

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) VERİLEN RAT BÖBREK
DOKULARINDA OKSİDAN /ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

DR. BEDRİYE KİTİZ

Tez Danışmanı
PROF. DR. MUSTAFA KAVUTÇU

ANKARA

Mart 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 7/12/2011

Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU
Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Orhan CANPOLAT
Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Serdar ÖZTÜRK
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Şekil, Tablo, Grafik ve Resim Listeleri	vi
Semboller, Kısaltmalar	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karbon tetraklorür	3
2.1.1. Karbon tetraklorürün Organizmaya Olan Etkileri:.....	3
2.2. Oksidatif Stres-Böbrek ilişkisi.....	5
2.3. Böbrek Anatomisi, Histolojisi ve Fizyopatolojisi	7
2.3.1.Nefronlar	9
2.3.2.Böbreğin Histofizyolojisi	11
2. 3.3 Böbrek İşlevinin Değerlendirilmesi.....	13
2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	15
2.4.1. Oksidatif Stres	15
2.4.2. Serbest Radikaller	16
2.4.2.1. Serbest Radikal Kaynakları.....	18
2.4.2.2. Serbest Radikal Türevleri.....	19
2.4.2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$).....	21
2.4.2.2.2 Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	22

2.4.2.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	23
2.4.2.2.4. Hipokloröz Asit (HOCl)	24
2.4.2.2.5. Singlet Oksijen (1O_2)	24
2.4.2.2.6. Perhidroksil Radikali ($HOO^\bullet$).....	24
2.4.2.2.7. Peroksil radikali ($ROO^\bullet$).....	25
2.4.2.2.8. Nitrik Oksit ($NO^\bullet$)	25
2.4.2.2.9. Peroksinitrit ($ONOO^-$).....	25
2.4.2.3. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu	26
2.5. Antioksidan Sistem	27
2.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	29
2.5.1.1. Glutasyon (GSH)	32
2.5.1.2. Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar	33
2.5.1.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1).....	33
2.5.1.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px; EC 1.11.1.9)	34
2.5.1.2.3. Glutasyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.8).....	36
2.5.1.2.4. Katalaz (CAT EC 1.11.1.6)	37
2.5.1.2.5. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH, EC 1.1.1.49).....	38
2.6. Böbrek ve Antioksidan Enzimler	39
2.7. Stobadin	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Deney Grupları	42
3.2. Kullanılan Aletler.....	43
3.3. Yöntemlerin Uygulanması.....	44

3.3.1. Böbrek Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi	44
3.3.2. Böbrek Dokusunda Malondialdehit (MDA) Tayini	44
3.3.3. Böbrek Dokusunda Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	46
3.3.4. Böbrek Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi Tayini	47
3.3.5. Böbrek Dokusunda Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	48
3.3.6. Böbrek Dokusunda Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi Tayini	49
3.3.7. Böbrek Dokusunda Protein Tayini	50
3.3.8. Böbrek Doku Hücrelerinde Histopatolojik Değerlendirme	51
3.4. İstatistiksel Analiz	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Biyokimyasal ve Histopatolojik Bulgular.....	53
4.2. Histopatolojik Bulgular:	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	73
6. KAYNAKLAR	79
7. ÖZET	93
8. SUMMARY	95
9. EKLER	97
9.1. Teşekkür	97
9.2. Etik Kurul Raporu.....	98
10. ÖZGEÇMİŞ.....	99

ŞEKİL, TABLO, GRAFİK VE RESİM LİSTELERİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Böbreğin Yapısı	8
Şekil 2. Nefