerinde birikmekte, maruziyetten 7-10 gün sonra mitokondriyal hasar ve buna eşlik eden sekonder ATP-az inhibisyonu ile toksik hasar oluşturmaktadır⁵⁵.

Postrenal akut böbrek hasarı: Üretranın tıkanması veya iki taraflı üreterlerin tıkanması ile idrar akımının engellenmesi durumunda oluşmaktadır. En sık nedeni posterior üretral valve, çift taraflı üreteropelvik birleşke darlığı, çift taraflı tıkaçıcı üreterosel gibi konjenital malformasyonlardır. Taşlar, pıhtılar, tümör yenidoğan dönemi sonrasındaki etiyolojide yer almaktadır. Obstrüksiyonun giderilmesi sonucu böbrek hasarı genellikle iyileşmektedir⁶².

2.1.3. Nefrotoksisite

Nefrotoksisite; “nefrotoksik renal yetmezlik”, “akut glomeruler nefritis”, “interstisyel nefritis”, “nefrotik sendrom” ve “aşağı nefron nefrozisi” gibi isimlerle tanımlanmaktadır⁶⁴. Böbrekler yüksek orandaki kan perfüzyonu, metabolik yollardaki etkinlikleri ve ekspresyon fonksiyonları sebebiyle ilaçların ve toksinlerin etkilerine maruz kalabilen organlardır. Ayrıca sekresyon, reabsorbsiyon ve idrar oluşturma mekanizmaları gibi fonksiyonları sebebiyle, böbrek renal tübüler hücreleri vücuttaki diğer doku hücrelerine oranla daha yüksek düzeylerde toksik konsantrasyonlarla karşılaşmakta ve dolayısıyla böbrekler toksik ajanlardan daha fazla etkilenebilmektedirler. İlaç tedavisi gören hastaların % 20’den fazlasındaki ilaç toksisitesinin, akut böbrek hasarı ile sonuçlanabilmekte olduğu bildirilmiştir².

Nefrotoksisitede ortaya çıkan tübüler nekroz, “akut tübüler nekroz” (ATN) olarak da tanımlanmaktadır. Nefrotoksisite sırasında meydana gelen değişiklikler, ilacın böbrek korteksinde birikme özelliğinden kaynaklanmaktadır⁹.

Evcil hayvanlarda birçok ilaç ve kimyasal madde nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Bunların başlıcaları; aminoglikozitler (neomisin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, tobramisin, amikasin vb), sefalosporinler, polimiksinler, tetrasiklinler, sülfonamidler, penisilinler, monensin, vankomisin, asiklovir, amfoterisin-B, çeşitli ağır metaller (arsenik, bizmut, kadmiyum, kurşun, civa, talyum, bakır, altın tuzları, uranyum), methoxyflurane, methotrexate, etilen glikol, klorlu hidrokarbonlar, kontrast maddeler, okzalatlara, mikotoksinler, tanenler, çeşitli analjezik ilaçlar (ibuprofen, naproksen, salisilatlar, fenilbutazon), anjiyotensin II reseptör antagonistleri, myoglobin ve hemoglobin gibi endotoksinlerdir^{2,65}.

Proksimal nefron epitelyum hücreleri, çok sayıda taşıyıcı sistem bulundurmaları sebebiyle birçok toksik ajan için merkezi bir hedef olabilmektedir. Yine bu hücrelerde, muhtemelen oksidatif hasara karşı korunma amaçlı GSH ve GSH ilişkili enzimlerin hücre içi konsantrasyonları en yüksek seviyelerdedir. Bu seviyelerin yüksek oluşu nedeniyle proksimal tübülün, medüller kısımlara kıyasla oksidatif hasara karşı daha dirençli olduğu belirtilmektedir⁶⁶.

Tübül epitellerinin çoğunluğunun oksidatif stres gibi çeşitli hasarlara karşı kendilerini yenileme yeteneklerinin hızlı olduğu ancak glomerül ve medulladaki epitel hücrelerin bu özelliklerinin zayıflığı sebebiyle kendilerini yenileyemediği ve bu bölgelerdeki hasarların böbrek yetmezliğiyle sonuçlanabileceği belirtilmektedir. Nefronların ise toksik etkenlere maruz kalmaları durumunda belirli bir düzeye kadar hasarı giderebilme yeteneklerinin olduğu düşünülmektedir^{64,66}.

Nefrotoksisite gelişiminde temel özellik, böbrek dokusunun toksik ajana yeterli doz ve sürede maruz kalmasıdır. Bazı analjeziklerin, antibiyotiklerin, immünsüpresif ve kemoterapötik ilaçların nefrotoksisiteye yol açabildiği bilinmektedir⁶⁷. Besin takviyesi olarak alınan veya destekleyici olarak kullanılan bazı bitkisel veya doğal ürünlerin de nefrotoksisiteye sebep olabildikleri belirtilmektedir. Ayrıca çevresel maruziyetle alınan kadmiyum, bakır, uranyum ve bismut gibi maddeler de nefrotoksisiteye yol açmaktadırlar^{67,68}.

2.13.1. Nefrotoksik Böbrek Hasarı

Nefrotoksisite, ABH'ye yol açan en önemli nedenlerden biridir. Böbrekler glomerüler filtrasyon ve metabolik görevlerini yerine getirebilmek için sistemik dolaşımdan, organ boyutuna göre orantısız olarak büyük miktarda kan alırlar. Bu nedenle böbrek damarları, tübüller, glomerül ve intertisyel dokulardaki hücreler kandaki toksinlerle karşılaşmaktadırlar. Nefron boyunca gerçekleşen su ve solüt madde emilimi ile hasarlanmaya karşı çok hassas olan tübül epitel hücreleri, yoğun konsantrasyondaki toksinlere maruz kalırlar. Toksik maddeler ile hasar oluşumunda; böbrek hemodinamisinin değişmesine bağlı hasarlanma, tübül epitel hücresine direk toksik etki, toksin ya da metabolitlerinin çökmesine bağlı tübüler obstrüksiyon ile idrar akımının

engellenmesi, intertisyel inflamasyon ve trombotik mikroanjiyopati gibi farklı mekanizmalar etkili olabilmektedir⁶⁹.

Nefrotoksik böbrek hasarına yatkınlığı arttıran faktörler arasında yaş, farmakogenetik, altta yatan temel hastalık, toksin maddenin dozu ve eş zamanlı kullandığı tedaviler sıralanabilir. Sorumlu toksinlerin başında ilaçlar gelmektedir. Vücuda dışarıdan alınan (etilen glikol, metilen) veya vücutta meydana gelen (hemogloblin, miyogloblin) maddeler de nefrotoksik ABH oluşmasında rol oynayabilmektedir⁷⁰.

İlaç kullanımına bağlı ABH, günümüzde giderek artan bir morbidite ve mortalite nedenidir. Yapılan çalışmalardan birinde hastane kaynaklı nefrotoksik ABH'nin yaklaşık % 20'sinden ilaçların sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada da hastane yatışı sırasında ABH gelişen olgularda nefrotoksik etkinin etiyojideki katkısı % 8-60 olarak belirtilmektedir. Antibiyotiklerin % 3-11, ACEİ'nin % 0,5-7, nonsteroid antiinflatuar ilaçların (NSAID) % 3-22 ve radyokonstrast maddelerin % 2-12 oranında nefrotoksik ABH oluşturduğu bildirilmiştir^{69,70}. İlaçlar ve toksik etki mekanizmaları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Nefrotoksik ajanlar ve böbrek üzerine etkileri

Patofizyoloji	İlaçlar
Prerenal yetmezlik	NSAID, ACE inhibitörleri, siklosporin A, norepinefrin, AT2-reseptör antagonisti, diüretik, interlökin, kokain, mitomisin C, takrolimus, estrogen, quinin
Akut tübüler nekroz	Antibiyotikler (aminoglikozidler, sefalosporinler, amfoterisin B, rifampisin, vankomisin, foskarnet, pentamidin), NSAID, glafenin, kontrast maddeler, asetaminofen, siklosporin A, sisplatin, intravenöz immunglobulin, dextran, maltoz, sukroz, mannitol, ağır metaller
Akut intertisyel nefrit	Antibiyotikler (Siprofloksasin, metisilin, penisilin G, ampisilin, sefalosporin, oxasilin, rifampisin), NSAID, glafenin, asetilsalisilik asit, fenoprofen, naproksen, fenilbutazon, piroksikam, tolmetin, zomepirak, kontrast madde, sulfonamid, tiyazidler, fenitoin, furosemid, allopurinol, simetidin, omeprazol, fenindion
Tübül obstrüksiyonu	Sulfonamid, metotreksat, methoxyfluran, glafenin, triamteren, asiklovir, etilen glikol, proteaz inhibitörü
Hipersensitivite	Penisilin G, ampisilin, sulfonamid
Trombotik mikroanjiyopati	Mitomisin C, siklosporin A, oral kontraseptifler

Potansiyel nefrotoksin olan çeşitli ilaçların konsantre edilmeleri işlemi, böbrek tübülüslerinde gerçekleştiğinden tübüler lümen ve peritübüler hücreler bu toksinlerle yüksek konsantrasyonlarda karşılaşmaktadırlar. Böbrek medullası ve papiller dokular ise bu bölgelerde kan akımının düşük, “solute” konsantrasyonunun ise yüksek olmasından dolayı toksik hasara karşı daha hassastırlar⁷¹.

Çeşitli kaynaklara göre böbrek rahatsızlıklarının önemli bir kısmı ilaçların sebep olduğu nefrotoksitedir. Özellikle yaşlılarda gelişen nefrotoksitenin % 60 kadarının ilaç kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Geçmişe oranla günümüzde çok daha fazla ilaç tüketimi ve diagnostik prosedürlerin uygulanması daha fazla insanda böbrek fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır. İlaçlar, akut böbrek yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği ve nefrotik sendromlara yol açabilmektedir⁶⁶.

Akut böbrek yetmezliğiyle sonuçlanan oksidatif stres hasarının temelinde, oluşan serbest radikallerin etkisi ve antioksidan aktivitenin yetersizliği yatmaktadır⁷². Nefrotoksik ajanlar temel etkilerini, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), hidroksil radikali (OH^-) ve hipoklorik asit ($HOCl$) gibi serbest radikalleri ortaya çıkararak göstermektedirler. Oksidatif stres sonucu gelişen nefrotoksitenin beraberinde glomerüler, tübülointerstisyel ve endotelial değişiklikler de oluşabilmektedir⁷³.

2.1.3.2. Aminoglikozit Nefrotoksitesi

Aminoglikozitler 500 Dalton ağırlığında, polar, katyonik (ortalama pH: 7,8) moleküllerdir⁷⁴. Polar yapılarından dolayı yağda az çözünürler ve bu yüzden biyolojik membranları geçme yetenekleri zayıftır. Plazma proteinlerine çok az bağlanırlar. İnsanlarda eliminasyon yarı ömürleri yaklaşık 2 saattir ve böbreklerden hızlı bir şekilde değişmeden atılırlar⁷⁵.

Aminoglikozitler çok sayıda mikroorganizmanın protein sentezini irreversibl olarak inhibe ederek duyarlı bakteri hücresi üzerinde hızlı bir bakterisidal etki

oluştururlar. Bu etkiyi bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek ve mRNA'daki genetik bilginin doğru okunuşunu azaltıp, bozarak gösterirler⁷⁶.

Gram(-) enfeksiyonlar üzerinde etkili olan aminoglikozitlerin güvenli kullanılabileceği aralık çok dardır ve kullanımlarını kısıtlayan en önemli özellik toksisiteLERİDİR. En sık olarak nefrotoksisite, ototoksisite ve nöromüsküler blokaj meydana getirmektedirler. Bunlar doz-bağımlı toksik etkilerdir⁷⁶. Bu toksik etkilere parenteral uygulamalarda daha sık rastlanılmaktadır. Aminoglikozitlerin neden olduğu böbrek bozuklukları (nefrotoksisite) genellikle reversibldır. Buna karşın, işitme ya da denge organı (cochleovestibuler sistem) üzerine olan toksik etkileri (ototoksisite) irreversibldır⁷⁷.

Aminoglikozit toksisitesinin klinik seyri genellikle yavaştır. Aminoglikozit kullanımından günler sonra serum kreatininde yavaş bir artış, nonoligürik ve hipoozmolar idrar ile karakterize böbrek hasarı oluşmaktadır. Erken bulguları arasında nefrojenik diabetes insipidusa bağlı izostenüri, idrarda Mg, Na ve K kaybı görülmektedir⁷⁸.

Yapılan araştırmalar aminoglikozit kullanan hastaların % 10-20'sinde ilaç düzeylerinin terapötik sınırlar içinde olmasına rağmen nefrotoksisite geliştiğini göstermiştir⁷⁹. Aminoglikozit nefrotoksisitesi genellikle ilaca başlandıktan sonraki 7-10 gün içinde ortaya çıkmaktadır. İdrar miktarının normal olması bu tip böbrek hasarının karakteristik bir özelliğidir⁷⁵. Glomerüler filtrasyon hızı azalmadan önce poliüri ve idrarı konsantre etme yeteneğinde azalma söz konusu olabilmektedir. İdrar sedimentinde, silendirlerde, tübülüs hücrelerinde ve miyeloid hücrelerde artış izlenebilmektedir. Glomerüler filtrasyon hızının belirgin olarak düşmediği durumlarda dahi tübüler hasarı yansıtan enzimüri görülebilmektedir⁷⁵. Sodyum ve potasyumun fraksiyonel ıtrahı artmaktadır. Bazı olgularda şiddetli K⁺ ve Mg⁺² kaybına bağlı olarak hipokalsemi gelişmektedir. Renal biyopsilerde yamalı (patchy) tübüler nekroz karakteristiktir. Böbrek disfonksiyonu ilaç bırakıldıktan sonra 7-10 gün süre ile devam etmektedir. Bazen diyaliz desteği gerekmele beraber çoğu olguda GFR genellikle kendiliğinden düzelmektedir⁸⁰.

İlacın uygulama dozu ve süresi, önceden var olan bir böbrek veya karaciğer hastalığı, yaş, sıvı kaybı, sepsis, K ve Mg azlığı gibi nedenler aminoglikozit toksisite riskini artırmaktadır. Renal yetmezlik aminoglikozitlerin uzun süreli kullanımları sonucu

ilacın renal kortekste toksik miktarlarda birikme özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Aminoglikozitlerin günlük tek doz kullanılmasına bağlı meydana gelen toksisite riski, yeterli hidrasyon ve elektrolit destek sağlandığında oldukça azalmaktadır^{60,81}.

Aminoglikozitlerin nefrotoksik etki oluşturma potansiyelleri ilaca göre değişmektedir. Brion ve ark.'ları yaptıkları çalışmada⁸², gentamisin nefrotoksitesinin; netilmisin, tobramisin, dibekasin ve amikasin den daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Deney hayvanlarında relatif toksisite, böbrek korteksinde bulunan ilaç konsantrasyonu ile paralellik göstermektedir. En yüksek konsantrasyonda biriken ilaç olan neomisin, insanda en fazla nefrotoksik etkiye sahip olup, sistemik olarak kullanılmamaktadır. Streptomisin, böbrek korteksinde toplanmaz ve en az nefrotoksik olandır. Gentamisin ve tobramisine bağlı toksisite oldukça tartışılmalıdır. Gentamisin böbreklerde tobramisinden daha fazla birikir, fakat birçok kontrollü klinik çalışmada toksisite ile ilgili değişik yorumlar yapılmıştır. Bu iki antibiyotiğin arasındaki nefrotoksisite farkı önemsiz olarak değerlendirilmiştir⁸³.

Aminoglikozit grubu antibiyotiklerin potansiyel nefrotoksik etkileri kullanılan ilaca göre değişmesine rağmen, insan ve hayvanlarda spektinomisin dışındaki tüm aminoglikozitlerin tubuler ve glomerüler fonksiyonlar üzerine direkt olarak etki ederek nefrotoksisiteye sebep oldukları bildirilmiştir^{82,81}. Bu antibiyotiklerin nefrotoksik potansiyelleri bünyelerinde bulunan iyonize olabilir amino (NH₂) gruplarının sayıları ile ilişkilidir. Amino gruplarının sayısı arttıkça ilacın nefrotoksiteside artmaktadır. Altı amino grubuna sahip olan neomisin en toksik olanıdır. Bunu beş amino grubu ile gentamisin, netilmisin, tobramisin, kanamisin ve amikasin takip eder. En düşük nefrotoksisite ise iki amino gruplu olan streptomisinde görülmektedir^{1,81}.

Aminoglikozitlerle oluşan nefrotoksitenin tübüler nekrozla karakterize olduğu gösterilmiştir. Hücre hasarı, aminoglikozitlerin doğrudan tübüler etkisine bağlıdır ve primer olarak proksimal tüplerde izlenmektedir^{84,85}.

Sıçanda, mikropoksiyon ve mikroenjeksiyon çalışmaları aminoglikozitlerin fırçamsı kenar membranında bir reseptöre bağlandıktan sonra vakuolizasyon ile proksimal tübülüs hücrelerine alındığını göstermektedir⁸⁶. Aminoglikozitler özellikle proksimal tubul ve pars rektada tubuler hücre nekrozuna neden olmaktadır. Uygulanan

dozun yaklaşık olarak % 5'i glomerüler filtrasyondan sonra proksimal tübüler epitel hücrelerinde endozomal ve lizozomal vakuoller ile golgi komplekslerinde lokalize olmaktadır. Aminoglikozitler hücreye girdikten sonra lizozomlara taşınmaktadır. Hücre içine alınmanın sürekli olması lizozomal disfonksiyona ve sonuçta dejenerasyona yol açmaktadır. Bu da lizozomal enzimlerin açığa çıkarak diğer hücre organelleri üzerine etkimesine neden olmaktadır⁷¹. Aminoglikozitler lizozomal fosfolipazları inhibe ederek fosfolipidlerin belirgin bir şekilde birikimine neden olurlar. Bu durum fosfolipidozla sonuçlanır^{87,88}.

Bu morfolojik değişiklikler insan böbreğinde bir kaç aminoglikozit dozundan sonra, glomerüler filtrasyon hızı normal iken dahi izlenebilmektedir⁸⁹. Aminoglikozit-lizozom etkileşiminin bir sonucu olarak lizozomal membranlar ozmotik olarak aktif moleküllere daha az geçirgen hale gelir ve devamında yırtılma ve hücre nekrozu gelişir. Nefrotoksisitenin ilk bulguları fırçamsı kenarın ve lizozomal enzimlerin lümene salınması, glikozüri, aminoasidüri ve tübüler proteinüridir⁷¹.

Aminoglikozitlerin aynı zamanda mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla etkileştikleri de gösterilmiştir. Bu etkilerin belirgin hücre nekrozu oluşumundan önce izlenmesi, hücre enerji mekanizmalarındaki bozukluğun hücre ölümü ile sonlanan hücre membranı aktivitesindeki anormalliklerin patogenezinde önemli olabileceğini düşündürmektedir⁹⁰.

Aminoglikozitlerin tek bir yüksek dozu dahi membrana bağlı Na^+ - K^+ -ATPaz'da azalma ile sonuçlanabilmektedir. Ancak aminoglikozit ile indüklenen in-vivo hasarın zamana bağlı gelişimi, hücre membranındaki transport enzimlerindeki değişikliklerin hücredeki letal değişikliklerin nedeni değil sonucu olduğunu düşündürmektedir⁹¹.

Aminoglikozitlerin proksimal tübülüslerde doğrudan toksik etkisine bir diğer kanıt, K^+ ve Mg^{+2} gibi intraselüler katyonların proksimal tübüler kaybının izlenmesidir⁹². Her ne kadar tübüler hücre nekrozu ve glomerüler filtrasyon hızı arasındaki bağlantı tartışmalı ise de, eldeki bulgular intratübüler obstrüksiyonun böbrek disfonksiyonunun oluşmasında önemli bir rol oynadığı görüşünü desteklemektedir⁹³.

Yapılan çalışmalarda aminoglikozitlerin oluşturduğu tubuler nekrozun patogenezi hakkında birçok görüş ortaya atılmış olmasına rağmen, genel olarak kabul gören 3 hipotez özetle şu şekildedir⁷;

1) Aminoglikozitlerin kendi lokal konsantrasyonları ile ilişkili direkt toksikasyon ortaya çıkmaktadır. Bu toksikasyonda aminoglikozitler özellikle lizozomlarda toplandığından, lizozomal değişiklikler patogeneze anahtar rol oynamaktadır. Ancak lizozomal değişiklikler ile hücre nekrozu arasındaki ilişki tam olarak ortaya konulamamıştır.

2) Aminoglikozitler toplandıkları lizozomlardan salındıktan sonra toksik olmaya başlamaktadırlar. Lizozomlardan aminoglikozitlerin salınması, ilaç birikimi veya lizozomal değişiklikler kritik noktaya ulaştığında meydana gelmektedir. Lizozomlarda meydana gelen ani değişiklikler sonucunda lizozomlardan yüklü miktarda aminoglikozit salınmaktadır. Böylece hücre ölümüne sebep olan birçok metabolik değişiklik meydana gelmektedir.

3) İlaç, lizozomlarda non-toksik olarak depolanmaktadır. Ancak hücrede hedef konumundaki lizozomlar tarafından fagosite edilmeyen ve serbest halde kalan aminoglikozitler hücrenin diğer kısımlarında hasar oluşturarak toksikasyona neden olmaktadır. Bu hipoteze göre aminoglikozitlerin lizozomlarda depo edilmesinin hücreyi koruduğuna inanılmaktadır.

2.1.3.3. Gentamisin Nefrotoksitesi

Gentamisin, organik polikasyon yapısında, *Micromonospora purpurea*'dan elde edilen, geniş spektrumlu, aminoglikozit grubundan bir antibiyotiktir. Aminoglikozit grubu ilaçlar arasında, amikasinin sonra antibakteriyel etki gücü en yüksek ve spektrumu en geniş olanıdır. Hızlı bakterisidal etkisi ve kimyasal stabilitesinden dolayı çeşitli tedavi durumlarında sıklıkla ilk basamak ilaç olarak tercih edilmektedir. Plazma proteinlerine bağlanması minimal düzeydedir. Gentamisin fizikokimyasal özelliği nedeniyle esas olarak sadece ekstrasellüler sıvıda dağılmaktadır⁷⁶.

İdrarda serumdakinden 10-100 kez daha yüksek konsantrasyonlarda bulunan gentamisin, vücutta biyotransformasyona uğramadan böbreklerden atılmaktadır. Genellikle 8 saatte bir (günde 3 kez), 1-2 mg/kg dozunda, i.m. veya i.v. enjeksiyon suretiyle kullanılmaktadır. İdrar yolu enfeksiyonlarında daha düşük dozlarda (0,3-1 mg/kg) etki sağlayabilmektedir. Lokal uygulamaya özgülü % 0,1'lik cilt merhemi veya kremi, % 0,3'lük oftalmik solüsyonu bulunmaktadır⁹⁴.

Gentamisin, pH 6-8 arasında oldukça stabldir. pH 7,4'te ise güçlü pozitif yüke sahip durumdadır (katyonik özellik). Bu güçlü polaritesi nedeniyle, hücrelerdeki lipopolisakkarit ile hücre içindeki DNA ve fosfolipitler gibi anyonik moleküllere bağlanabilmektedir. Suda çok iyi eriyip, organik çözücülerde erimemektedir. Çok az lipofiliktir, bundan dolayı yağ içeren zarlardan geçişi sınırlı düzeydedir⁷⁷.

Gentamisin, fizikokimyasal özellikleri nedeniyle gastrointestinal sistemden absorbe edilememekte, ancak intramüsküler veya subkutan enjeksiyondan sonra hızlıca emilmektedir. Ayrıca intravenöz veya intratekal olarak da uygulanabilmektedir. Gentamisin plasentanın diğer tarafına geçebilir fakat kan-beyin, kan-BOS ve kan-göz engellerini çok az geçebilir. Doku düzeyleri renal korteks dışında azdır. Böbrek fonksiyonları normal olan kimselerde eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 2-3 saattir. Atılımı hemen hemen bütünüyle böbrekten glomerüler filtrasyon yoluyla olmaktadır⁹⁵.

Yedi günden fazla klinik doz gentamisin ile tedavi edilen hastaların % 30'unda serum kreatinin (Scr) ve BUN seviyelerinde artış, proksimal tubul hücrelerinde nekroz ve ABH ile karakterize nefrotoksik bulguların gözlemlendiği bildirilmiştir⁶¹.

Nefrotoksisitenin ilaç uygulanmasından 2-5 gün sonra geliştiği⁹, düşük dozlarda bile uzun süreli tedavilerde geri dönüşümsüz hasarların oluşabileceği bildirilmektedir^{7,60}.

Hayvanlarda gentamisin uygulamalarına bağlı olarak serum kreatinin ve BUN seviyelerinde artış, GFR'de ve kreatinin klirensinde azalma, proteinüri, glikozüri, poliüri, idrar osmolaritesinin azalması, proksimal tübüler hücre transportunda değişiklik ve lizozomal enzimlerin idrar ile atılımında anlamlı derecede artışlar olduğu bildirilmiştir^{6,8,9,96}.

Meydana gelen hipoozmotik poliürinin, proksimal tübüllerde sıvı reabsorbsiyonunun azalmasından kaynaklandığı, proteinlerin geri emiliminde azalma, fosfolipidüri, Na, Li, K, Mg, Ca, glikoz ve kast hücre atılımı gibi değişikliklerin ise uygulamaya bağlı olarak tübüllerde meydana gelen disfonksiyonlar sonucu oluştuğu bildirilmiştir⁷.

Gentamisin günde 40 mg/kg dozunda 10 gün süreyle uygulandığında böbrek korteksinde nekroza, toplayıcı kanallar, distal tübüller ve proksimal tübüllerin düz segmentlerinde ise harabiyete yol açmaktadır. Genellikle bir haftalık uygulama sonrasında oliguri görülmeksizin BUN ve kreatinin düzeylerinde yükselme izlenmektedir. Nefrotoksisite gelişmesinde cinsiyet, yaş ve kullanım süresinin etkili olduğu, yaşlı ve erkeklerde daha yoğun bir nefrotoksik etki oluşturduğu bildirilmiştir. Tedavi süresi ile nefrotoksisite arasındaki ilişki incelenmiş ve 14 günden fazla tedavi olanların % 50'den fazlasında, 8-14 gün arası tedavide % 30, 3-7 gün arası tedavide % 4 oranında toksik etki görülürken, 3 günden az olan tedavide ise toksik etki görülmediği bildirilmiştir⁹⁷.

Gentamisin nefrotoksisitesinde farklı mekanizmaların rol oynadığı kabul edilmektedir. Bunlar renal tübüler toksik etki, glomerüler filtrasyonda ve renal kan akımında azalma olarak sıralanmaktadır. Bu mekanizmalardan en önemlisi renal tübüler toksisitedir¹⁴. Bu toksisitede oksidatif stresdeki artışa bağlı olarak gelişen olayların etkili olduğu benimsenmektedir⁹⁸. Gentamisinin böbreklerde mitokondri kaynaklı süperoksit anyonu oluşumunu arttırdığı, elektron transport zinciri ve ATP oluşumunu inhibe ettiği, apoptoz, DNA hasarı ve lipit peroksidasyonunu uyararak böbreklerde hasara yol açtığı bildirilmiştir⁹⁷.

Gentamisin vücuda verildikten sonra glomerülden süzülmemektedir. Süzülen ilacın sadece % 2-5 gibi küçük bir oranı bağlanır ve aktif olarak proksimal tübül hücrelerine taşınır. İlaç, proksimal tübül hücrelerine apikal fırçamsı yüz ve bazolateral yüzlerden endositoz yolu ile alınarak lizozomlarda birikmektedir^{7,95}. Ortaya çıkan hasarlar; bazal membran erozyonları, proksimal tübül hücre şişkinliği ve fırçamsı kenarda mikrovilus kayıpları, tübüler atrofi veya dilatasyon, interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonları⁹⁹ ve bazolateral membran katlantılarının azalmasıdır¹⁰⁰. Fırçamsı kenar transportu nefrotoksisite için daha önemlidir. Çünkü bu mekanizmanın işleyişinde mitokondri ve

mikrozomlar gibi anahtar organellerdeki kritik bölgelerin ilaca maruz kalması söz konusu olmaktadır¹⁰¹. Ancak tübüldeki antibiyotik konsantrasyonu her zaman nefrotoksisite ile paralellik göstermemektedir. Gentamisin, glomerülden filtre olduktan sonra, proksimal tübül hücrelerine, bu hücrelerde bulunan megalin reseptörüne bağlanarak geçer ve özellikle proksimal tübülün daha çok kıvrımlı bölümünü içeren S1 ve S2 kısımlarında birikerek toksik etkisini gösterir^{95,102}. İlacın proksimal tübülden geri emilim mekanizmasının L-lizin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu yüzden gentamisin ve L-lizin böbrek proksimal tübül hücrelerinin apikal membranında lokalize olmuş özel bir geri emilim mekanizmasını paylaşmaktadırlar¹⁰³.

Gentamisin nefrotoksisitesinin olası mekanizmalarını aydınlatmak için çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. İleri sürülen bazı mekanizmalar özetle şunlardır¹⁰⁴:

1) Hidroksi radikaller doku hasarında güçlü medyatörlerdir. Bunlar Fenton reaksiyonu yolu ile metal şelatörlerle reaksiyona girebilirler ve çoklu doymamış yağ asitleri içeren geniş çeşitlilikte organik bileşikleri oksitleyebilirler. Böylece protein dejenerasyonuna ve hücre membran hasarına neden olurlar.

2) Böbrek korteksinde fosfolipid üretiminde artış olması.

3) Na-K-ATPaz enziminin inhibe edilmesi.

4) Tromboksan A₂ ve prostoglandinlerde artış olması.

5) Mikrozomal protein sentezinin etkisi.

6) Lizozomal hasarın oluşması.

7) Mitokondriyal hasarın oluşması.

8) Vasküler faktörlerin etkisi.

2.1.4. Böbrek Hasarı Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Belirteçler

Böbreklerin kanı süzmesi sonucunda idrar oluşmaktadır. Pürin bazlarının yıkımıyla ürik asit, proteinlerin yıkımıyla da amonyak oluşmaktadır. Hücreler için

oldukça toksik bir madde olan amonyak, karaciğerde üre haline dönüştürülmektedir. Vücutta oluşan buna benzer toksik metabolik atıklar idrar ile birlikte dışarı atılmaktadır¹⁰⁵. Böbreklerde akut veya kronik yetmezlik söz konusu olduğunda vücutta nitrojen metabolizmasının son ürünleri birikmekte ve non-protein nitrojenlerin düzeyi yükselmektedir. Bu da kan üre-nitrojeni (BUN) ve serum kreatinin düzeylerinde yükselmeye neden olmaktadır. Nitrojen ürünlerinin birikimi sonucu “azotemi” gelişmektedir. Bu durum ise böbreklerin metabolizma artıklarını atabilme yeteneklerini kaybettiği “üremi” ile sonuçlanmaktadır¹⁰⁶.

Böbrek yapısında ve fonksiyonlarındaki değişikliklerin belirlenmesi için etkin çalışmalar hem idrar, hemde kanda yapılan bir takım testleri içermektedir. İdrar tahlili testinin sağlayacağı yarar, böbreklerin idrarı konsantre etme yeteneğinin bozulması ve proteinürinin belirlenmesinde, kan testlerinin ise glomeruler filtrasyon hızının (GFR) indirekt göstergesinin tespitinde etkilidir. Böbrek fonksiyonunu değerlendirmede ayrıca renal plazma ve kan akımı, glomerular filtrasyon hızı, filtrasyon fraksiyonu gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Biyokimyasal ve kan muayeneleri sonucu fonksiyonel değişiklikler gözlenen olgularda çoğu zaman histopatolojik incelemelerin yapılmasıyla da böbrek hasarının net tablosu ortaya konulabilmektedir¹⁰⁶.

ABH’de mortalite oranları ile Scr konsantrasyonları arasında paralellik olduğu ve ABH’nin erken teşhisi ile mortalite oranlarının oldukça düşebileceği bildirilmiştir^{2,55}. Kanda BUN seviyesinin yükselmesi böbrekteki vazokonstrüksiyonun önemli bir habercisi olup, BUN ve Scr konsantrasyonlarının birlikte artışı ise ABH oluştuğunu göstermektedir⁵⁵. Scr konsantrasyonunda 0,5 mg/dl üzerinde bir artış, kreatinin klirensinde ise % 50’lik bir azalma ABH olarak tanımlanmaktadır. Scr konsantrasyonu genellikle GFR için BUN’dan daha iyi bir belirleyicidir. GFR’de büyük azalma başlangıçta Scr konsantrasyonlarında çok küçük artışlara (0,1-0,3 mg/dl) neden olmaktadır^{2,9}.

Böbrek işlevinin değerlendirilmesinde kreatinin, üre, nitrojen düzeyleri gibi tetkiklere gereksinim duyulmaktadır. Söz konusu maddelerin serum ve idrarda eş zamanlı ölçümleri ile (örneğin kreatinin klirensi) klinik olarak belirgin bulgu vermeyen bazı bozukluklar dahi ortaya çıkarılabilmektedir. Glomerüler filtrasyon hızında belirgin bir düşüşün söz konusu olduğu durumlarda elektrolit ve asit-baz dengesi ile ilgili ölçümlere

(serum ve idrar Na^+ düzeyi, kan pH'ı, total CO_2 ve pCO_2 düzeyi gibi) gereksinim duyulabilir⁷¹.

Bir maddenin klirensi GFR'ye paralel ise filtrasyondaki bir azalmaya bağılı olarak bu maddenin serum konsantrasyonunun artması beklenir. Normal koşullarda üretim hızının göreceli olarak sabit olduğu varsayılırsa söz konusu maddenin dolaşımdaki miktarının saptanması GFR'yi belirlemede yararlı olabilir. Bu nedenle, böbrek yetmezliği durumlarında kan kreatinin ve üre düzeyi ölçümlerine sıkça başvurulur⁷¹.

2.1.4.1. Glomeruler Filtrasyon Hızı

Her iki böbreğin tüm nefronlarında birim zamanda üretilen glomeruler filtrat miktarı glomeruler filtrasyon hızı olarak tanımlanmaktadır. Normal bireyde yaklaşık 125 ml/dk dır, bu da 24 saatlik dilimde üretilen glomeruler filtratın yaklaşık 150-180 lt olduğu anlamına gelmektedir. Ultrafiltrat denilen bu sıvının % 99'u resorbe edilip geri kalan % 1'lik kısmı, idrar olarak atılmaktadır⁴⁰.

Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde en yararlı belirleyici GFR'dir. Her iki böbrekteki fonksiyon gören nefron sayısının, her nefron birimine ait GFR ile çarpımı total GFR'yi verir. Birim nefrona ait filtrasyon hızının düşmesi ya da fonksiyon gören nefronların hasarlanarak sayılarının azalması, GFR düşüşüne neden olmaktadır. Glomeruler filtrasyon hızı böbreklerin bir dakika içerisinde herhangi bir A maddesini kaç ml plazmadan arındırdıklarını göstermektedir³.

2.1.4.2. Kan üre nitrojeni (BUN)

Mol kütlesi 60 g/mol olan üre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), vücutta protein metabolizması sonucunda ortaya çıkan amonyaktan, karaciğer tarafından sentezlenmektedir. Glomerüllerden serbestçe filtre edilmektedir. Üre içindeki nitrojen değeri BUN olarak ifade edilmektedir. BUN değerlerinde değişikliğe sebep olan bazı nedenler arasında aminoasit infizyonu, fazla protein alımı, GİS kanaması ve bazı ilaçların kullanımı

sayılabilmektedir. Tübülde reabsorbsiyona uğradığı için, renal bozukluk olmadan da kan BUN oranlarında değişimler olabilmektedir^{107,108}.

Kan üre düzeyi prerenal (aşırı üretim, azalmış böbrek kan akımı), renal (parankimal böbrek hasarı) veya postrenal (genitoüriner sistem obstrüksiyonu) nedenlere bağlı olarak değişebilmektedir. Dolaşımdaki üre düzeylerinin aşırı üretime bağlı olarak yükseldiği durumlarda BUN 40 mg/dl'yi nadiren geçmektedir. Bunun üzerindeki BUN düzeyleri ise renal hasar, idrar yollarında tıkanıklık veya böbrek kan akımında azalma gibi nedenleri düşündürmektedir²⁴.

Kan üre düzeyi ağır doku harabiyeti veya akut açlığa bağlı doku katabolizmasındaki artış gibi olgularda ve özellikle renal işlev bozukluğunda normalin üzerine çıkabilmektedir. Plazma üre konsantrasyonundaki yüksek artış renal işlev bozukluğunun göstergesidir. Ayrıca, neonatal diyarede kan üre konsantrasyonu kısmen yetersiz beslenmeye bağlı protein depolarının mobilizasyonu sonucu karaciğer üre sentezindeki artışa bağlı olarak artmaktadır. Dehidratasyon ve laktik asidozda da kan üre nitrojeni konsantrasyonlarında artma gözlenmektedir¹⁰⁷.

BUN anormal seviyeye ulaşmadan önce GFR % 75 azalır. Birçok böbrek dışı sebep BUN seviyesini değiştirebilir. Açlık ve karaciğer hastalıkları durumunda daha çok düşük değerler beklenirken yüksek protein alımı, gastrointestinal sistemde kan ve artmış katabolizmada BUN artışı gözlenebilir. Normal BUN değerleri 8-20 mg/dl'dir. BUN konsantrasyonundaki bozukluk GFR için çok önemli bir kriterdir. Ürenin büyük bir kısmı reabsorbe edilir ve yaklaşık idrar akım miktarı az olduğunda filtre edilenin % 60'ı, yüksek iken % 40'ı reabsorbe edilir. BUN konsantrasyonunun 50 mg/dl'nin üzerinde olması genellikle böbrek bozukluğu ile ilişkilidir².

2.1.4.3. Kreatinin

Kreatin; kasların enerji metabolizmasında rol oynayan, yüksek enerjili bir fosfat bileşiğidir. "Kreatin fosfat"ın ve "kreatin"ın, non-enzimatik bir reaksiyonla spontan bir şekilde yıkılmasıyla oluşan artık ürün, molekül ağırlığı 113 dalton olan "kreatinin"dir¹⁰⁷. Karaciğerde gerçekleşen kreatinin yapım oranı, kas kitlesi ile ilişkilidir¹⁰⁹. Kas dokusunda

mevcut kreatin'in % 1-2 kadarı her gün yıkılarak kreatinin'e dönüşmektedir. 1 mg kreatinin yaklaşık 20 mg kasın günlük metabolizması sonucunda üretilmektedir¹⁰⁸.

Kreatinin, glomerüllerden serbestçe filtre edilmekte, proteine bağlanmamakta, böbreklerde metabolize olmamakta, sekresyona uğramakta, bazen tübüllerden geri emilmektedir. Kreatinin, distal nefrondaki ihmal edilebilir sekresyonu hariç tutulursa ne reabsorbe ne de sekrete edilmeden serbestçe filtre edilmektedir. Bu yüzden glomerüler fonksiyonu göstermekte etkilidir¹¹⁰. Sağlıklı bir insanda kreatinin tübüler sekresyonu % 10-15'tir ve ilerlemiş böbrek fonksiyon bozukluklarında bu oran % 40'a kadar çıkabilmektedir. Tıbbi değerlendirme açısından serum kreatinin (Scr) düzeyi, üre testlerinde çıkan sonuçlara göre daha değerli sonuçlar vermektedir^{107,109}.

Kreatinin klirensi ise 24 saatlik idrar toplanmasının ardından idrar kreatinin düzeyi ve serum kreatinin düzeyinin dakika idrar volumüne dönüştürülerek klirens formülüne uyarlanması ile bulunmaktadır. Klirens kavramı birim zamanda ilgili maddeden temizlenen plazma volumünü ifade etmektedir. GFR'nin spesifik bir göstergesidir. Normal değerlerinin sınırları geniş olduğundan serum kreatininde % 50' lik artış GFR'de % 50' lik düşüşü göstermektedir. Genel böbrek fonksiyonlarının göstergesi olarak serum kreatinin konsantrasyonu ve klirensi kan üre azotunun benzer ölçümlerinden daha anlamlıdır⁶⁹.

Böbrek yetmezliğinin derecesinin saptanmasında, ilaç dozunun ayarlanmasında, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde, kronik diyaliz ihtiyacının tesbitinde ve GFR ölçülmesinde kullanılan en sık yöntem kreatinin klirensinin hesaplanmasıdır⁴⁰.

Araştırmacılar renal fonksiyonu değerlendirmede serum kreatinin düzeyleri ölçümünü üre düzeylerine göre daha üstün kabul etmektedirler ancak genel eğilim her 2 kriterin birlikte değerlendirilmesi yönündedir. Böylece ölçümlerden birisinde olabilecek bir hata diğeri ile ekarte edilebilmektedir. Ayrıca BUN/serum kreatinin oranı ile bozukluğun etiyojisi hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir¹¹⁰.

BUN/serum kreatinin oranı normalde 10/1 ile 12/1 arasında olmalıdır. Parankimal hasar durumunda BUN ve kreatinin düzeylerinin her ikisi de azalacağından bu oran değişmez. Bu oranın yükselmesi gastro intestinal sistemde aşırı kanama, steroidler ve tetrasiklinler gibi protein yıkımını artırıcı (katabolik) ilaçların kullanımı, karaciger

hastalıkları ve idrar akımının azalması gibi aşırı üre üretiminin olduğu durumları düşündürmektedir. İdrar akım hızının azalması, kreatinin sekresyonunu doğru orantılı olarak artırmadan üre reabsorpsiyonunun artmasına yol açar. Bu duruma dehidratasyon, konjestif kalp yetmezliği, hepato renal sendrom veya üriner sistem obstrüksiyonu gibi patolojilerde rastlanmaktadır²⁴.

2.1.5. Deneysel Nefrotoksik Akut Böbrek Hasarı Modelleri

İnsanda akut böbrek hasarı (ABH) genelde birden fazla nefrotoksik etkenin kombinasyonu (örneğin iskemi, gentamisin, kontrast madde) sonucunda ortaya çıkarken, hayvanda deneysel akut böbrek hasarı modelleri genel olarak tek bir nefrotoksinin çok yüksek dozda ciddi derecede renal fonksiyon bozukluğu oluşturmaya dayandırılmaktadır. Bu açıdan insandaki ATN ve deneysel hayvan toksik ATN modelleri arasında fark bulunmaktadır ve patofizyolojik değişiklikler yorumlanırken bu durumun göz önüne alınması gerekmektedir. Nefrotoksik ABH modellerinde böbrekte baskın olan lezyon proksimal tübül hasarı ile karakterizedir¹¹¹.

Proksimal tübül, enerji üretimi için oksidatif fosforilasyona bağımlıdır. Proksimal tübülün, sadece son kısmını oluşturan S3 segmenti haricinde anaerobik glikoliz kapasitesi bulunmamaktadır. Dolayısıyla, kan akımının kesintiye uğradığı iskemik durumlarda veya toksin aracılığıyla oksidatif metabolizmada bozukluk yaratan durumlarda ATP eksikliği proksimal nefronu özellikle hassas hale getirmektedir. Proksimal tübülün suya geçirgenliğinin yüksek olması ve glomerüler filtratın daha ilk aşamada bu bölgeden büyük ölçüde reabsorpsiyonu, proksimal tübül hücrelerini hasar etkeni ile önemli ölçüde karşı karşıya bırakmaktadır. Bir başka faktör ise, proksimal tübülün hipoksik durumda epitelyal polaritesini hızla kaybetmesidir ki bu durum fırçamsı kenarın kaybı ile karakterize olup ciddi hipoksik hasar göstergesi olarak kullanılmaktadır¹¹². Hipoksik hasara karşı koyma mekanizmasının distal nefron düzeyinde iyi geliştiği gösterilmiştir. Distal tübülün henlenin kalın çıkan kolu düzeyinde hipoksik bir uyarana, çeşitli büyüme faktörlerinin transkripsiyonu ve hızlı apoptotik sinyal indüksiyonuna neden olarak bir tür savunma sistemi oluşturmaktadır. Yine distal tübülde hipoksi durumunda transport aktivitesi inhibe olmakta ve iş yükünün azalması da bir tür koruma sağlamaktadır, ancak

bu durum proksimal tübül için söz konusu olamamaktadır¹¹³. Çeşitli in vivo ABH modellerinde de, özellikle hipoksik etki oluşturan uyaranların kombine kullanımı ile henlenin çıkan kalın kolu düzeyinde selektif ve ciddi hasar olduğu gösterilmiştir¹¹⁴.

Gentamisin, deneysel toksik ABH modellerinde en sık kullanılan ilaçlardan biridir. Farklı deney hayvan türlerinin aminoglikozit duyarlılığı farklılık gösterebilmektedir. Sağlıklı hayvanlara uygulandığında nefrotoksisite oluşturmak için klinik eşdeğer dozların 5-10 katının kullanılması gerekmektedir. Nefrotoksisite için genellikle parenteral olarak 100-200 mg/kg dozlarında 3-6 gün uygulanması gerekmektedir^{83,114,115}. Dokudaki yarı ömrü serum yarı ömründen daha uzundur. Yapılan çalışmalarda; sıçanlarda gentamisinin serumdaki yarı ömrü 30 dakika iken, renal dokudaki yarı ömrü 109 saat olarak gösterilmiştir⁷⁸.

2.2. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

2.2.1. Serbest Radikaller

Fizyolojik ve patolojik olaylarda, diğer moleküllerle elektron alışverişine girip yapısını değiştiren atom veya moleküller, “serbest radikaller” veya “serbest oksijen radikalleri” (SOR) olarak adlandırılmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, normal hücresel aerobik metabolizmanın bir yan ürünü olarak mitokondri tarafından oksidatif fosforilasyon sırasında üretilmektedirler. Bu radikaller, yapısında bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron bulundurabilen, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen son derece reaktif bileşiklerdir. Bu bileşiklerdeki eşlenmemiş elektronun varlığı koyu bir nokta (·) konarak belirtilir. En önemlileri; süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoksil radikali ($HO^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), alkoksil radikali ($RO^{\cdot-}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot-}$), $NO^{\cdot-}$ ve $NO^2^{\cdot-}$ radikalleridir. Radikal olmayan oksijen merkezli ve reaktivitesi oldukça yüksek diğer bileşikler, singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), hipoklorid asit ($HOCl$), lipid hidroperoksit ($LOOH$) ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$)’tir¹¹⁶.

Serbest radikaller, etkileşime girdikleri molekülden bir elektron alarak ya da ona bir elektron vererek molekülün yapısını bozarlar. Böylece radikal olmayan bir yapıyı, radikale dönüştürürler¹¹⁷.

SOR'lar, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı olarak normal veya patolojik olaylarda, aerobik metabolizma ile sürekli üretilmektedirler. Mitokondrilerdeki oksijenli solunum gibi birçok anabolik veya katabolik reaksiyonlar esnasında moleküler düzeyde gerçekleşen elektron kaçışları ile birlikte SOR'lar oluşabilmektedir¹¹⁸.

Oksijenin metabolize edildiği canlılarda ortamda oksijen varlığında çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri oluşmaktadır³⁷. Aerobik metabolizması olan canlılarda SOR genellikle oksijen (O₂)'den üretilmekle birlikte organizmada oksijen türevi SOR dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır¹¹⁹. Kimyasal maddelere maruz kalma, karbontetraklorür, sigara dumanı gibi çevresel faktörler, iyonize ve ultraviyole radyasyon, parasetamol gibi ilaç toksisiteleri, bleomisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, SOR oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklı etmenlerdir¹²⁰.

Tablo 2.2. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları¹²¹

1.Normal biyolojik işlemler	1.Oksijenli solunum 2.Katabolik ve anabolik işlemler
2.Oksidatif stres yapıcı durumlar	1. İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite 2. Ksenobiotik maddelerin etkisi a) İnhalasyon b) Alışkanlık yapan maddeler c) İlaçlar 3. Oksidan enzimler a) İndolamin dioksigenaz b) Triptofan dioksigenaz c) Galaktozoksidaz d) Siklooksigenaz e) Lipooksigenaz f) Monoaminoksidaz 4. Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu 5. Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler) 6. Uzun süreli metabolik hastalıklar 7. Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara
3.Yaşlanma Süreci	

Hayati işlevler için gerekli olan oksijen, serbest oksijen grubuna yol açarak toksik etki oluşturabilmekte ve çoğu hastalığın patogeneğinde serbest oksijen grupları rol oynamaktadır. Serbest radikaller doku ve hücrede DNA hasarı, enzim inaktivasyonu, lipit peroksidasyonu, yaşlılık pigmentlerinin birikimi ve zar yapılarının ve fonksiyonlarının etkilenmesi gibi hasarlara sebep olmaktadır³⁷.

Vücudumuz serbest radikallerin etkilerine karşı hücrelerini koruyabilmek amacıyla savunma sistemleri oluşturmuştur. Hücre içi ve hücre dışı olmak üzere sınıflandırılan bu sistemlere antioksidan sistemler adı verilmektedir¹²⁰.

2.2.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller mitokondrinin yanı sıra başka organellerde serbest veya zara bağlı halde bulunan çeşitli enzimlerin reaksiyonu sırasında da oluşabilmektedir. Oluşan SOR'lar tüm hücre bileşenleri ile etkileşip onların yapı ve fonksiyonlarını bozabilecek özelliğe sahiptir. DNA'da bazların parçalanması, DNA kollarının kırılması ve denatürasyon gibi yapısal değişiklikler olurken; oksidasyona uğrayan proteinlerin yapı ve fonksiyonları bozulmaktadır¹²¹.

Hücreler, serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için çeşitli antioksidanlar üretmektedirler. Serbest radikallerin oluşumları ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilmeleri arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge sayesinde hücreler serbest radikallerin olumsuz etkilerinden kendilerini korumaktadırlar. Bu dengenin serbest radikaller lehinde bozulması halinde hücrede serbest radikaller artış göstermektedir. Serbest radikallerin hücredeki bu artışına ve hücre fonksiyonları üzerinde yapmış olduğu olumsuz etkiye “oksidatif stres” denilmektedir¹¹⁹.

Serbest radikallerin oluşturduğu olumsuz durumlardan birisi de lipit peroksidasyonudur. Lipit peroksidasyonu; özellikle hücre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinde başlayıp zincirleme uzayan bir süreçtir. Bu sürecin sonucunda zardaki taşıma sistemleri zarar gördüğü gibi, hücre içi ve dışı iyon dengeleri de bozulmaktadır. Hücre içi kalsiyum düzeylerinin artması da proteazları aktiflemektedir. Bu olayların hücre hasarında etkin rol oynadığı iyi bilinmektedir¹¹⁶. Nitekim çoklu doymamış yağ

asitlerindeki çift bağların peroksidasyon etkisi ile yer değiştirmesi sonucu “dien” konjugatı oluşması, meydana gelen peroksitlerin son ürün olan aldehit ve karbonilli bileşiklere dönüşmesi, hasar tespitinde oksidatif sürecin rolünü tayin ederken, kullanılan bazı ölçümlerin de temelini oluşturmaktadır¹²⁰.

Organizmada oksidatif stres hasarının belirteci olarak kabul edilen malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonu sırasında ortaya çıkmakta ve kolayca tespit edilebilmektedir. Bu madde, protein ve fosfolipidlerle çapraz bağ ve polimerizasyon yaparak özelliklerinin kaybolmasına sebep olmaktadır. MDA, hücrenin her tarafına dağılarak, özellikle sülfidril içeren enzimleri inaktive etmektedir. Nükleik asitlerle etkileşmeye girerek genetik şifrede mutasyona yol açmaktadır. Sonuç olarak iyon transport bozuklukları, enzim aktivite değişiklikleri, hücre bileşenlerinin agregasyonu gibi değişiklikler ortaya çıkarabilmektedir¹²¹.

MDA kanda ve idrarda ortaya çıkmakta, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit düzeylerinin belirleyicisi olarak kullanılmaktadır¹¹⁹.

2.2.3. Antioksidan Sistem ve Antioksidan Maddeler

Serbest radikalleri ortadan kaldıran, oksidasyonu engelleyen ya da oksidasyon reaksiyonunun gecikmesine neden olan maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denmektedir. Antioksidanlar, SOR'ları etkisiz hale getirip, reaksiyonları yavaşlatıp, sonlandırmakta ya da SOR'ların olumsuz etkilerini azaltmaya çalışmaktadırlar¹¹⁶.

Bazı araştırmacılar antioksidan savunmayı enzimatik savunma ve nonenzimatik savunma olarak gruplandırmışlardır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-S-transferaz (GST)'in rol aldığı antioksidan aktivitelerini “enzimatik antioksidan savunma”; vitamin A, vitamin E, askorbat, GSH gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini ise “nonenzimatik antioksidan savunma” şeklinde adlandırmışlardır¹²².

Antioksidan savunma sistemi, gerek özel enzimlerle gerekse radikal tutucu denilen bileşiklerle radikal oluşumunu sınırlama, tetiklenen reaksiyonların kırılmasını sağlama, oluşan radikalleri yok etme ve hasarlanmış molekülleri tamir etme ve ortadan kaldırma gibi mekanizmalarla etkili olmaktadır. Hücrenin temel indirgen gücünün bir elemanı olan glutatyon (GSH), C vitamini ve ürik asit suda çözünen; E vitamini, β -karoten, bilirubin, flavonoidler ise yağda çözünen radikal tutuculardan bazılarıdır. Oksidasyona sebep olacak metal iyonlarını bağlayabilen ferritin, transferrin, haptogloblin, seruloplazmin ve albümin de radikal tutucusu olarak fonksiyon yapabilmektedir^{116,121}.

Antioksidanlar etkilerini dört farklı mekanizma ile ortaya çıkarmaktadırlar¹²² :

- 1) Toplayıcı Etki: Enzimler tarafından oksidanları zayıf bir moleküle çevirerek temizlerler.
- 2) Bastırıcı Etki: Vitaminler ve doğal bitkisel ajanlar aracılığıyla oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirip baskırlar.
- 3) Onarıcı Etki: Zarar görmüş doku ve hücreleri onarırlar.
- 4) Zincir Kırıcı Etki: Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini tarafından oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engellerler.

Oksidan moleküllerin hücreye zarar vermesini önleyen, enzimatik veya nonenzimatik yapıda olabilen antioksidan moleküller; organizmada sentezlenebilmekte (endojen) veya dışarıdan alınabilmektedir (ekzojen)²⁷.

2.2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: Süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT) ve Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi

Tablo 2.3. Başlıca enzimatik endojen antioksidanlar

Antioksidan	Reaksiyonu
SOD	$O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir
GSH-Px	LOOH'lerin indirgenmesinden sorumludur. Özellikle eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan enzimdir
GR	GSH-Px vasıtasıyla LOOH'lerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonu (GSSG) tekrar redükte glutatyon (GSH) dönüşümünü kataliz eder
GST	Lipid peroksitlere karşı GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizması oluşturur
CAT	H_2O_2 'i ve $\cdot OH$ radikallerinin oluşumunu önlemek için bunları su ve oksijene parçalar

Süperoksit Dismutaz (SOD): Oksidatif strese karşı savunmanın ilk basamağını oluşturan bu enzim, radikallerden korunmada ana mekanizmadır. İnsanlarda mitokondride bulunmaktadır. Etkin olarak hücre hasarına sebep olan süperoksit grubu, SOD aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) çevrilir. Daha az toksik bir yapıya sahip olan H_2O_2 , dokularda bulunan peroksidaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi hücre içi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir¹¹⁶.

Katalaz (CAT): Hidrojen peroksiti suya ayrıştırarak hidroksil radikallerinin oluşumuna engel olarak ya da yok ederek hidroksil serbest radikali oluşumunu önlemektedir. Katalaz kanserli dokularda, sağlıklı dokulara göre daha yüksek oranda bulunmaktadır. Bu durumun tümör hücrelerinde enzim ekspresyonundaki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir¹²².

Birçok memeli hücre tipinde yer alan CAT, çok farklı konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Enzim, böbrek ve karaciğerin peroksizomları gibi subselüler organellerde veya diğer hücre çeşitlerinde bulunan mikroperoksizomlar gibi daha küçük organellerde yerleşmiştir. Karaciğer, böbrek gibi yüksek CAT içeriği olan organlarda düşük H_2O_2 konsantrasyonu, düşük CAT içeriği olan kalp, beyin gibi dokularda daha fazla H_2O_2 konsantrasyonu bulunmaktadır¹²³.

Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz: Solunum işlemindeki son enzim olan mitokondriyal sitokrom oksidaz, süperoksidin toksik etkisini nötralize eder ve bu işlemler

normal şartlarda sürekli devam eder. Sonucunda bol miktarda enerji üretimi (ATP) ortaya çıkar¹¹⁶.

Glutatyon-S-Transferaz (GST): GST'ler üç sitozolik, bir de mikrozomal gruba ayrılırlar. Yabancı maddeleri GSH'deki -SH grubu ile bağlayarak nötralize ederler. Bu şekilde ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlayarak, organizmadan atılımını kolaylaştırırlar¹¹⁹.

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px): Bu enzim, H₂O₂ ve organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu sağlayarak hücre membran lipidlerini oksidatif hasara karşı korumaktadır. Hücrelerdeki GSH redoks döngüsünün, H₂O₂ ve ROOH'lerin indirgenmesinde hayati önemi vardır. Bu döngünün anahtar enzimi GSH-Px, substratı ise GSH'dır. Bu enzim özellikle eritrositlerin membran bütünlüğünün sağlanmasında görev yapmaktadır. GSH-Px enzimi iki farklı kategoride ele alınmaktadır¹¹⁹;

Selenyuma bağımlı GSH-Px: Bu sitozolik enzim, monomerik yapıda selenyum ihtiva etmektedir. Özellikle eritrositlerde bulunan GSH-Px, selenyuma bağımlı olarak görev yapmaktadır.

Selenyumdan bağımsız GSH-Px: Diğer dokularda da bulunmakla birlikte özellikle karaciğer mitokondrilerinde aktivite göstermektedirler.

Okside glutatyon (GSSG)/GSH oranı oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Örneğin eritrositlerde bu oran 1/500 seviyesindedir. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açarak eritrosit hasarına neden olabilmektedir. Antioksidan etkinliği kanıtlanmış olan E vitamininin özellikle membranlarda sınırlı olduğu durumlarda GSH-Px, membranları peroksidasyona karşı korumaktadır¹²⁰.

2.2.3.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar

E vitamini, C vitamini, transferrin, serüloplazmin, karoten, albümin, bilirubin gibi maddeler, hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesinin sınırlı olması sebebiyle antioksidan aktivite oluşturmaktadırlar.

Tablo 2.4. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Antioksidan	Etkileri
Melatonin	Lipofilik özellik göstermesinden dolayı hücrenin hemen hemen bütün organellerine kadar ulaşarak geniş bir dağılım gösteren melatonin $\cdot\text{OH}$ ve $\text{O}_2\cdot^-$ radikallerini tutarak antioksidan etki gösterir
Seruloplazmin	Ferro demiri (Fe^{+2}), ferri demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve $\cdot\text{OH}$ oluşumunu engeller
Transferrin	Serbest Fe iyonlarını bağlayarak Fenton reaksiyonunu önler
Laktoferritin	Düşük pH'lı ortamlardaki Fe iyonlarını bağlar
GSH	Hb'in oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini önler
Sistein	$\cdot\text{OH}$ ve $\text{O}_2\cdot^-$ topplayıcısıdır
Ürik Asit	Genelde metal bağlayıcı olarak çalışırken değişik radikalleri de toplar
Glukoz	$\cdot\text{OH}$ gidericisidir
Albumin	Proteini ve metal iyonlarını bağlar
Bilirubin	Önemli bir $\text{LOO}\cdot$ topplayıcısıdır

Glutasyon (GSH): Hem endojen hem de eksojen bir antioksidan olup, DNA hasarını önleme ve onarma, metabolik artıkların inaktif hale getirilmesi ve vücudu serbest radikallere karşı korumakla görevlidir. GSH'nin karaciğerde biri sitozolik diğeri de mitokondrial olmak üzere iki havuzu bulunmaktadır. Eksikliği nekrozlara sebep olabilmektedir¹¹⁶.

Tripeptit yapıdaki glutasyon; glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşmaktadır. Hemen hemen tüm hücrelerde bulunmakta ve antioksidan olarak metabolik faaliyetler sırasında çok önemli rol oynamaktadır. Glutasyon, GSH ve GSSG olmak üzere iki formda bulunmaktadır. GSH formu hücrede baskın olan formdur¹¹⁹.

C Vitamini (Askorbik Asit): Askorbik asit suda eriyen ve dolayısıyla sulu ortamda süperoksit ve hidroksil radikallerini temizleyerek etkinlik gösteren bir vitamindir. Ayrıca ateroskleroza karşı koruyucu etkisi vardır ve LDL kolesterolün oksidasyonunu önler. Yokluğunda E vitamini ve GSH yenilenemez¹²².

E Vitamini (α -tokoferol): Yağda çözünen E vitamini, hücre membranında ve lipoproteinlerde bulunup oksijen radikallerinin zincir kırıcısı ve ana temizleyicisi olarak görev yapmaktadır¹¹⁷.

A Vitamini: A vitamini organizmada görme, üreme, büyüme ve epitel dokusunun sağlamlığını devam ettirme görevlerini yerine getirmektedir. E vitaminine göre daha zayıf bir antioksidandır. E vitamini tükendikten sonra kullanılmaktadır¹²².

Diğer non-enzimatik antioksidanlar, α -lipoik asit, bakır, çinko, selenyum gibi elementler; folik asit, ürik asit, albumin gibi ko-faktörler; B₁, B₂, B₆, B₁₂ gibi vitaminlerdir²⁷.

2.3. *Cyclotrichium Niveum*

Cyclotrichium niveum bitkisi Lamiaceae familyasının bir üyesi olup ülkemizde yetişen endemik bir türdür³³. Lamiaceae familyası dünyada yaklaşık 250 cins ve 7000 tür ile temsil edilmektedir. Bu familya üyeleri Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere; Avusturalya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika'da yoğun yayılım göstermektedir. Türkiye Lamiaceae familyasının önemli gen merkezlerinden biridir. Bu familya ülkemizde 42 cinse ait yaklaşık 570 tür ile temsil edilmektedir¹²⁴. Ülkemizdeki endemizm oranı yaklaşık % 44,5 olan bu familya, içerdiği takson sayısı bakımından Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası konumundadır. Lamiaceae familyası üyelerinin çoğu, uçucu yağlar ve diğer sekonder metabolitler bakımından zengin olduğu için; tıp, eczacılık, gıda, kozmetik ve parfümeri gibi alanlarda oldukça büyük öneme sahiptir. Ayrıca bu familya üyelerinin ülkemizdeki etnobotanik kullanımı da oldukça yaygındır¹²⁵.

Lamiaceae familyasına ait olan *Cyclotrichium* genusu dünya genelinde Türkiye, Lübnan, Irak ve İran'da yetişen *C. origanifolium*, *C. leucotrichum*, *C. longiflorum*, *C. straussii*, *C. haussknechtii*, *C. niveum*, *C. glabrescens*, *C. stamineum*, *C. depauperatum* olmak üzere 9 türle temsil edilmektedir. Bu 9 türden 6'sı ülkemizde bulunmaktadır. *Cyclotrichium* türleri içerdikleri aromatik esansiyel yağdan dolayı baharat olarak kullanılmaktadırlar. Ülkemizde ayrıca bitkisel çay olarak da tüketilmektedirler. *Cyclotrichium* türleri Türkiye'de halk dilinde "dağ nanesi, kız otu, köpek nanesi, karabaş otu, naneruhu" olarak isimlendirilmektedir¹²⁶.

Cyclotrichium türleri başlıca uçucu yağ taşımakta ve bu yağın bileşiminde türlere göre, izopinokamfon, terpinen-4-ol, spatulenol, menton, timol, karvakrol ve pulegon gibi

sekonder metabolitler içermektedirler. “*C. niveum*” ise başlıca sekonder metabolit olarak “pulegon” içermektedir³³.

Ülkemizde endemik olarak yetişmekte olan *C. niveum* bitkisi genellikle “dağ nanesi” olarak bilinmektedir. *C. niveum* çok yıllık bir bitki olup, halk arasında çay olarak tüketilmektedir. Sivas’ta, grip, mide bulantısı ve kas ağrısı şikâyetlerinde halk tıbbına uygun olarak kullanımı bilinmektedir. Bunun yanı sıra Türk mutfağında çorba ve diğer yiyeceklerde lezzet ve koku verici özelliğinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir¹²⁵.



Şekil 2.5. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin genel görünüşü

Çetinus ve ark.³³ tarafından yapılan bir çalışmada *C. niveum* bitkisinin uçucu yağı GC/MS yöntemiyle analiz edilmiş ve bu yağın % 94.82’sini oluşturan bileşiklerin oranları tespit edilmiştir. Bu çalışmada uçucu yağın bileşiminin % 76.84’ünün pulegon, % 6.65’inin izomenton, % 3.01’inin ise izopulegondan oluştuğu görülmüştür. *C. niveumun* uçucu yağının GC/MS yöntemiyle analizinde aynı bileşiklerin farklı oranlarda tespit edildiğine dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu farklılıklar, iklimsel, mevsimsel, coğrafik ve jeolojik değişiklikler sonucu meydana gelebilmektedir. Ancak bu farklılıklara rağmen ana bileşik genellikle pulegon olarak bulunmuştur³³.

Gülçin ve ark.³⁴ tarafından yapılan bir çalışmada *C. niveum* bitkisine ait ekstrelerin, antioksidan, antimikrobiyal etki ve radikal temizleme kapasitesi incelenmiştir. Radikal temizleme ve antioksidan etkinin incelenmesi, 2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), radikal temizleme aktivitesi, 1,1-difenil-2-

pikril-hidrazil (DPPH) serbest radikal temizleme aktivitesi, ferrik tiyosiyanat yöntemi ile toplam antioksidan aktivite, potasyum ferrosiyanit redüksiyon metodu, süperoksit anyon temizleme aktivitesi, hidrojen peroksit temizleme ve demir iyonu şelat oluşturma aktivitelerinin değerlendirilmesine dayalı metotlarla yapılmıştır. Bitkinin antioksidan ve radikal temizleyici etkisi tespit edilmiştir. Bitkiye ait ekstrelerin antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri, 25 çeşit mikroorganizma üzerinde test edilerek gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak bitkinin sulu ve etanollü ortamda hazırlanan ekstrelerinin, antioksidan, antimikrobiyal etkilere sahip olduğu ve serbest radikal temizleme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir³⁴.

Başka bir çalışmada ise, *C. niveum* bitkisine ait metanollü ekstrelerin, DNA hasarını önleyici etkisi ve antioksidan etki gücü araştırılmıştır. Bu antioksidan potansiyeli, lipid peroksidasyonu, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), hidroksil radikal temizleme, indirgeme gücü, demir şelasyonu ve protein oksidasyonu üzerinde inhibitör etki oluşturma gibi, çeşitli in vitro sistemler oluşturularak incelenmiştir. Bitkinin metanollü ekstresi, dayanıklı bir serbest radikal olan DPPH'ı, EC50 değeri 78.15 µg/ml olacak şekilde indirgemeyi başarabilmiştir. Metal şelatı oluşturabilme kapasitesi ise EDTA ile kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuştur. FeCl₂-H₂O₂ sisteminin oluşturduğu lipid peroksidasyonuna karşı bu ekstre, güçlü inhibitör etki göstermiştir. Ayrıca, güçlü bir şekilde konsantrasyon bağımlı deoksiriboz oksidasyonu inhibitörü etki tespit edilmiştir¹²⁷. Bu çalışmanın devamında ekstrenin, hidrojen peroksit ve UV ışınına bağlı olarak DNA ayrılması üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda, DNA ayrılması üzerinde de koruyucu etki gözlenmiştir. Buna ilaveten, sığır serum albümininde hidroksil radikalleri tarafından oluşturulan hasar, *C. niveum*'un metanollü ekstrelerinin 10-1000 µg/ml konsantrasyon aralıklarında inhibe edilmiştir. *C. niveum*'un total fenolik içeriği, 1 mg ekstrakta 200.9 µg gallik asit olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçları, *C. niveum*'un metanollü ekstresinin belirgin bir antioksidan özellik taşıdığını göstermiştir¹²⁷.

C. niveum'a ait bir başka çalışmada ise bitkinin uçucu yağının antispazmodik ve radikal süpürücü etkisi incelenmiştir. Bu uçucu yağ doz bağımlı (0.1-0.5-1 mg/ml) olarak, karbakol ile tavşan mesanesinde oluşturulan kasılmayı % 15-100 arası bir oranda inhibe etmiştir. DPPH metoduyla yapılan ölçümde EC50 değeri 1.750 µg/ml olarak

bulunmuştur. Rat ileumunda görülen spontan kasılmalar üzerinde de *C. niveum*'un uçucu yağının doğrudan etkisi test edilmiştir. Bu testte, 0.1 mg/ml konsantrasyonda uygulama frekansı sabit tutulup, uygulama süresi azaltılarak, 0.5 mg/ml konsantrasyonda hem frekans hem de uygulama süresi azaltılarak ve son olarak 1 mg/ml konsantrasyonda hem frekans hem de uygulama süresi azaltılarak bir çalışma yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, % 100 inhibisyon 1 mg/ml konsantrasyon ile yapılan son deneyde elde edilmiştir³³. Yapılan başka bir çalışmada ise, *C. niveum*'un diklorometanlı ve etil asetatlı ekstralarının asetilkolinesteraz inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir¹²⁸.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

3.1.1. Bitkinin Toplanması

Deney çalışmasında kullanılacak olan *Cyclotrichium niveum* bitkisi, Adıyaman Nemrut Dağı bölgesi, Sincik ilçesi Pınarbaşı köyü mevkiinde, 1083 m. rakımda ve bitkinin çiçeklenme dönemi olan Temmuz ayında toplanmıştır. Toplanan bitki kısımları Adıyaman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim görevlisi Prof. Dr. Ahmet Zafer Tel tarafından teşhis edilerek 1382 no ile kayıt altına alınmış ve bir kısmı herbaryumda saklanmıştır.

Bitkinin topraküstü kısımları (yapraklar) diğer kısımlarından ayrılarak gölgede kurumaya bırakılmıştır. 10 gün kurutulduktan sonra alınan bitki kısımları deneyde kullanılmıştır.

3.1.2. Etanol Ekstresinin Hazırlanması

Bitkinin gölgede kurutulmuş yaprakları (150 gr) elektrikli blender ile toz edilmiştir. Toz edilen drog 750 mL etanol içerisinde 3 gün (72 saat) boyunca, manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Elde edilen etanol ekstresi süzgeç kâğıdından geçirilmiş, Rotary evaporatör (İSOLAB, LaborgerateGmbH) kullanılarak, 40 °C yi geçmeyecek şekilde vakum yardımı ile içerisindeki çözücü (etanol) uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan koyu yeşil renkli toz ekstre (14 gr), +4 °C de buzdolabında saklanmıştır.

Etanol ekstresini deney hayvanlarına oral yoldan verilecek duruma getirmek için bir preparat hazırlanmıştır. Bu preparatı hazırlamak için gerekli olan mikroemülsiyonlar, titrasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddeler farklı oranlarda karıştırılarak 9 ayrı formülasyon üzerinden

hazırlanmış ve optimum formülasyon seçilmiştir. Yağ (Isopropilmiristat), yüzey etkin madde (Cremofoz RH) ve yardımcı yüzey etkin madde (propilen glikol) tartılıp mekanik karıştırıcıda (500 rpm) karıştırılmış ve oda sıcaklığında (25°C) damla damla distile su eklenerek titre edilmiştir. Su ekleme işlemine bulanıklık görülen noktaya kadar devam edilmiş ve karışımın bozulmadan iç faza alabildiği distile su miktarı mililitre olarak kaydedilmiştir. Toz ekstre su fazında çözündürülerek sisteme eklenmiştir. Toplam formülasyonun % 5'i ekstre olacak şekilde hesaplanmış, deney hayvanlarına 200 mg/kg ve 400 mg/kg dozlarında uygulanmıştır.

3.1.3. Uçucu Yağ Hazırlanması

Bitkiden su buharı distilasyonu ile uçucu yağ elde edilmiştir. Bunun için bitkinin kurutulmuş yaprakları kullanılmıştır. Her bir denemede 25 gr bitki yaprağı Neo-clevenger cihazında su buharı distilasyonu yöntemi ile 3 saat boyunca ekstraksiyona tabi tutulmuştur. 4 tekrar sonucunda % 4.07 verimle elde edilen veriler 0.95 ml, 0.97 ml, 1.15 ml ve 0.8 ml olmuştur (Tablo 3.1). Elde edilen uçucu yağın 20 µl'si, 1.5 ml hekzan ile seyreltilerek GC/MS enjeksiyonuna hazır hale getirilmiş, geri kalan kısmı ise hazırlanan formülasyon ile deney hayvanlarına uygulanmıştır.

Elde edilen uçucu yağ, soya yağı (soybean oil) içerisinde emülsiyeye edilerek deney hayvanlarına 200 mg/kg ve 400 mg/kg dozlarında, orogastrik sonda yardımıyla uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın miktarı ve verimi

	Kütle (gr)	Elde edilen hacim (ml)	Verim (%)
1. Çalışma	25	0.95	3.8
2. Çalışma	25	0.97	3.88
3. Çalışma	25	1.15	4.6
4. Çalışma	20	0.8	4
Ortalama			4.07 ± 0.36
Standart sa	0.362767143		

3.1.4. Su Ekstresinin Hazırlanması

Bitkiden su buharı distilasyonu ile uçucu yağ elde edilmesi sırasında, bitki yapraklarının konulduğu Neo-Clavenger cihazının balon kısmında kalan ve işlem sonunda uçucu yağ ayrılmış olan “sulu faz”, filtre edilerek su ekstresi olarak kullanılmıştır.

3.2. Pulegon Formülasyonu Hazırlanması

Deneyde kullanılan standart pulegon maddesi, Merck/Sigma-Aldrich firması tarafından (R)-(+)-Pulegone for synthesis ismiyle üretilmiştir (CAS 89-82-7, molar mass 152.23 g/mol). Pulegon, soya yağı (soybean oil) içerisinde emülsiyeye edilerek 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarında deney hayvanlarına uygulanmıştır.

3.3. Kromatografik Ayırma ve Tanımlama

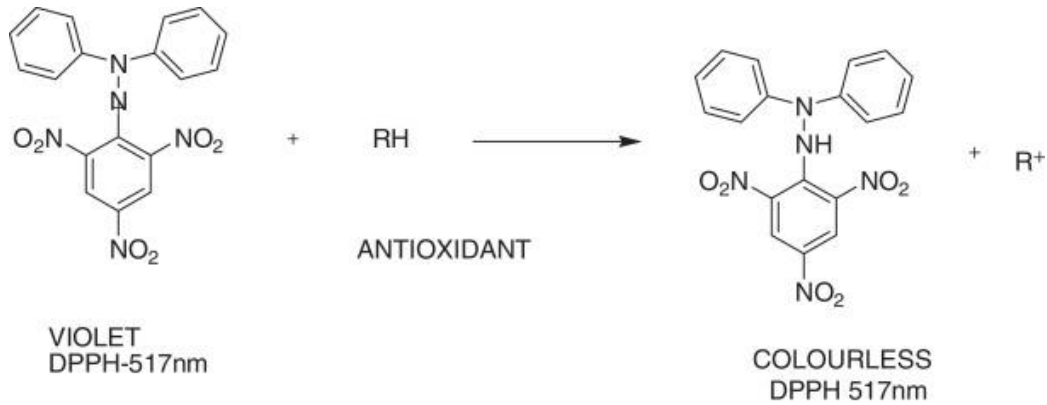
Bitkiden elde edilen uçucu yağın içeriği GC/MS yöntemiyle kromatografik olarak analiz edilerek içerdiği bileşenler tespit edilmiştir. Bu işlem Termo-Finnigan Trace marka kütle spektrometresinde elektron impakt (70 eV) ile yapılmıştır. Kromatografik ayırma TR-MS-5 (60m x 0.25 mm x 0.25 µm, % 5 fenil polisiloksan) kolonda gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık programı 50 °C de 1 dakika bekletilerek başlamış, 3 °C/dk ısıtma hızıyla 160 °C ye çıkarılmış, burada 3 dk bekletildikten sonra 5 °C/dk ısıtma hızıyla 250 °C ye çıkartılmış ve burada 10 dk bekletilmiştir. Enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve split10 modunda çalışılmıştır.

3.4. Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Analizleri

C. niveumun'un antioksidan etkisini tespit etmek amacıyla in vitro şartlarda bir analiz çalışması yapılmıştır. Bu amaçla *C. niveum* bitkisinin etanol ekstresi, su ekstresi, uçucu yağ ve pulegon formülasyonlarının antioksidan kapasiteleri ölçülmüştür. Ölçüm, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile yapılmıştır.

DPPH radikali, birkaç kararlı organik azot radikallerinden biridir. Ticari olarak bulunur ve koyu mor menekşe rengindedir. Yöntem ilk kez Blois (1958) tarafından DPPH radikallerinin antioksidan moleküllerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Brand-Williams ve ark.¹²⁹ yöntemi geliştirerek birçok araştırmacıya referans olmuşlardır.

Yöntem DPPH solüsyonunun hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile elektronunun yer değiştirmesi sonucunda başlangıçtaki mor menekşe renginin kaybı ile 517 nm'de sarı renkli indirgenmiş form oluşmasına dayanmaktadır. DPPH radikalinin yapısı ve antioksidan ile vermiş olduğu reaksiyon sonunda oluşan indirgenmiş formu Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Antioksidan özelliği araştırılan maddenin DPPH ile reaksiyon hızı farklı olmaktadır. Bunun nedeni kimyasal yapısındaki hidroksil grubu ve molekül büyüklüğü ile ilgilidir¹²⁹.



Şekil 3.1. DPPH radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon¹³⁰

3.4.1. DPPH Yönteminin Uygulanması

DPPH radikal süpürücü aktivite tayini Brand-Williams ve arkadaşlarına¹²⁹ göre modifiye edilerek yapılmıştır. Yöntemin işlem basamakları aşağıda sıra ile belirtilmiştir;

Antioksidan süpürücü aktivitesine bakılacak olan test maddelerinin analizleri 96 kuyucuklu plakada gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu plakaya 120 µL etanolde hazırlanmış 750, 375, 187.5, 93.75, 46.88, 23.44, 11.72, 5.86, 2.93, 1.46, 0.73 ve 0.37 µL/mL test maddelerinin çözeltileri ilave edilmiştir.

Analiz öncesi DPPH'nin etanoldeki çözeltisi taze olarak hazırlanmıştır. Buna göre 0.1 M DPPH'nin etanoldeki çözeltisinden 40 µL alınıp, 96 kuyucuklu plakadaki test maddelerinin üzerine ilave edilmiştir. Plakanın kapağı kapatılıp alüminyum folyo ile sarılmıştır. 1 dk orbital karıştırıcıda bekletilmiştir.

Kontrol için 120 µL test maddesi çözeltisi yerine saf etanol eklenmiştir ve standart olarak askorbik asit çözeltisi (25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10 ve 0.05 µg/mL) kullanılmıştır.

30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda etanole karşı okunmuştur.

DPPH radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [AK - AÖ / AK] \times 100$$

AK: Kontrol absorbansı

AÖ: Örneğin absorbansı

Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten linear regrasyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edilmiştir ve sonuçlar EC50 (µL/mL) olarak ifade edilmiştir.

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada kullanılan Wistar albino türü sıçanlar Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TIBDAM) temin edilmiştir. Deneyde ortalama ağırlıkları 200-300 gram arasında olan 60 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar polikarbonat kafesler içerisinde, 24±2 °C oda sıcaklığı bulunan ortamda, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık

döngüsüne uygun şekilde tutulmuştur. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneyisel Uygulama ve Araştırma Merkezi (SABİDAM) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Her grupta 6-8 sıçan olmak üzere toplam 9 grup oluşturulmuştur. 8 gün boyunca hayvanlara 100 mg/kg dozda gentamisin i.m. olarak ve bitki ekstresinin farklı formülasyonları ise “per oral” olarak (gavaj sondası ile) uygulanmıştır.

Deney grupları şu şekilde oluşturulmuştur:

- 1- Kontrol Grubu (n=6): Hayvanlara 8 gün boyunca normal diyet ve içme suyu verilmiştir.
- 2- Gentamisin Grubu (n=6): 8 gün boyunca ratlara 100 mg/kg dozunda gentamisin, i.m. olarak enjeksiyon yapılmıştır.
- 3- Gentamisin + Etanol 200 Grubu (n=7): 8 gün boyunca ratlara 100 mg/kg i.m. gentamisin enjeksiyonu ile birlikte, etanol ekstresi formülasyonu 200 mg/kg dozunda p.o. olarak (gavajla) uygulanmıştır.
- 4- Gentamisin + Etanol 400 Grubu (n=6): 8 gün boyunca ratlara 100 mg/kg i.m. gentamisin enjeksiyonu ile birlikte, etanol ekstresi formülasyonu 400 mg/kg dozunda gavajla uygulanmıştır.
- 5- Gentamisin + Su 200 Grubu (n=6): 8 gün boyunca ratlara 100 mg/kg i.m. gentamisin enjeksiyonu ile birlikte, su ekstresi formülasyonu 200 mg/kg dozunda gavajla uygulanmıştır.
- 6- Gentamisin + Uçucu Yağ 200 Grubu (n=7): 8 gün boyunca ratlara 100 mg/kg i.m. gentamisin enjeksiyonu ile birlikte, uçucu yağ formülasyonu 200 mg/kg dozunda gavajla uygulanmıştır.
- 7- Gentamisin + Uçucu Yağ 400 Grubu (n=8): 8 gün boyunca ratlara 100 mg/kg i.m. gentamisin enjeksiyonu ile birlikte, uçucu yağ formülasyonu 400 mg/kg dozunda gavajla uygulanmıştır.
- 8- Gentamisin + Pulegon 50 Grubu (n=6): 8 gün boyunca ratlara 100 mg/kg i.m. gentamisin enjeksiyonu ile birlikte, pulegon formülasyonu 50 mg/kg dozunda gavajla uygulanmıştır.

- 9- Gentamisin + Pulegon 100 Grubu (n=8): 8 gün boyunca ratlara 100 mg/kg i.m. gentamisin enjeksiyonu ile birlikte, pulegon formülasyonu 100 mg/kg dozunda gavajla uygulanmıştır.

3.6. Kan Örneği ve Böbrek Dokularının Hazırlanması

Deney hayvanlarına 8 gün boyunca gentamisin ve ekstre formülasyonlarının uygulanmasının ardından, son uygulamadan 24 saat sonra ketamin (Ketalar® flakon, 40 mg/kg) ve 5 mg/kg basilazin ile anestezi yapılarak intrakardiyak kanları alındıktan sonra hayvanlar sakrifiye edildi. Sol böbrek, abdominal bölgenin aseptik koşulları sağlandıktan sonra karın orta çizgisinden yapılan insizyonla histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

3.7. Biyokimyasal Analiz

Deney hayvanlarından alınan kan örnekleri 11000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek serum kısımları ayrıldı. Serum örnekleri biyokimya tüplerine konarak -20 °C’de analiz gününe kadar saklandı. Serum örneklerinde BUN, serum kreatinin ve MDA analizleri Çukurova Üniversitesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı’nda yapıldı.

3.8. Histopatolojik İnceleme

Böbrekler %10’luk formalin solüsyonu içerisinde fixe edildikten sonra Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı’na gönderildi. Parafinlenen örnekler, 3-5 µm’lik kesitler elde edilip hematoxilen-eozin ile boyandı. Tübüler nekroz, dejeneratif değişimler ve tübüler rejenerasyon ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

3.8.1. Işık Mikroskopik Doku Hazırlama Yöntemi

Işık mikroskopik incelemeler için alınan doku örnekleri % 10'luk nötralformalin içerisinde 3 gün boyunca tespit edildi ve Leica TP 1020 ototeknikon cihazı ile Tablo 3.2'de belirtilen doku takip yöntemi uygulandı.

Tablo 3.2. Işık mikroskopik doku takip işlemi

Oda sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Bloklanmış dokulardan mikrotom yardımı ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Olympus BX53 ışık mikroskopunda incelenerek histolojik özellikleri değerlendirildi ve resimleri çekildi.

3.9. Deneyde Kullanılan İlaç ve Solüsyonlar

Gentamisin: Deneyde İ.E. Ulagay firması tarafından üretilmiş olan Genta 160 mg'lık ampul formundaki ilaç kullanılmıştır. 160 mg/2 ml formundaki ampul içeriği sıçanlara 100 mg/kg hesabı yapılarak i.m. olarak verilmiştir.

Pulegon: Deneyde kullanılan pulegon, Merck/Sigma-Aldrich firması tarafından (R)-(+)-Pulegone for synthesis ismiyle üretilmiştir (CAS 89-82-7, molar mass 152.23 g/mol). Bu ürün Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden temin edilmiştir.

Soya yağı (Soybean oil): Karden firması tarafından üretilen 100 ml'lik cam şişede sunulan soya yağı kullanılmıştır.

MDA ELİSA Kit: Deneyde SunRed firması tarafından üretilen Rat (MDA) ELISA Kit kullanılmıştır. Bu kit Algen Diagnostik isimli firmadan satın alınmıştır.

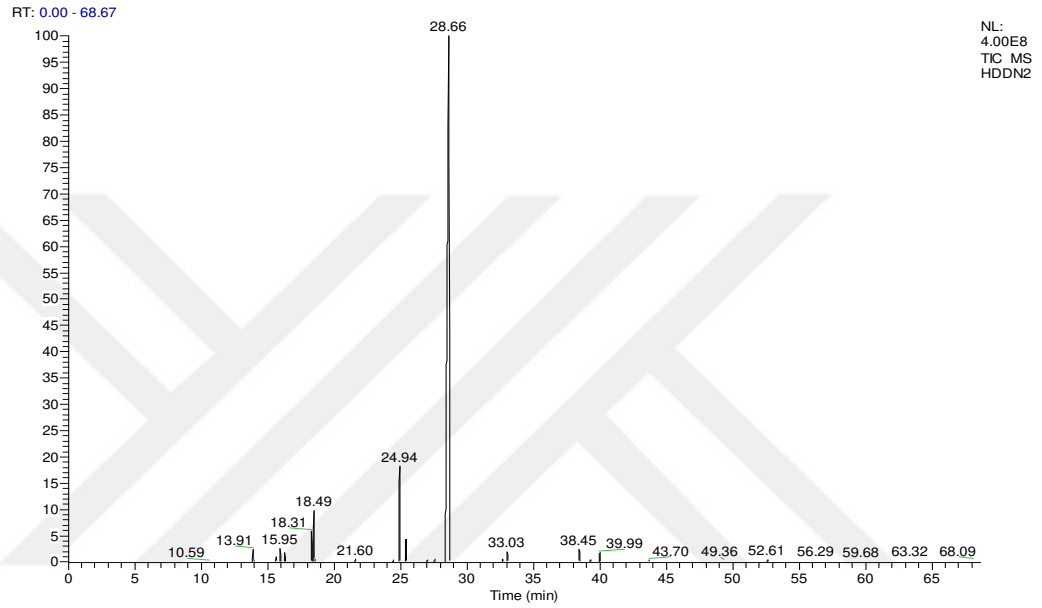
3.10. Sonuçların İstatistiksel Analizi

Elde edilen sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata (S.E) şeklinde değerlendirildi. Sonuçların istatistiksel olarak analizi için birden fazla grubun birbirleriyle karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar non-paired t-testi ile yapıldı. Grafiklerin çizimi ve istatistiksel analiz için bilgisayar ortamında Graph-Pad Prism 5.0 (CA, USA) programı kullanıldı. 0.05'den küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi ($p < 0.05$).

4. BULGULAR

4.1.Kromatografik Analiz Sonuçları

C. niveum bitkisinin uçucu yağının GC/MS yöntemiyle analizi sonucunda varlığı tespit edilen bileşenler Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *C. niveum*dan elde edilen uçucu yağın GC-MS yöntemiyle analizi sonucunda elde edilen bileşenleri gösteren grafik.

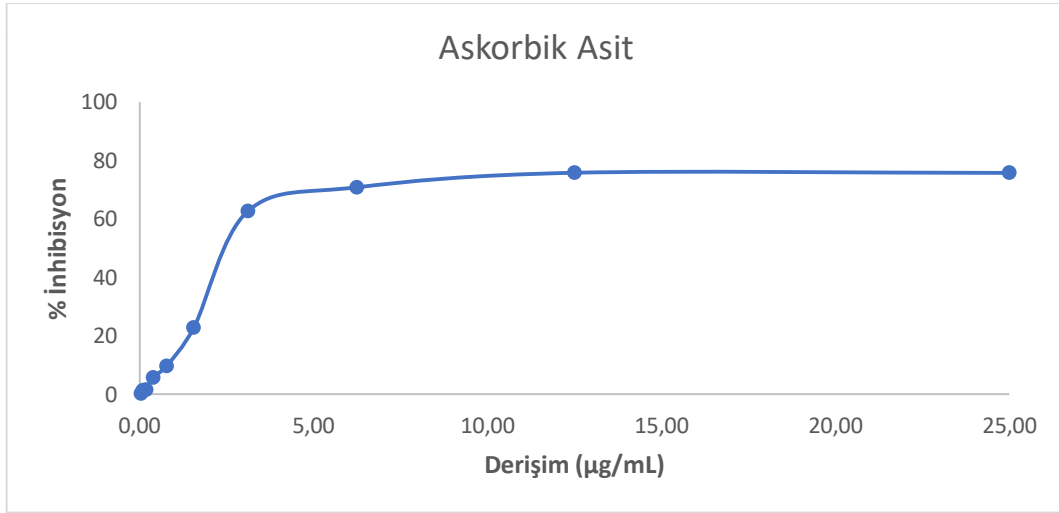
GC/MS analizi sonucunda kazanılan 20 maddeden toplam 17 tanesi teşhis edilmiştir. Bu maddeler Tablo 4.1’de gösterildiği şekildedir. Teşhis edilen bileşenler içerisinde en yüksek orana sahip olan pulegon maddesidir (% 79.6). Pulegondan sonra yüksek oranda bulunan maddeler isomenthone (% 5.32), 1.8-cineole (% 2.64), limonen (% 1.52) ve cis-isopulegone (%1.29) dur.

Tablo 4.1. *C. niveum* uçucu yağının GC/MS yöntemi ile analizi sonucunda elde edilen bileşenler

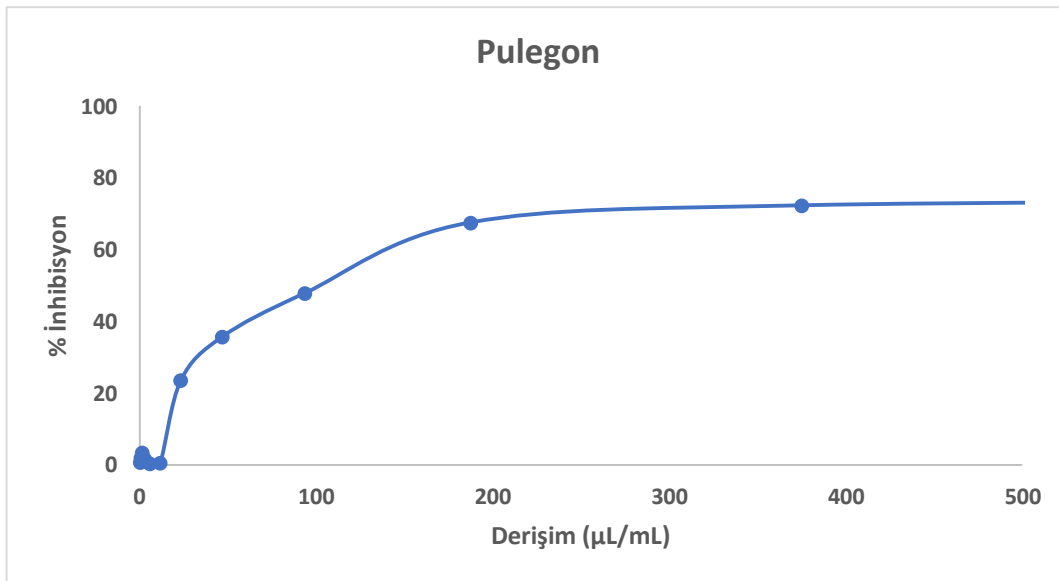
Bileşenler	Alıkonma zamanı	% Alan
1 α -Pinene	13.91	0.65
2 Sabinene	15.66	0.29
3 2- β -Pinene	15.95	0.7
4 β -Myrcene	16.28	0.46
5 Limonene	18.31	1.52
6 1.8-Cineole	18.49	2.64
7 Linalool	21.6	0.14
8 Isomenthone	24.94	5.32
9 cis-Isopulegone	25.41	1.29
10 Verbenone	27.01	0.12
11 Not identification	27.58	0.19
12 Pulegone	28.66	79.6
13 β -Elemene	32.68	0.12
14 Piperitenone	33.03	0.63
15 Citronellic acid	38.45	0.77
16 Germacrene D	39.29	0.17
17 Bicyclogermacrene	39.99	0.56
18 Spathulenol	43.7	0.13
19 Not identification	52.61	0.14
20 Not identification	56.29	0.1
	Geri Kazanım	95.54

4.2. Antioksidan Aktivite Analizi Sonuçları

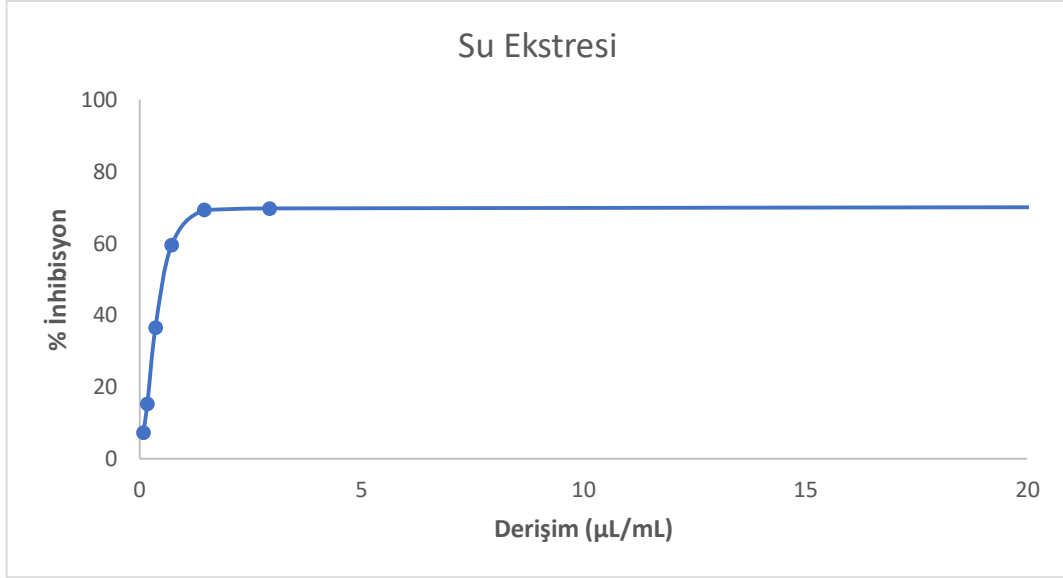
Kararlı bir serbest radikal olan DPPH bir elektron veya hidrojen radikalini almaktadır. DPPH yönteminde 517 nm’de okunan absorbans değerleri ne kadar düşük ise serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek olmaktadır. DPPH miktarındaki azalma ile antioksidan miktarın belli bir konsantrasyona kadar azalan absorbans değerleri doğru orantılıdır¹³¹. Absorbansın düşmesinin sebebi antioksidan ile serbest radikal arasındaki hidrojen alışverişi sonrasında serbest radikalın giderilmiş olmasıdır. Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan DPPH radikalini süpürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikler aşağıda gösterilmiştir.



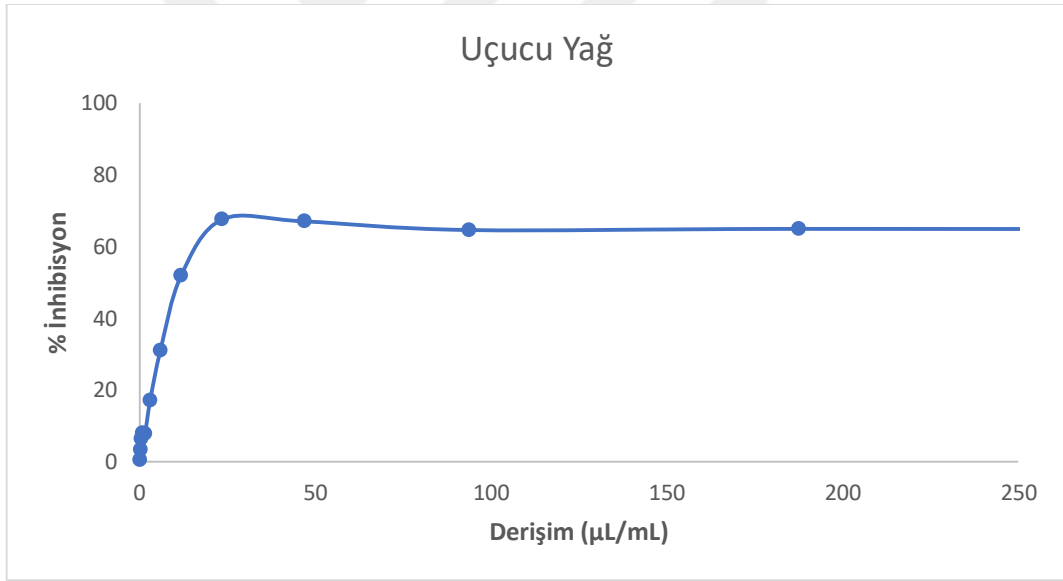
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki askorbik asidin % inhibisyon değerleri



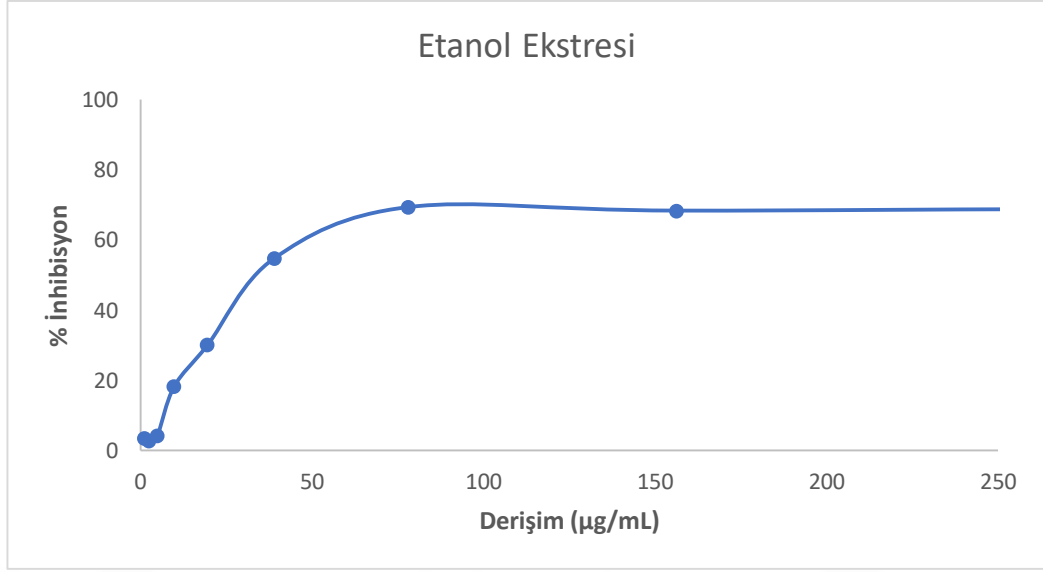
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki pulegonun % inhibisyon değerleri



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki su ekstresinin % inhibisyon değerleri



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki uçucu yağın % inhibisyon değerleri.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstresinin % inhibisyon değerleri.

Grafiklerden hesaplanan EC50 değerleri ne kadar düşükse DPPH radikalini süpürme aktivitesi o kadar yüksek olmaktadır. Buna göre tez çalışmamız kapsamında kullanılan ekstrelerin ve formülasyonların EC50 değerleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. DPPH radikal süpürücü aktiviteleri araştırılan antioksidan bileşiklerin EC50 değerleri.

Antioksidan	EC50
Askorbik asit (standart)	2.646 µg/mL
Etanol Ekstresi	48.174 µg/mL
Pulegon	120 µL/mL
Su Ekstresi	1.310 µL/mL
Uçucu Yağ	14.889 µL/mL

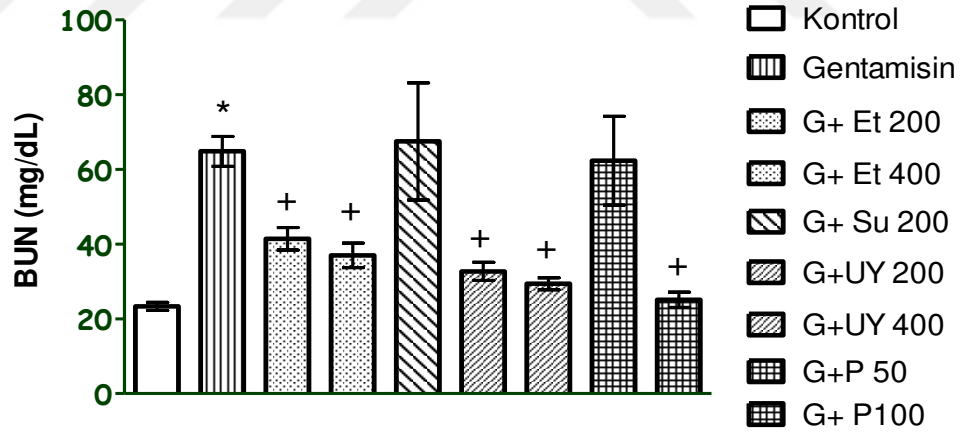
Çalışmada standart antioksidan olarak askorbik asit kullanılmıştır. Askorbik asidin EC50 değeri 2.646 µg/mL bulunmuştur. Ekstre ve formülasyonların DPPH radikalini süpürme aktivitesi sıralaması; su ekstresi (1.310 µL/mL) > uçucu yağ (14.889 µL/mL) > etanol ekstresi (48.174 µg/mL) > pulegon (120 µL/mL) olarak belirlenmiştir.

4.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları

4.3.1. BUN Sonuçları

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre en düşük BUN seviyesine sahip grup kontrol grubu ve en yüksek BUN seviyesine sahip grup ise Gentamisin grubu olarak gözlemlenmiştir.

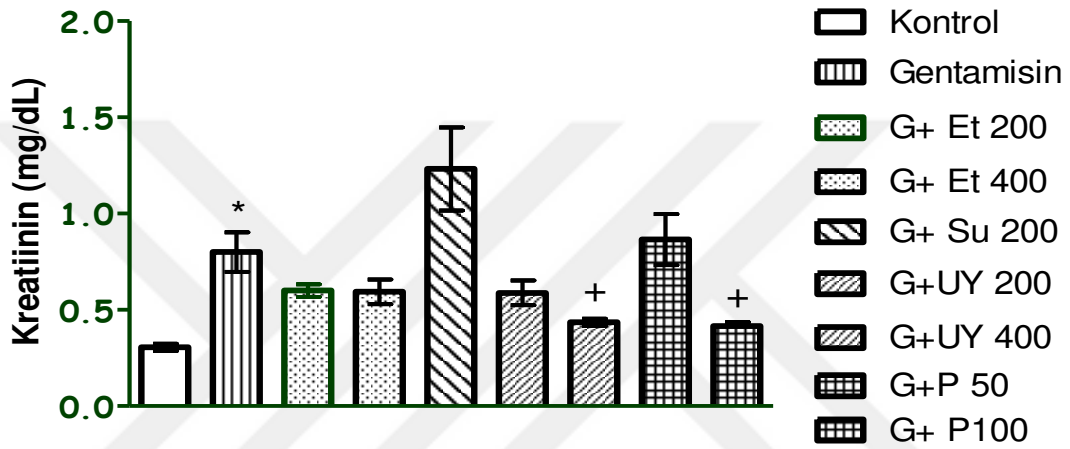
Kontrol grubu ile kıyaslandığında gentamisin verilen grupta BUN seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Gentamisinden kaynaklanan bu artış, etanol ekstresi, uçucu yağ ve pulegon uygulaması ile anlamlı bir şekilde geri çevirilmiştir (Şekil 4.7). Her üç uygulama grubunda doz bağımlı etki gözlenmiştir. Su ekstresi BUN seviyesindeki artışı geri çevirememiştir. Uçucu yağ formülasyonunun, etanol ekstresinden daha fazla BUN seviyesini düşürmüş olduğu gözlenmiştir. En fazla düşüş ise pulegonun 100 mg/kg lık uygulamasıyla sağlanmıştır.



Şekil 4.7. Gentamisin ve farklı bitki ekstreleri uygulamalarının BUN düzeyi üzerindeki etkileri (n=6-8; p<0,05). Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık: *, gentamisin grubuna göre anlamlı farklılık: + ile gösterilmiştir.

4.3.2. Kreatinin Sonuçları

Deney sonucunda elde edilen serum kreatinin düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla gentamisin grubunda artış aldığı görülmüştür. Gentamisin ile birlikte verilen etanol ekstresinin, uçucu yağın ve pulegonun uygulanması, kreatinin seviyesindeki düşüşü doz bağımlı olarak geri çevirmiş ancak su ekstresi etkilememiştir (Şekil 4.8). Uçucu yağ formülasyonu, etanol grubuna göre daha fazla düşüşe sebep olmuştur.

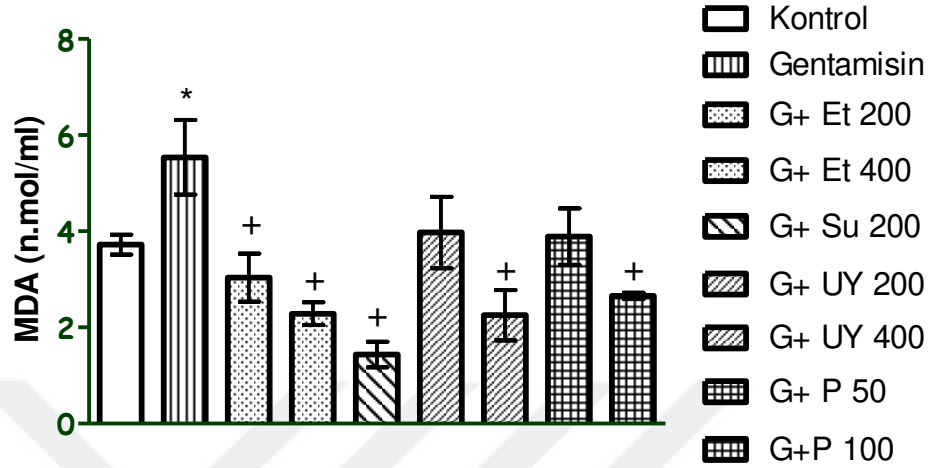


Şekil 4.8. Gentamisin ve farklı bitki ekstreleri uygulamalarının serum kreatinin düzeyleri üzerindeki etkisi (n=6, p<0,05). Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık: *, gentamisin grubuna göre anlamlı farklılık: + ile gösterilmiştir

4.3.3. MDA Analizi Sonuçları

Deney sonucunda elde edilen MDA düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla gentamisin grubunda anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. MDA düzeyinde artış olması, gentamisin uygulaması sonucunda lipid peroksidasyonuna bağlı olarak oksidatif strese artış olduğunu göstermektedir (Şekil 4.9). Gentamisinle birlikte verilen etanol ekstresi, doz bağımlı olarak MDA düzeyini düşürmüş, dolayısıyla oksidatif stresi engellemiştir. Gentamisin + Etanol 400 mg/kg lık grubundaki MDA düşüşü, 200 mg/kg lık gruba göre daha yüksek olup, her iki grubun sonucu da kontrol grubuna kıyasla anlamlılık göstermektedir. MDA düzeyindeki en yüksek düşüş, su ekstresi ile sağlanmıştır (p<0.05). Bu yüksek antioksidan etkiden, su ekstresi içerisinde bulunan polifenolik bileşiklerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Gentamisinle birlikte verilen uçucu yağ uygulaması doz bağımlı olarak MDA düzeyini düşürmüştür. Uçucu

yağın 400 mg/kg lık dozu, kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş sağlamıştır. Pulegon, doz bağımlı olarak etki göstermiş, pulegon 100 mg/kg uygulaması MDA düzeyini anlamlı bir şekilde düşürmüştür.



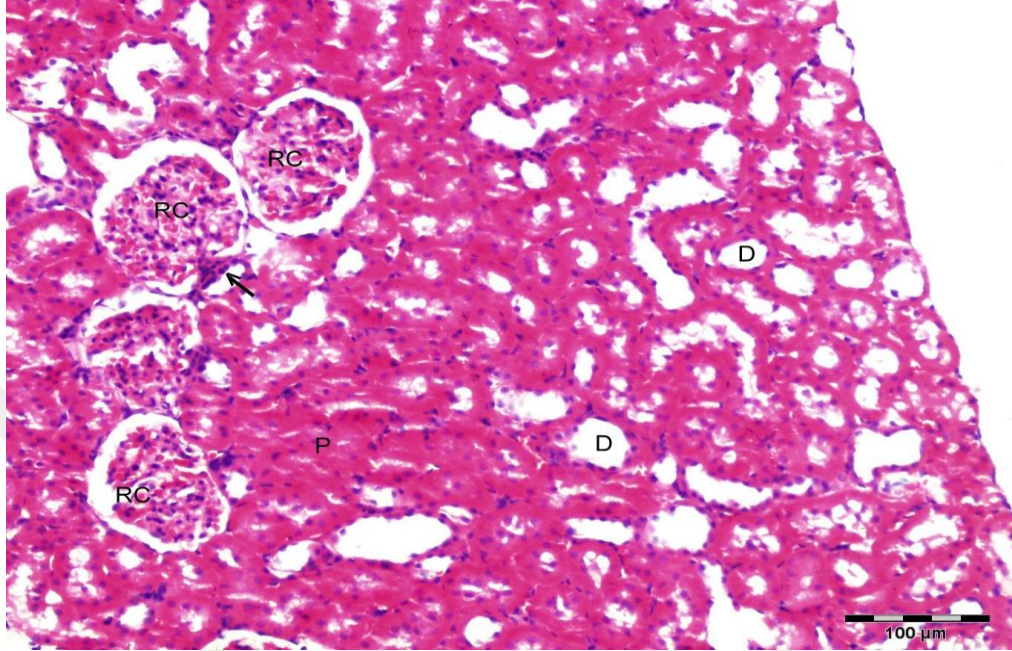
Şekil 4.9. Gentamisin ve farklı bitki ekstraktları uygulamalarının MDA düzeyi üzerine etkileri (n=4-6; p<0,05). Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık: *, gentamisin grubuna göre anlamlı farklılık: + ile gösterilmiştir.

4.4. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

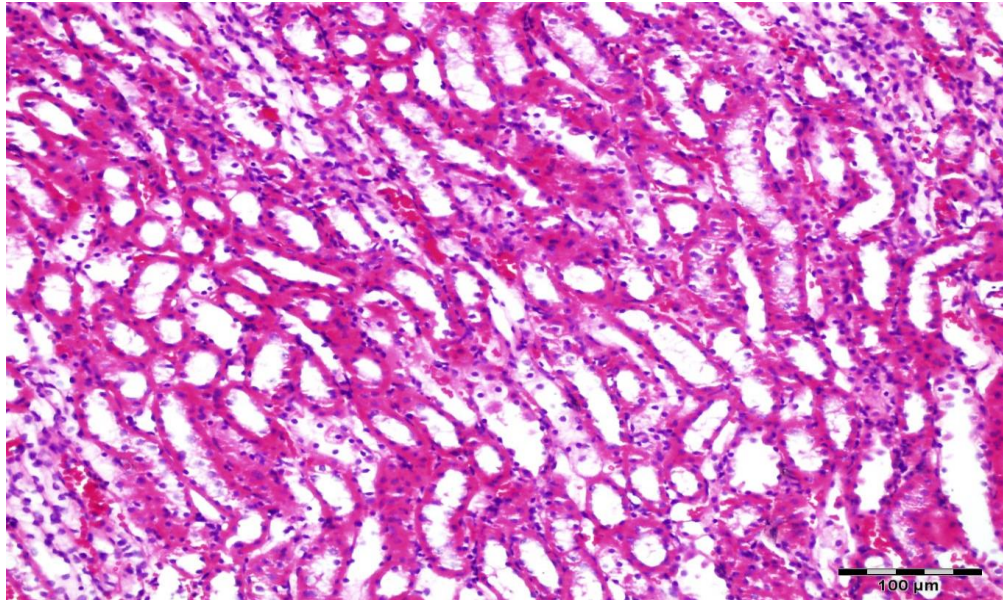
4.4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubundan alınan böbrek dokularının ışık mikroskopik incelenmesinde böbrek yüzeyinin bağ dokusu yapısında bir kapsül tarafından sarıldığı izlendi. Böbrek korteksinde yer alan kortikal labirent içerisinde renal cisimcikler ve onlarla ilişkili proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, kapiller normal yapıda görüldü. Renal cisimciklerin dış kısmında tek katlı yassı epitel takasından oluşmuş Bowman kapsülünün paryetal yaprağı, kapsüler boşluk ve iç kısımda glomerulus yer almaktaydı. Renal cisimciğin vasküler kutbunda makula densa izlendi. Proksimal tübülde tek katlı kübik veya alçak prizmatik şekilli epitel hücrelerinin merkezi yerleşime sahip sferikal şekilli bir çekirdeğe ve eozinofilik boyanmış stoplazmaya sahip olduğu görüldü. Distal tübüller kübik şekilli epitel hücreleri ile örtülü olup sferikal şekilli merkezi yerleşime sahip çekirdek

içermekteydi (Şekil 4.10). Böbrek iç kısmında yer alan medulla içerisinde proksimal ve distal düz tübüller, Henle kulpunun inen ve çıkan ince segmentleri, toplayıcı tübüller ve interstisyel alan içerisinde kapillerler normal morfolojik yapıda izlendi (Şekil 4.11).

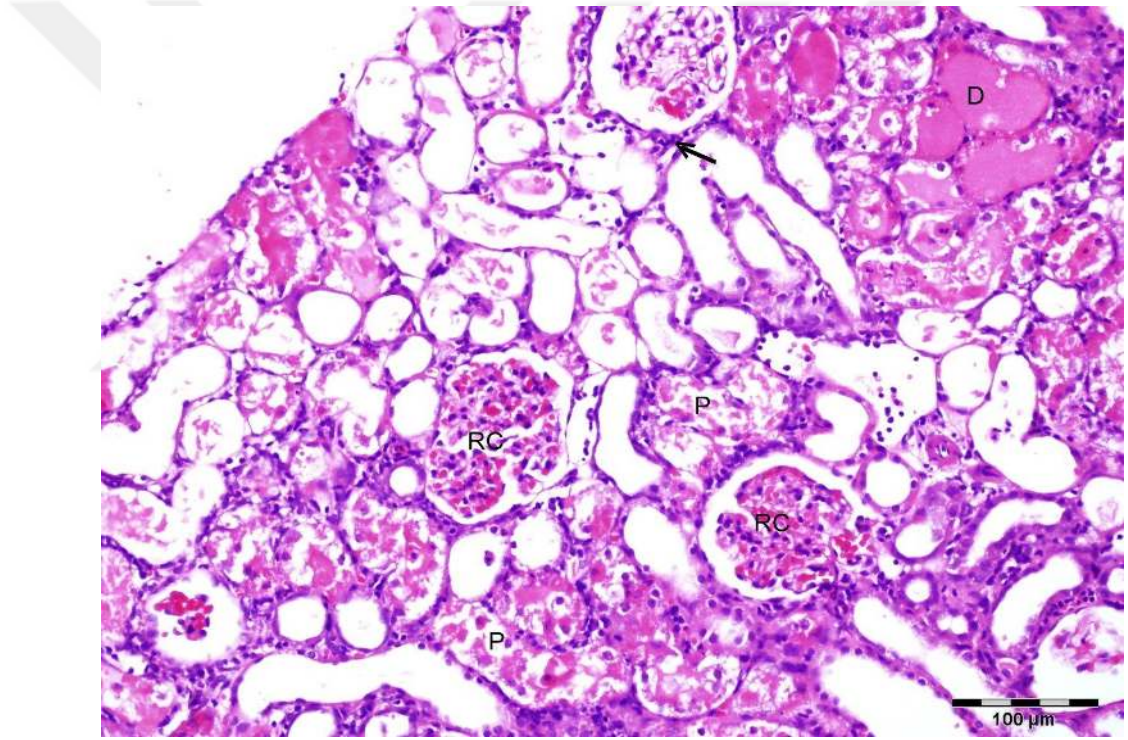


Şekil 4.10. Kontrol Grubu. Böbrek korteksi içerisinde renal cisimcikler (RC), makula densa (ok), proksimal (P) ve distal (D) kıvrıntılı tübüller görülmekte. Bar=100 µm.

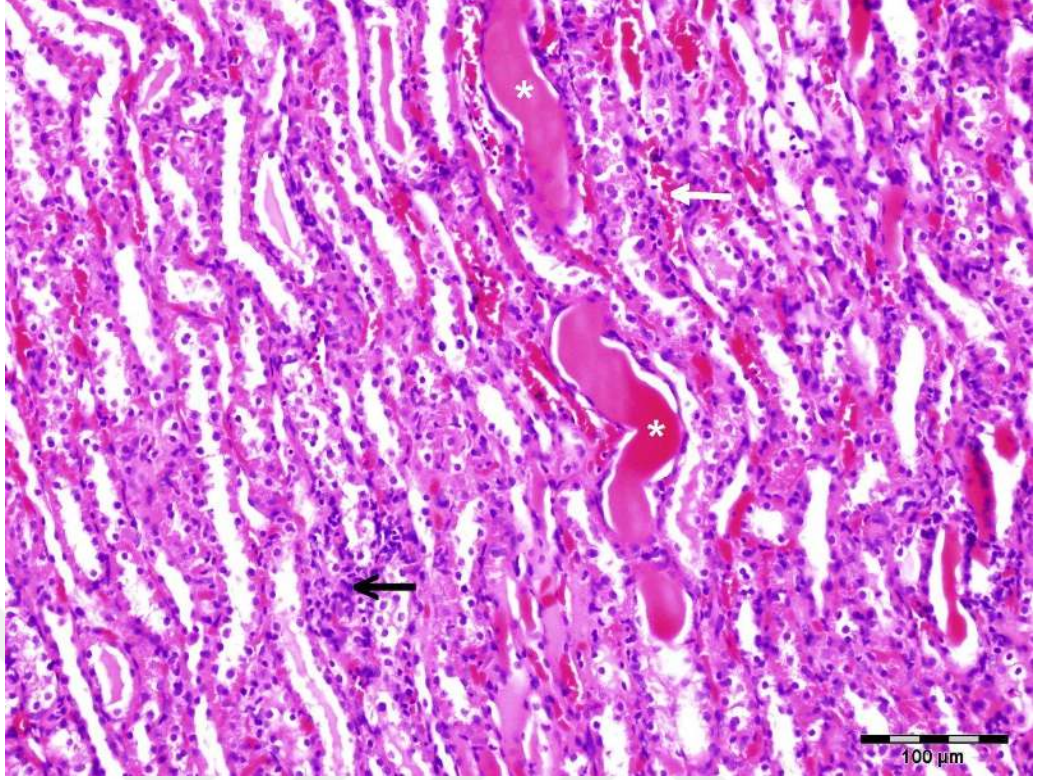


Şekil 4.11. Kontrol Grubu. Böbrek medullası normal görünümde izlenmekte. Bar=100 µm.

Gentamisin grubuna ait dokulardan alınan kesitlerde renal cisimcikler normal yapıda izlendi. Korteks içerisinde yer alan proksimal tübüllerde epitelium tabakasının bazal laminadan ayrıldığı, epitel hücrelerinde şişme ve litik değişikliklerin olduğu, tübül lümeninde eozinofilik boyanmış hücresel artıkların bulunduğu dikkati çekti. Distal tübüllerin proksimal tübüllere göre daha iyi korunduğu, ancak lümenleri içerisinde eozinofilik boyanmış kaslara sahip olduğu izlendi. Böbrek korteksinde kapillerlerin genişlediği, konjesyon olduğu ve interstisyel alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun bulunduğu dikkati çekti (Şekil 4.12). Böbrek medullası içerisinde artmış kanlanma ve konjesyonun varlığı, interstisyel alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun bulunduğu görüldü (Şekil 4.13).

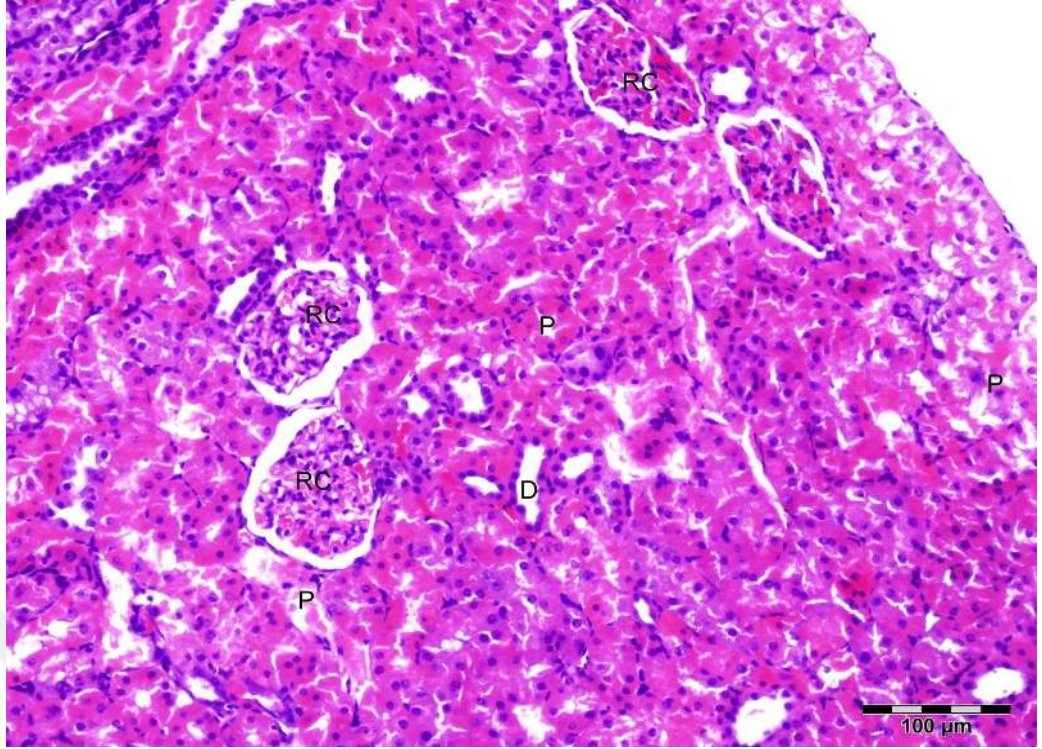


Şekil 4.12. Gentamisin Grubu. Böbrek korteksinde proksimal tübüllerde (P) epitel tabakasının bazal laminadan ayrıldığı, epitel hücrelerinde lizis olduğu, tübül lümeninde hücresel artıkların bulunduğu dikkati çekmekte. Distal tübüller (D) nispeten daha iyi korunmuş olmakla birlikte, tübül lümeninde eozinofilik boyanmış kaslara varlığı görülmekte. İnterstisyel alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun varlığı (ok) izlenmekte. Bar=100 µm.

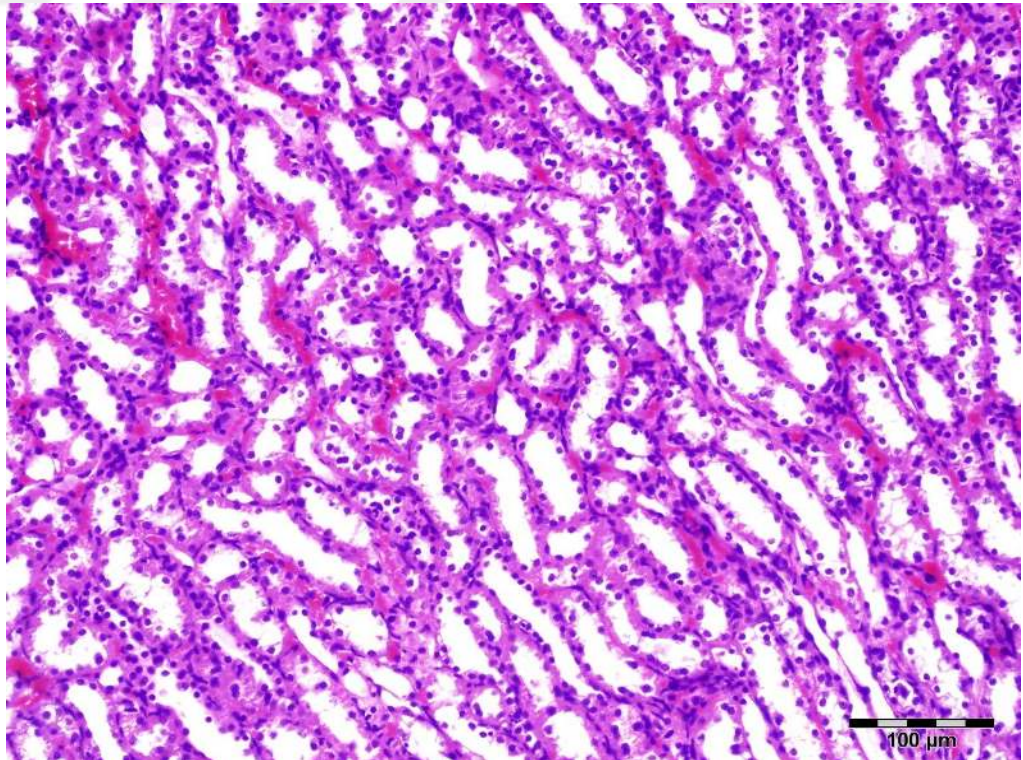


Şekil 4.13. Gentamisin Grubu. Böbrek medullası içerisinde artmış konjesyon (beyaz ok), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (siyah ok) ve tübüller içerisinde eozinofilik boyanmış kastların (*) varlığı görülmekte. Bar=100 µm.

Pulegon 50 mg grubuna ait dokuların ışık mikroskopik incelenmesinde böbrek korteksi içerisindeki renal cisimcikler normal görünümdeydi. Proksimal tübül epitel hücrelerinin bazı alanlarda bazal laminadan ayrıldığı ve hücrelerin şiştiği izlenmekle birlikte epitel tabakası kaybının Gentamisin grubu ile kıyaslandığında azaldığı görüldü. Distal tübüller çoğunlukla normal görünümdeydi, bununla birlikte bazı alanlarda tübül lümeni içerisinde eozinofilik boyanmış kastların varlığı izlendi (Şekil 4.14). Böbrek medullasında inflamasyonun ve tübüller içerisindeki kastların azaldığı görüldü (Şekil 4.15).

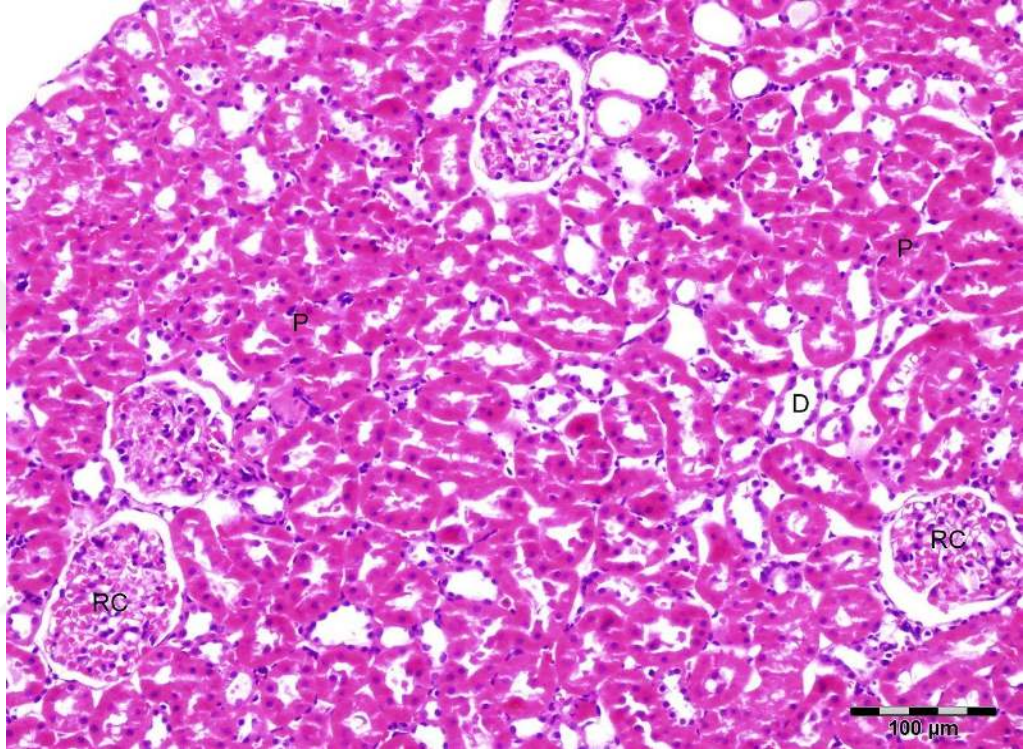


Şekil 4.14. Pulegon 50 mg Grubu. Proksimal tübül (P) epitel hücrelerinin bazı alanlarda bazal laminadan ayrıldığı ve şiştiği izlenmekle birlikte epitel tabakası kaybının Gentamisin grubu ile kıyaslandığında azaldığı görülmekte. Renal cisimcikler (RC) ve distal tübüller (D) normal görünümde izlenmekte. Bar=100 µm.

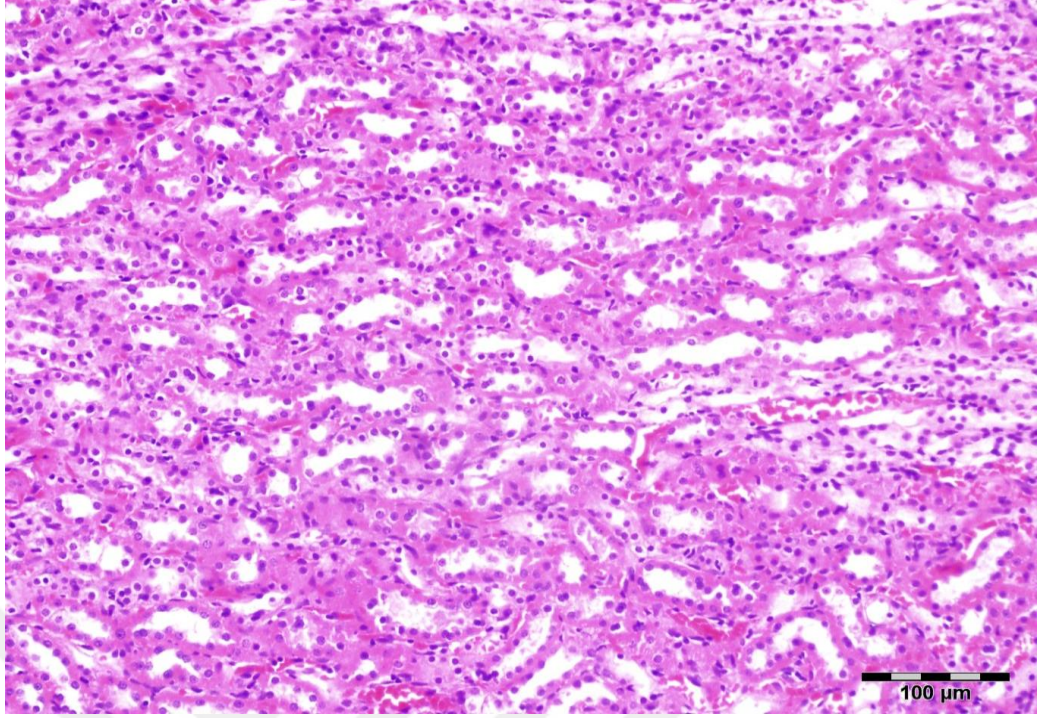


Şekil 4.15 Pulegon 50 mg Grubu. Böbrek medullası normal görünümde izlenmekte. Bar=100 µm.

Pulegon 100 mg grubuna ait dokulardan alınan kesitlerde proksimal tübül epitel hücrelerinin, Gentamisin ve Pulegon 50 mg grupları ile karşılaştırıldığında daha iyi korunduğu ve kontrol grubu ile benzer görünümde olduğu görüldü (Şekil 4.16). Böbrek medullası da kontrol grubu ile benzer özelliklerde ve normal yapıdaydı (Şekil 4.17).

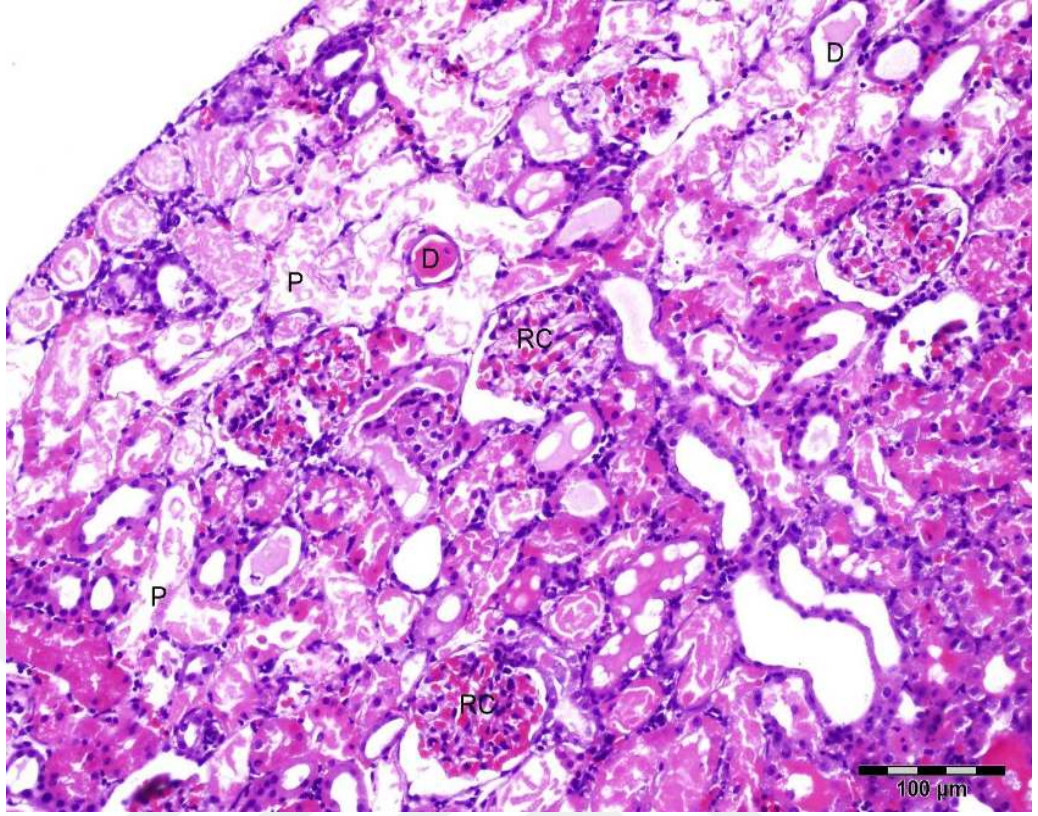


Şekil 4.16. Pulegon 100 mg Grubu. Böbrek korteksi içerisinde renal cisimcikler (RC), proksimal (P) ve distal (D) tübüller normal yapıda izlenmekte. Bar=100 µm.

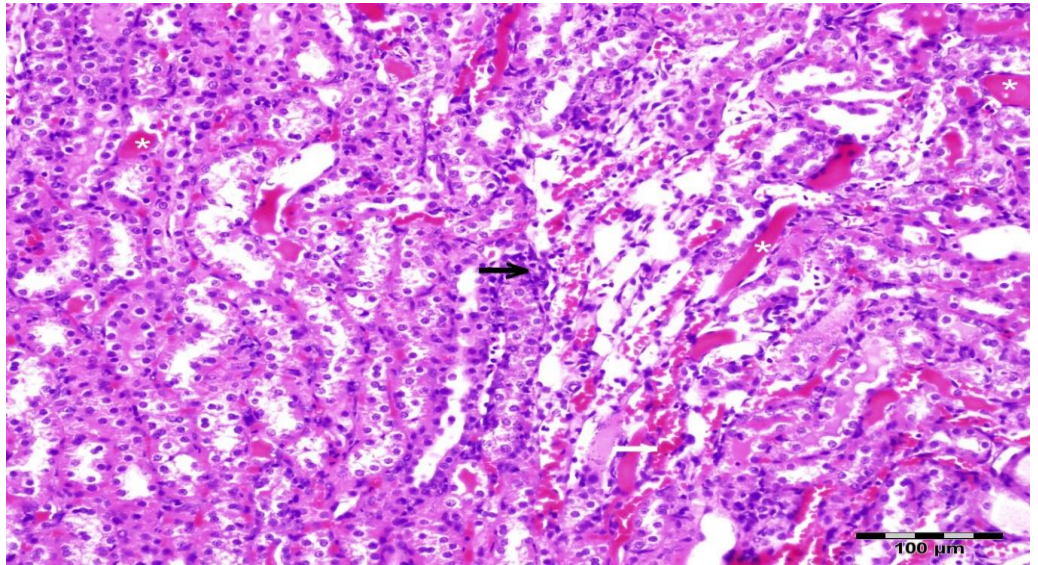


Şekil 4.17. Pulegon 100 mg Grubu. Böbrek medullası normal görünümde izlenmekte. Bar=100 µm.

Su ekstresi grubuna ait dokuların kesitlerinde böbrek korteks ve medullası Gentamisin grubu ile benzer görünümdeydi (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

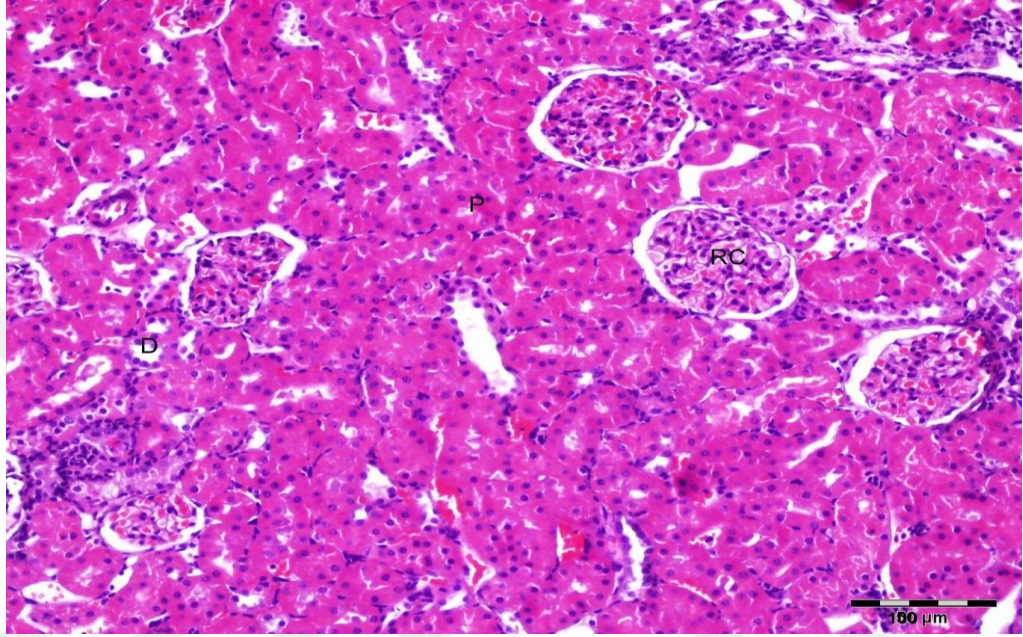


Şekil 4.18. Su ekstresi Grubu. Böbrek korteksinde proksimal tübüllerde (P) epitel tabakasının bazal laminadan ayrıldığı, epitel hücrelerinde lizis olduğu, tübül lümeninde hücresel artıkların bulunduğu görülmekte. Distal tübüllerin (D) lümeninde eozinofilik boyanmış kastlar izlenmekte. Bar=100 µm.

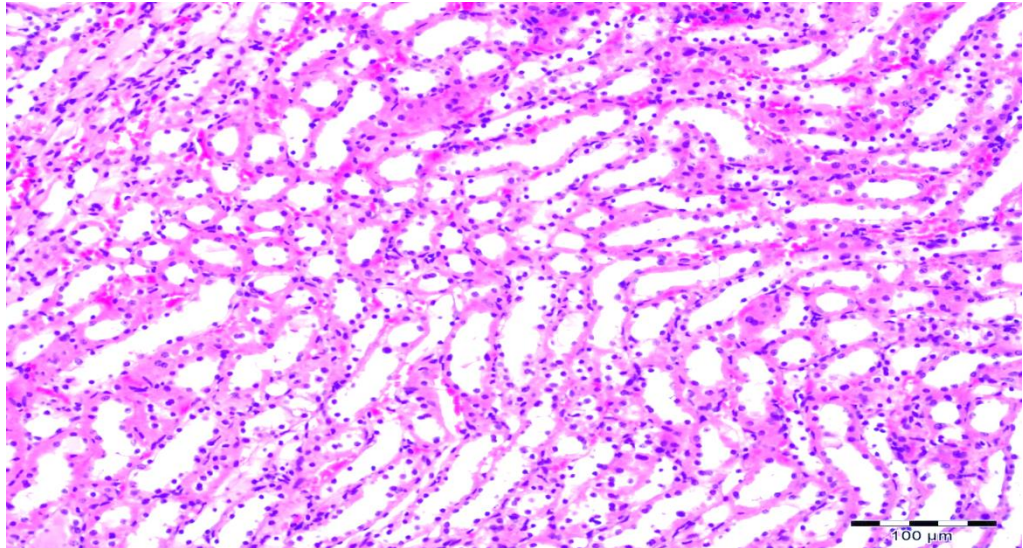


Şekil 4.19. Su ekstresi Grubu. Böbrek medullası içerisinde artmış konjesyon (beyaz ok), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (siyah ok) ve tübüller içerisinde eozinofilik boyanmış kastların (*) varlığı görülmekte. Bar=100 µm.

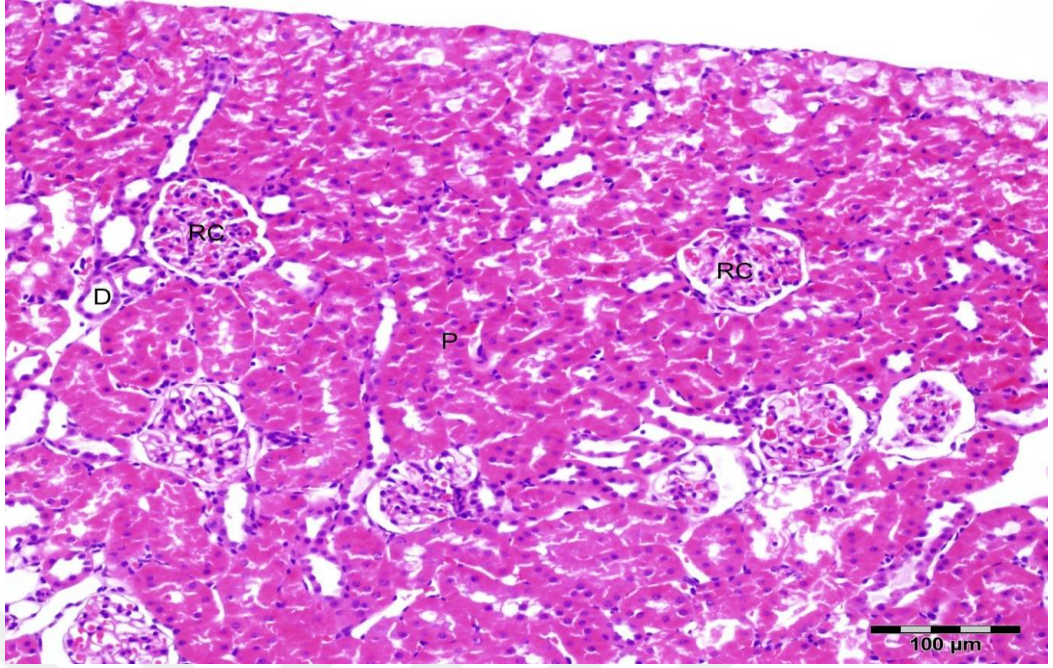
Etanol 200 mg (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21) ve Etanol 400 mg (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23) gruplarından alınan kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde Gentamisin grubu ile kıyaslandığında proksimal tübül epitel hücrelerinde bazal laminadan ayrılma ve litik değişikliklerin azaldığı izlendi. Etanol 400 mg grubunda proksimal tübül epitel hücrelerinin Pulegon 100 mg grubu ile benzer özelliklerde oldukları dikkati çekti.



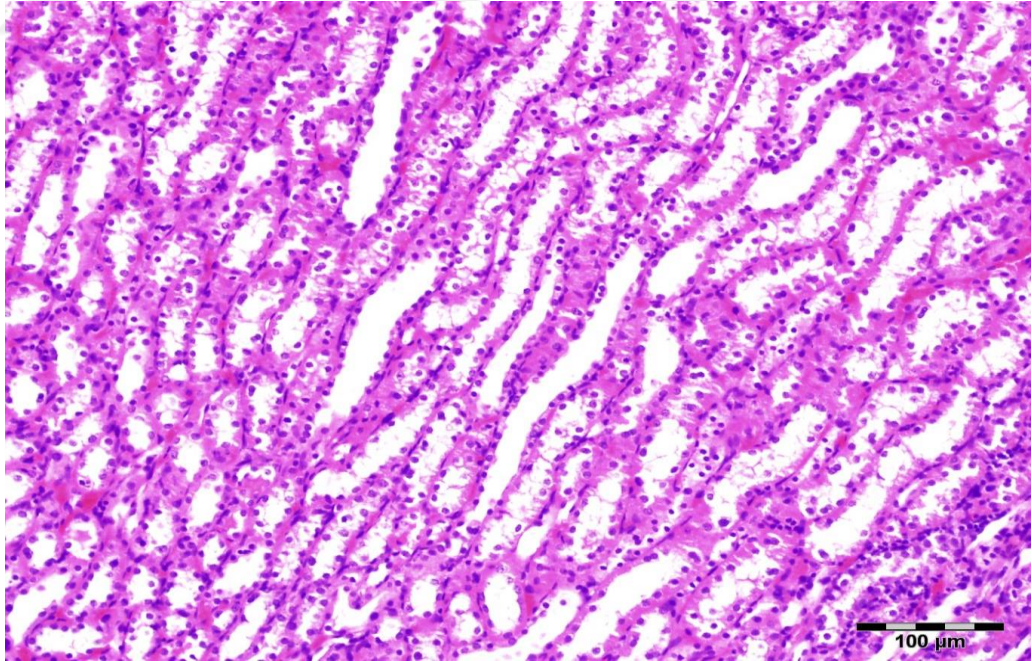
Şekil 4.20. Etanol 200 mg Grubu. Böbrek korteksi içerisinde renal cisimcikler (RC), proksimal (P) ve distal (D) tübüller normal yapıda izlenmekte. Bar=100 µm.



Şekil 4.21. Etanol 200 mg Grubu. Böbrek medullası normal görünümde izlenmekte. Bar=100 µm.

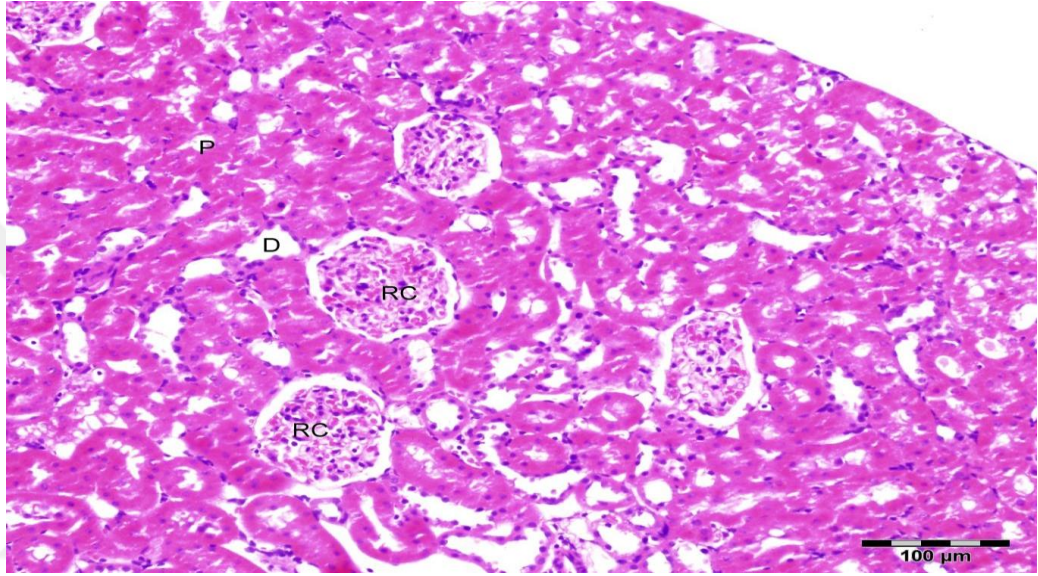


Şekil 4.22. Etanol 400 mg Grubu. Böbrek korteksi içerisinde renal cisimcikler (RC), proksimal (P) ve distal (D) tübüller izlenmekte. Bar=100 µm.

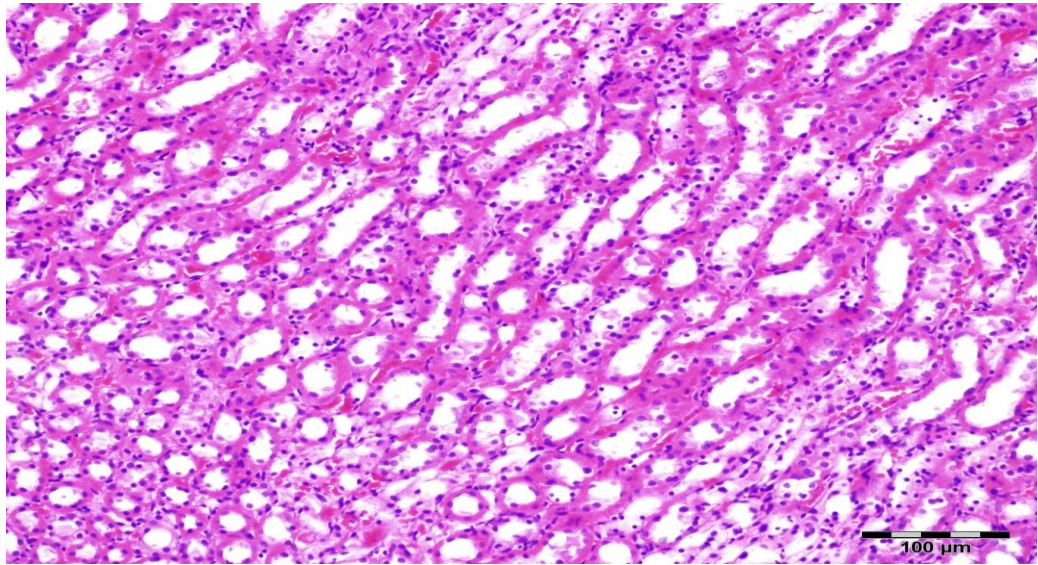


Şekil 4.23. Etanol 400 mg Grubu. Böbrek medullası normal görünümde izlenmekte. Bar=100 µm.

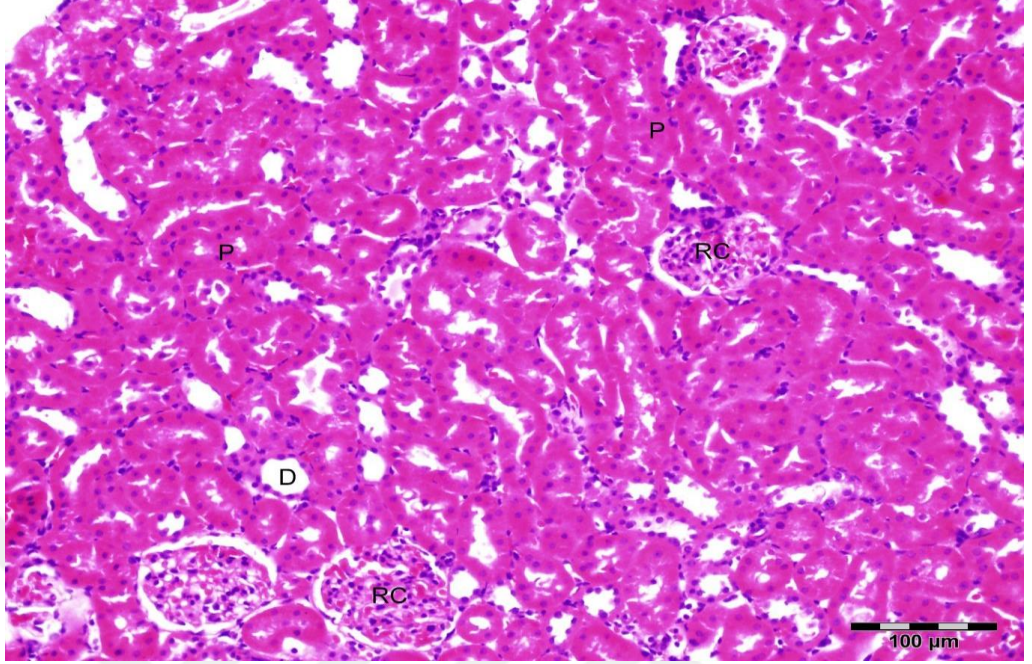
Uçucu yağ 200 mg (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25) ve Uçucu yağ 400 mg (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27) gruplarından alınan kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde proksimal tübül epitel tabakasının Gentamisin grubu ile kıyaslandığında daha iyi korunduğu izlendi. Uçucu yağ 400 mg grubunda interstisyel alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ve konjesyonun da azaldığı, böbrek korteksi ve medullasının kontrol grubu ile benzer özelliklerde, normal morfolojik görünümde oldukları dikkati çekti.



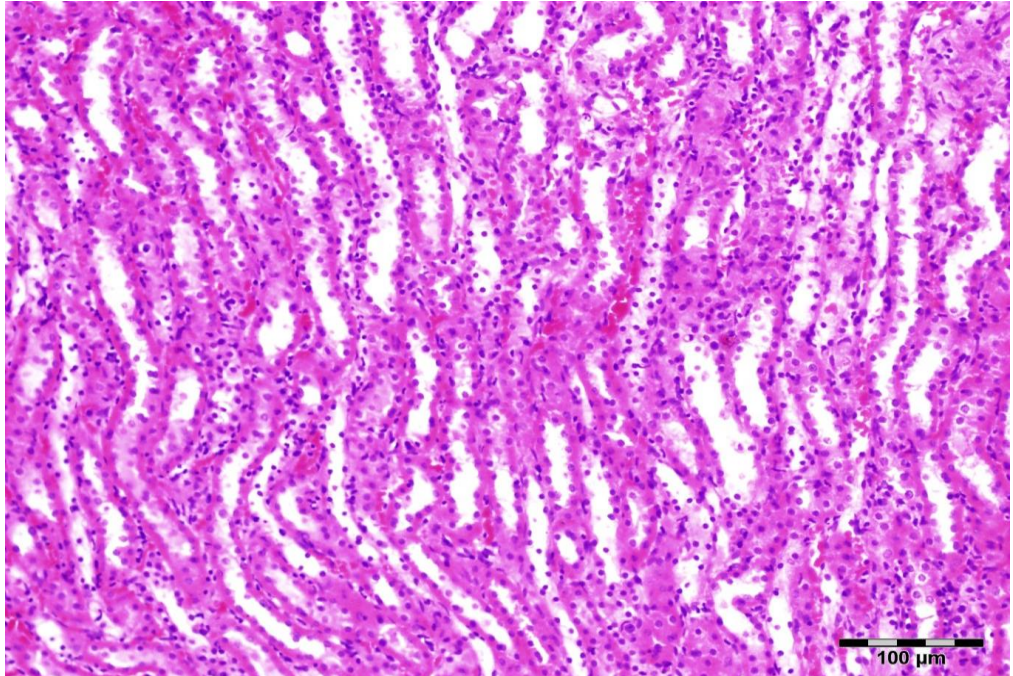
Şekil 4.24. Uçucu yağ 200 mg Grubu. Böbrek korteksi içerisinde renal cisimcikler (RC), proksimal (P) ve distal (D) tübüller izlenmekte. Bar=100 µm.



Şekil 4.25. Uçucu yağ 200 mg Grubu. Böbrek medullası normal görünümde izlenmekte. Bar=100 µm.



Şekil 4.26. Uçucu yağ 400 mg Grubu. Böbrek korteksi içerisinde renal cisimcikler (RC), proksimal (P) ve distal (D) tübüller normal yapıda izlenmekte. Bar=100 µm.



Şekil 4.27. Uçucu yağ 400 mg Grubu. Böbrek medullası normal görünümde izlenmekte. Bar=100 µm.

5. TARTIŞMA

Wistar albino türü erkek sıçanlarla yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında *Cyclotrichium niveum* (dağ nanesi) bitkisinin uçucu yağ, su ve etanol ekstralarının, gentamisine deneysel olarak oluşturulan nefrotoksisite üzerine etkileri incelendi ve uçucu yağ ile etanol ekstralarının bu antibiyotikğin neden olduğu renal hasara karşı koruyucu etkiye sahip olduğu tesbit edildi.

Aminoglikozit türevi bir antibiyotik olan gentamisin, gram(-) aerobik bakteri enfeksiyonlarında terapötik değeri olan bir ajandır. Ancak nefrotoksik yan etkisi, gentamisinin klinik kullanımını sınırlamaktadır. Gentamisin nefrotoksitesisi sonucunda akut tübüler nekrozun olduğu ve biyokimyasal analizde BUN ve kreatinin düzeylerinin yükseldiği görülmüştür. Bu yan etkiye oksidatif stresin artmasının, L-arginin-NO yolağının bozulmasının katkılarının olduğu önceden yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir. Nitekim L-arginin verilmesi¹³² veya reaktif oksijen radikallerinin azaltılması ile gentamisinin meydana getirdiği renal fonksiyon bozuklukları düzeltilebilmektedir. Oksidatif stresi azaltmak amacıyla, süperoksit dismutaz²⁸, desferroksamin¹⁸, poliasorbik asit²⁹, selenyum, melatonin³⁰, tempol³¹, E vitamini³², probukol, askorbik asit gibi antioksidanların uygulanması ile gentamisinin oluşturduğu nefrotoksisite önlenmektedir.

Cyclotrichium niveum bitkisi, antioksidan aktivitesinin yüksek olmasıyla dikkat çekmektedir. Bu bitki ile sıçan ileumunda ve mesanesinde yapılan bir çalışmada, bitkiden elde edilen uçucu yağın hem antioksidan etkiye hem de mesane düz kaslarında ve ileum çizgili kaslarında gevşemeye yol açtığı görülmüştür³³. *C. niveum* ekstresi ile in vitro yapılan bir diğer çalışmada ise, bitki içeriğinde bulunan total flavonoid konsantrasyonu, total antioksidan aktivitesi, total redüksiyon kapasitesi, hidrojen peroksit temizleyici aktivitesi, radikal temizleyici aktivitesi, süperoksit anyon süpürücü aktivitesi ve anti mikrobiyal aktivitesi test edilmiş ve bitki ekstresinin hem antioksidan hem de

antimikrobiyal etkilere sahip olduğu görülmüştür³⁴. Hücre kültürlerinde yapılan bir başka çalışmada ise, adı geçen bitkinin anti kanser özelliklere sahip olduğu kaydedilmiştir³⁵.

Bu tez çalışmasında *C. niveum* bitkisinden uçucu yağ, su ve etanol ekstreleri elde edildikten sonra, bu formülasyonların antioksidan kapasite analizleri yapıldı. DPPH yöntemiyle yapılan bu analiz sonucunda formülasyonların hepsinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Bu analizde en yüksek antioksidan aktiviteyi su ekstresi gösterdi. Ayrıca *C. niveum* bitkisinin uçucu yağıyla yapmış olduğumuz kromatografik analizde 20 adet etken maddeye rastlandı ve bu bileşenler içerisinde en yüksek oranda (% 79.6) bulunan madde olarak “pulegon” tespit edildi. Elde edilen bu bulgular literatür çalışmalarıyla uyumluluk göstermektedir^{33,34,127,128}.

Bu çalışmada, gentamisin verilen (100 mg/kg/8 gün, i.m.) hayvanlardan alınan kan örneklerinde ölçülen BUN ve kreatinin değerleri ile oksidatif stresin göstergesi olarak değerlendirilen MDA düzeyi sonuçlarının, gentamisin uygulanmamış kontrol hayvanlarına göre artmış olduğu gözlemlendi. Yapılan histopatolojik incelemede de gentamisin alan grupta böbrek korteksinde; kapillerlerin genişlediği, konjesyon oluştuğu ve interstisyel alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun meydana geldiği gözlemlendi. Ayrıca böbrek medullasında; kanlanma artışı, konjesyon ve inflamasyon oluştuğu görüldü. Çalışmamızda gentamisin uygulanan hayvanlara bu antibiyotikle birlikte etanol ekstresi 200 ve 400 mg/kg, su ekstresi 200 mg/kg, uçucu yağ 200 ve 400 mg/kg, pulagon 50 ve 100 mg/kg olarak oral yoldan (gastrik gavajla) uygulandı. Özellikle etanol ve uçucu yağ ekstrelerinin 400 mg/kg’lık dozunda ve pulagonun 100 mg/kg dozunda BUN ve kreatinin değerlerinin, sadece gentamisin uygulanan gruba göre anlamlı bir biçimde azaldığı görüldü. Ayrıca oksidatif stresin göstergesi olan MDA düzeylerinin de düştüğü görüldü. Bu gruplarda yapılan histopatolojik incelemede de böbrek korteksi ve medullanın, proksimal tübüllerin, gentamisin grubuna kıyasla daha iyi korunduğu, kontrol grubu ile benzer görünümde olduğu, sadece gentamisin uygulanan gruptaki tübüler hasarın, konjesyon ve inflamasyonun azaldığı görüldü. Ancak su ekstresi grubuna ait dokuların kesitlerinde böbrek korteks ve medullası, gentamisin grubu ile benzer görünümdeydi.

Bu bulgular *C. niveum*’un uçucu yağ ve etanol ekstrelerinin gentamisinle birlikte verildiğinde gentamisine bağılı nefrotoksisiteyi etkili bir şekilde önlediğini ve bu etkiden

bitkinin pulegon içeriğinin sorumlu olabileceğini telkin etmektedir. Ancak, su ekstresinin BUN ve kreatinin düzeylerinin düşürülmesinde ve histopatolojik bulguları düzeltmede etkili olmamasına rağmen, MDA düzeylerini düşürdüğü görüldü. Polifenolik maddelerin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Su ekstresinin yüksek antioksidan etki göstermesi, içerdiği suda çözünebilir flavonoidlerden kaynaklanabilir. Ancak pulegon lipofilik bir madde olduğundan suda çözünmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda pulegonun çözücüsü olarak yağ (soybean oil) kullanılmıştır. Su ekstresinin nefrotoksisiteyi önleyememesi bu sebepten olabilir. Bu bulgu, *C. niveum*'un gentamisine bağlı nefrotoksisiteyi önlemesinde antioksidan etkiyle birlikte bilinmeyen başka mekanizmaların da katkısı olabileceğini göstermektedir. Ancak bunun araştırılması gereklidir.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, birlikte verildiğinde, *C. niveum*'un su ekstresi değil fakat uçucu yağ ve etanol ekstresinin, gentamisine oluşturulan nefropatiye karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu, bu etkiden onun yağda çözünebilir içeriği olan pulegonun sorumlu olabileceğini telkin etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgular, *C. niveum* bitkisinin, uçucu yağ ve etanol ekstraktlarının, gentamisin uygulamasıyla oluşturulan deneysel nefrotoksisiteye karşı koruyucu bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu etkiden *C. niveum*'un pulegon içeriği sorumlu olabilir.
- Gentamisinin bakterisit etkinliğini azaltmaksızın, nefrotoksik etkisini azaltacak veya önleyecek yardımcı ajanların geliştirilmesi, bu antibiyotiğin klinik kullanımında ortaya çıkan sakıncaları ortadan kaldırabilir.
- *C. niveum* bitkisinin uçucu yağ, su ve etanol ekstraktlarının yapılacak başka deneylerde daha yüksek dozlarda uygulanarak denenmesi, bitki ekstresinin etkileri ile ilgili yeni bulgulara ulaşılmasını sağlayabilir.
- *C. niveum*'un su ekstresinin güçlü antioksidan etki göstermesine rağmen gentamisine bağlı nefropatiyi geri çevirmemesi, bitkinin antioksidan mekanizma yanında bilinmeyen başka mekanizmalarla da etki gösterdiğini işaret etmektedir. İleri çalışmalarda bu bitkinin renal hasara karşı koruyucu etki mekanizmasını anlamaya yönelik yeni çalışmalar yapılması bilimsel literatüre katkı sağlayacaktır.
- Ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde doğal olarak yetişen ve endemik bir bitki olan *C. niveum*'un nefrotoksisiteye karşı koruyucu bir etki göstermesi, bu bitkinin bir ilaç kaynağı olarak değerini ve önemini arttırmaktadır. Bu bitki ile yapılacak deneysel çalışmaların artması ve bitkinin antioksidan etkinliğinin çeşitli alanlarda değerlendirilmesi ile bilimsel literatüre ve ülke ekonomisine birçok yönden önemli katkıları olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Maden M.** Deneysel Gentamisin Nefrotoksitesinde Üriner Enzim Aktivitelerinin Önemi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, **1994**.
2. **Anderson RJ, Barry DW.** Clinical and laboratory diagnosis of acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* **2004**;18(1):1-20.
3. **Yüzkollar Süzölmüş B.** Kontrast Madde Kullanımına Bağlı Gelişen Akut Böbrek Hasarının Erken Tanısında mikroRNA 21'in Yeri. Uzmanlık Tezi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, **2018**.
4. **Balakumar P, Rohilla A, Thangathirupathi A.** Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol Res.* **2010**;62(3):179-186.
5. **Ginsburg DS, Qunintanilla AP, Levin M.** Renal glycosuria due to gentamicin in rabbits. *J Infect Dis.* **1976**;134(2):119-122.
6. **Kaloyanides GJ, Pastoriza-Munoz E.** Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int.* **1980**;18:571-582.
7. **Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM.** Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**;43(5):1003-1012.
8. **Can C, Şen S, Neşe B, Işık T.** Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. *Eur J Pharmacol.* **2000**;390:327-334.
9. **Mıstık R.** Aminoglikozid antibiyotikler ve günde tek doz kullanımları. *Klin Derg.* **2000**;13(2):43-45.
10. **Ghaznavi R, Faghihi M, Kadkhodae M, Shams S, Khastar H.** Effects of nitric oxide on gentamicin toxicity in isolated perfused rat kidneys. *J Nephrol.* **2005**;18:548-552.
11. **Dhanarajan R, Amraham P, Isaac B.** Protective effect of ebselen, a selenoorganic drug, against gentamicin-induced renal damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2006**;99:267-272.
12. **Ekor M, Farombi EO, Emerole GO.** Modulation of gentamicin-induced renal dysfunction and injury by the phenolic extract of soybean (Glycine max). *Fundam Clin Pharmacology.* **2006**;20:263-271.
13. **Sılan C, Uzun Ö, Çomunoğlu NÜ, Gökçen S, Bedirhan S, Cengiz M.** Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats ameliorated and healing effects of resveratrol. *Biol Pharm Bull.* **2007**;30(1):79-83.
14. **Wargo KA, Edwards JD.** Aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *J Pharm Pract.* **2014**;27(6):573-577.
15. **Whiting PH, Brown PAJ.** The relationship between enzymuria and kidney enzyme activities in experimental gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail.* **1996**;18(6):899-909.
16. **Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA, Mohamed GA.** Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull.* **2009**;32(1):61-67.
17. **Kays SE, Crowell WA, Johnson MA.** Iron supplementation increase gentamicin nephrotoxicity

in rats. *J Nutr.* **1991**;121:1869-1875.

18. **Ben-Ismail TH, Ali BH, Bashir AA.** Influence of iron, deferroxamine and ascorbic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol.* **1994**;25:1249-1252.
19. **Olbricht CJ, Fink M, Gutjahr E.** Alterations in lysosomal enzymes of the proximal tubule in gentamicin nephrotoxicity. *Kidney Int.* **1991**;39:639-646.
20. **Kandemir FM, Ozkaraca M, Yildirim BA, Hanedan B.** Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy in rats. *Ren Fail.* **2015**;37(3):518-525.
21. **Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M.** Effects of cosupplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol.* **2005**;90:571-576.
22. **Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Barrera D, Cerón A, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R.** Protective effect of diallyl sulfide on oxidative stress and nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Mol Cell Biochem.* **2003**;254:125-130.
23. **Martínez-Salgado C, Rodríguez-Barbero, Alicia Eleno N, López-Novoa JM.** Gentamicin induces jun-AP1 expression and JNK activation in renal glomeruli and cultured mesangial cells. *Life Sci.* **2005**;77(18):2285-2298.
24. **Bedirhan S.** Sıçanlarda Oluşturulan Gentamisin Nefrotoksisitesinde Resveratrol ve E Vitamininin Protektif Etkilerinin Karşılaştırılması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Bolu, **2005**.
25. **Rybak MJ, Frankowski JJ, Edwards DJ, Albrecht LM.** Ultrafiltration coefficient of isolated glomeruli of rats aged 4 days to maturation. *Kidney Int.* **1985**;28:926-928.
26. **Yanagida C, İto K, Komiya I, Horie T.** Protective effect of fosfomycin on gentamicin induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chem Biol Interact.* **2004**;148(3):139-147.
27. **Aygün FÖ.** Sıçanlarda Deneysel Gentamisin Nefrotoksisitesinde Oksidatif Stresin Rolünün ve Olası Oksidatif Stres Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, **2010**.
28. **Ali BH, Bashir AK.** Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol.* **1996**;27:349-353.
29. **Swan SK, Gilbert DN, Kohlhepp SJ, Leggett JE, Kohnen PW, Bennett WM.** Duration of the protective effect of polyascorbic acid on experimental nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* **1992**;36:2556-2558.
30. **Ozbek E, Turkoz Y, Sahna E, Ozugurlu F, Mizrak B, Ozbek M.** Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int.* **2000**;85:742-746.
31. **Karataş Y, Seçilmiş MA, Karayaylalı İ, Doran F, Büyükaşar K, Şingirik E, Sağlıker YDA.** Effect of tempol (4-hydroxy tempo) on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* **2004**;18:79-83.
32. **Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Attia FF.** Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Pharmacol Res.* **1999**;40:183-187.
33. **Cetinus SA, Göze I, Saraç B, Vural N.** Scavenging effect and antispasmodic activity of the essential oil of *Cyclotrichium niveum*. *Fitoterapia.* **2007**;78(2):129-133.
34. **Gülçin İ, Tel AZ, Kirecci E.** Antioxidant, antimicrobial, antifungal and antiradical activities of *Cyclotrichium niveum*. *International J Food Prop.* **2008**;11:450-471.

35. **Özdemir A, Yildiz M, Senol FS, Şimay YD, İbişoğlu B, Gökbulut A, Orhan IE, Ark M.** Promising anticancer activity of *Cyclotrichium niveum* L. extracts through induction of both apoptosis and necrosis. *Food Chem Toxicol.* **2017**;109:898-909.
36. **Ganong WF.** *Tıbbi Fizyoloji*. 16. Baskı. (Doğan A, ed.). İstanbul: Barış Kitabevi; **1995**.
37. **Eralp O.** Deneysel Olarak Oluşturulan Böbrek İskemi Reperfüzyon Sonrası Oluşan Böbrek Hasarına Karşı Carnosol'un Koruyucu Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, **2013**.
38. **Mitil HA.** Rat Modelinde Kadaverik Donörden Alınacak Böbreklerin Fonksiyonlarının Dinamik Böbrek Sintigrafisi ile Gösterilmesi. Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, **2013**.
39. **Rang HP, Dale MM, Ritter JM.** The Kidney. In: Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, eds. *Rang & Dale's Pharmacology*. 8th ed. Churchill Livingstone; **2015**:367-384.
40. **Akpolat T, Utaş C, Suleymanlar G.** *Nefroloji El Kitabı*. 4. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp; **2007**.
41. **Rosenfield AT, Taylor KJ, Crade M, DeGraaf CS.** Anatomy and pathology of the kidney by gray scale ultrasound. *Radiology.* **1978**;128(3):737-744.
42. **Raij L, Keane WF.** Glomerular mesangium: Its function and relationship to angiotensin II. *Am J Med.* **1985**;79(3C):24-30.
43. **Dowling TC.** Evaluation of Kidney Function. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 9th ed. United States of America: McGraw-Hill Education; **2014**.
44. **Alpern RJ, Moe OW, Preisig PA.** Chronic regulation of the proximal tubular Na/H antiporter: from HCO₃ to SRC. *Kidney Int.* **1995**;48(5):1386-1396.
45. **Donnelly S.** Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a critmeter. *Am J Kidney Dis.* **2001**;38(2):415-425
46. **Guyton AC, Hall JE.** *Tıbbi Fizyoloji*. 10th ed. (Solakoğlu Z, ed.). İstanbul: Nobel Tıp; **2001**.
47. **Cogan MG.** *Sıvı ve Elektrolitler (Fizyoloji ve Patofizyoloji)*. 1st ed. (Başaklar AC, ed.). İstanbul: Barış Kitabevi; **1994**.
48. **Coe FL, Brenner BM.** Disorders of the Kidney and Urinary Tract. In: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Ljubljana: McGraw -Hill Book Company; **1987**:1139-1155.
49. **Ives HE, Warnock D.** Diuretic Agents. In: Katzung BG, ed. *Basic and Clinical Pharmacology*. Prentice Hall Int. Inc; **1995**:230-249.
50. **Horoz M, Özgür O.** Akut Böbrek Yetmezliği. *Harran Tıp Fakültesi Derg.* **2004**;1(3):48-63.
51. **Şentürk S, Çetin M, Gölcü E, Udum D.** Akut ve Kronik Böbrek Yetmezliğine Sahip Köpeklerde Lipid Profilinin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Vet Fakültesi Derg.* **2003**;22(1-2-3):13-17.
52. **Albright RC.** Acute Renal Failure: A Practical Update. *Mayo Clin Proc.* **2001**;76(1):67-74.
53. **Rewa O, Bagshaw SM.** Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol.* **2014**;10(4):193-207
54. **Lameire NH, Vanholder R.** Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* **2004**;18(1):21-36.
55. **Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A.** Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy. *J Clin Invest.* **2004**;114(1):5-14

56. **Aydın OÖ.** Kardiyopulmoner Baypass Sonrası Gelişen Böbrek Hasarının Risk Faktörleri, Hemoliz ve Serum Ferritin Seviyesi ile İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi, **2006**.
57. **Srisawat N, Kellum JA.** Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome. *Curr Opin Crit Care.* **2011**;17(6):548-555
58. **Stein JH.** Acute renal failure lessons from pathophysiology. *West J Med.* **1992**;156(2):176-182.
59. **Bicik Z, Ersan S.** Akut renal yetmezlik. *Türk Nefroloji Diyal ve Transplant Derg.* **1999**;3:113-117.
60. **Evenepoel P.** Acute toxic renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* **2004**;18(1):37-52.
61. **Kaya DG.** Akut Böbrek Hasarında Erken Tanı Göstergeleri. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, **2010**.
62. **Andreoli SP.** Acute kidney injury in children. *Pediatr Nephrol.* **2009**;24(2):253-263
63. **Hesselink DA, Bouamar R, Van Gelder T.** The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Ther Drug Monit.* **2010**;32(4):387-393
64. **Pfaller W, Gstraunthaler G.** Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect.* **1998**;106(suppl 2):559-569
65. **Brier ME, Mayer PR, Brier RA, Visscher D, Luft FC, Aronoff GR.** Relationship between rat renal accumulation of gentamicin, tobramycin, and netilmicin and their nephrotoxicities. *Antimicrob Agents Chemother.* **1985**;27(5):812-816
66. **Parlakpınar H, Örümlü MH, Acet A.** İlaça bağlı nefrotoksistelerde serbest oksijen radikalleri. *F Ü Sağlık Bilimleri Tıp Derg.* **2013**;27(1):51-56.
67. **Lameire NH, Flombaum CD, Moreau D, Ronco C.** Acute renal failure in cancer patients. *Ann Med.* **2005**;37(1):13-25.
68. **Van Vleet TR, Schnellmann RG.** Toxic nephropathy: environmental chemicals. *Semin Nephrol.* **2003**;23(5):500-508.
69. **Ferguson MA, Vaidya VS, Bonventre JV.** Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology.* **2008**;245(3):182-193
70. **Patzner L.** Nephrotoxicity as a cause of acute kidney injury in children. *Pediatr Nephrol.* **2008**;23(12):2159-2173.
71. **Robinson DC, Millares M.** Acute and Chronic Renal Diseases. In: Herfindal EF, Gourley DR, Hart LL, eds. *Clinical Pharmacy and Therapeutics*. Baltimore: Williams and Wilkins; **1992**:347-371.
72. **Erkurt MA, Kuku İ, Kaya A, Aydoğdu İ.** Cancer chemotherapy and kidney. *İnönü Üniversitesi Tıp Fak Derg.* **2009**;16(1):63-68.
73. **Parlakpınar H, Örümlü MA, Acet A.** Kafeik asit fenetil ester (KAFE) ve miyokardiyal iskemi reperfüzyon (MİR) hasarı. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilim Derg.* **2012**;1:10-15.
74. **Bennett WM.** Aminoglycoside Nephrotoxicity. *Nephron.* **1983**;35(2):73-77.
75. **Bennett WM.** Comparison of cyclosporine nephrotoxicity with aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Nephrol.* **1986**;25(Suppl 1):126-129.
76. **Kayaalp O.** Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Pelikan Yayıncılık; **2009**.
77. **Dökmeci İ.** Farmakoloji Temel Kavramlar. Nobel Tıp; **2000**.

78. **Edelstein CL, Schrier RW.** Acute Renal Failure: Patogenesis, Diagnosis and Management. In: Schrier RW, ed. *Renal and Electrolyte Disorders*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; **2003**:401-433.
79. **Matzke GR, Lucarotti RL, Shapiro HS.** Controlled comparison of gentamicin and tobramycin nephrotoxicity. *Am J Nephrol*. **1983**;3(1):11-17.
80. **Shanley PF, Burke TJ.** Differential susceptibility to gentamicin toxicity within the proximal convoluted tubule. *Ren Fail*. **1990**;12(2):83-87.
81. **Koç M, Arıkan H, Odabaşı Z, Akoğlu E.** İskemik ve toksik akut tübüler nekroz patofizyolojisi. *Türk Nefroloji Diyal ve Transplant Derg*. **2006**;15:13-24.
82. **Brion N, Barge J, Godefroy I, Dromer F, Dubois C, Contrepois A, Carbon C.** Gentamicin, netilmicin, dibekacin and amikacin nephrotoxicity and its relationship to tubular reabsorption in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*. **1984**;25(2):168-172
83. **Brunton LL, Lazo JS, Parker KL.** *Goodman&Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli*. (Süzer Ö, ed.). İstanbul: Nobel Tıp; **2008**.
84. **Barclay ML, Begg EJ, Hickling KG.** What is the evidence for once-daily aminoglycoside therapy? *Clin Pharmacokinet*. **1994**;27(1):32-48.
85. **Deamer RL, Dial LK.** The evolution of aminoglycoside therapy: a single daily dose. *Am Fam Physician*. **1996**;53(5):1782-1786.
86. **Sastrasinh M, Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD.** Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. *J Pharmacol Exp Ther*. **1982**;222(2):350-358.
87. **Feldman S, Wang MY, Kaloyanides GJ.** Aminoglycosides induce a phospholipidosis in the renal cortex of the rat: an early manifestation of nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. **1982**;220(3):514-520.
88. **Nonclercq D, Wrona S, Toubeau G, Zanen J, Heuson-Stiennon JA, Schaudies RP, Laurent G.** Tubular injury and regeneration in the rat kidney following acute exposure to gentamicin: a time-course study. *Ren Fail*. **1992**;14(4):507-521
89. **De Broe ME, Paulus GJ, Verpooten GA, Roels F, Buysens N, Wedeen R, Van Hoof F, Tulkens PM.** Early effects of gentamicin, tobramycin and amikacin on the human kidney. *Kidney Int*. **1984**;25(4):643-652.
90. **Humes HD, Weinberg JM.** Alterations of renal tubular cell metabolism in acute renal failure. *Min Electrolyte Metab*. **1983**;9(4-6):290-305.
91. **Williams PD, Holohan PD, Ross CR.** Gentamicin nephrotoxicity. I. Acute biochemical correlates in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. **1981**;61(2):234-242.
92. **Bennett WM.** Aminoglycoside nephrotoxicity. *Nephron*. **1983**;35(2):73-77.
93. **Neugarten J, Aynedjian HS, Bank N.** Role of tubular obstruction in acute renal failure due to gentamicin. *Kidney Int*. **1983**;24(3):330-335.
94. **Mycek MJ, Howland RD.** *Lippincott Illustrated Review of Pharmacology*. 3rd ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; **2004**.
95. **Ali BH.** Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol*. **1995**;26(7):1477-1487.
96. **Polat A, Parlakpınar H, Tasdemir S, Colak C, Vardi N, Ucar M, Emre MH, Acet A.** Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Histochem*.

- 2006;108(5):365-371.
97. **Üstyoğlu EA.** Sıçanlarda Gentamisin ile Oluşturulan Böbrek Hasarında Hemoksijenaz-1'in Rolünün İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, **2015**.
 98. **Walker PD, Barri Y, Shah SV.** Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Renal Failure*. **1999**;21(3-4):433-442.
 99. **Volpini RA, Balbi AP, Costa RS, Coimbra TM.** Increased expression of p38 mitogen-activated protein kinase is related to the acute renal lesions induced by gentamicin. *Brazilian J Med Biol Res*. **2006**;39(6):817-823.
 100. **Tulkens PM.** Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol Lett*. **1989**;46(1-3):107-123.
 101. **Weinberg JM, Hunt D, Humes HD.** Distribution of gentamicin among subcellular fractions from rat renal cortex. *Biochem Pharmacol*. **1985**;34(10):1779-1787.
 102. **Erdem A, Gündoğan NÜ, Usubütün A, Kiliç K, Erdem SR, Kara A, Bozkurt A.** The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant*. **2000**;15(8):1175-1182.
 103. **Williams PD, Hottendorf GH.** Inhibition of renal membrane binding and nephrotoxicity of gentamicin by polyasparagine and polyaspartic acid in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. **1985**;47(2):317-320.
 104. **Ali BH, Al-Wabel N, Mahmoud O, Mousa HM, Hashad M.** Curcumin has a palliative action on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. **2005**;19(4):473-477.
 105. **Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV.** Acute renal failure. *N Engl J Med*. **1996**;334(22):1448-1460.
 106. **Köse Sİ, Maden M.** Üriner Biyobelirteçler. *Türkiye Klin J Vet Sci*. **2015**;6(1):7-18.
 107. **Reiser IW, Porush JG.** Evaluation of Renal Function. In: Massry SG, Glasscock RJ, eds. *Textbook of Nephrology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; **2001**:1793-1802.
 108. **Anderson S.** Proteinuria. In: Greenberg A CT, ed. *Primer on Kidney Diseases*. 3rd ed. San Diego: Academic Press; **2001**:42-46.
 109. **Kasike BL, Keane WF.** Laboratory Assessment of Renal Disease. In: Brenner B, ed. *The Kidney*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; **2000**:1129-1170.
 110. **Burgucu HÇ.** Gentamisin ilişkili Akut Böbrek Yetmezliğinde Ürotensin-II Reseptör Antagonisti Palosuranın Etkisi. Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, **2013**.
 111. **Lieberthal W, Nigam SK.** Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol*. **1998**;275(5):623-613.
 112. **Ueda N, Shah SV.** Tubular cell damage in acute renal failure - Apoptosis, necrosis, or both. *Nephrol Dial Transplant*. **2000**
 113. **Brezis M, Rosen S, Silva P, Epstein FH.** Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney. *Kidney Int*. **1984**;25(1):65-72
 114. **Heyman SN, Lieberthal W, Rogiers P, Bonventre JV.** Animal models of acute tubular necrosis. *Curr Opin Crit Care*. **2002**;8(6):526-534.
 115. **Kantarıcı G, Duman S.** Nefrolojide Deneysel Modeller Özel Sayısı. *Türkiye Klin Nefroloji*. **2010**;3(3):11-21.
 116. **Uysal M.** Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesi

etkileyen koşullar. *Klin Gelişim*. **1998**;11(1-2):336-31.

117. **McCord JM**. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*. **1993**;26(5):351-357.
118. **Altay Z**. Siklofosfamid Uygulanan Ratlarda Nefrotoksisite Üzerine Propolisin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, **2016**.
119. **Akkuş İ**. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Konya: Mimoza Yayıncılık; **1996**.
120. **Nakazawa H, Genka C, Fujishima M**. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol*. **1996**;46(1):15-32.
121. **Halliwell B, Gutteridge JMC**. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; **1999**.
122. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. **2007**;39(1):44-84.
123. **Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J**. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. **1994**;17(3):235-248.
124. **Temel M**. Batı Anadolu Bölgesinde Yayılış Gösteren Origanum L. (Lamiaceae) Türleri Üzerinde Biyosistemik Çalışmalar. Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, **2000**.
125. **Baytop T**. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün*. 2. baskı. Nobel Tıp; **1999**.
126. **Başer KHC**. Essential Oils of Anatolian Labiateae: A Profile. *Acta Hort*. **1993**;333:217-237.
127. **Emen S, Çeken B, Kizil G, Kizil M**. DNA damage protecting activity and in vitro antioxidant potential of the methanol extract of cyclotrichium niveum. *Pharm Biol*. **2009**;47(3):219-229.
128. **Orhan I, Şenol FS, Gülpınar AR, Kartal M, Sekeroğlu N, Deveci M, Kan Y, Sener B**. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of cyclotrichium niveum, Thymus praecox subsp. caucasicus var. caucasicus, Echinacea purpurea and E. pallida. *Food Chem Toxicol*. **2009**;47(6):1304-1310.
129. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C**. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*. **1995**;28:25-30.
130. **Nithya P, Madhavi C**. Antioxidant studies of 3-arylidene-4-piperidones by DPPH assay. *J Taibah Univ Sci*. **2017**;11(1):40-45.
131. **Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J**. Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*. **2010**;15(10):6905-6930.
132. **Seçilmiş MA, Karataş Y, Yorulmaz Ö, Büyükaşar K, Şingirik E, Doran F, Inal TC, Dikmen A**. Protective effect of L-arginine intake on the impaired renal vascular responses in the gentamicin-treated rats. *Nephron Physiol*. **2005**;100(2):13-20.

ÖZGEÇMİŞ

Gazihan Harun Özsayın, 22.04.1972 yılında Adıyaman’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adıyaman’da tamamladı. Yüksek öğrenime başladığı İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 1997 yılında mezun oldu. Aynı yıl Adıyaman’da eczane açarak serbest eczacılık yapmaya başladı. 1999 yılında Demet Emre Özayın ile evlendi. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Adıyaman’da eczacılık mesleğine devam etmekte olup, bir kız çocuk babasıdır.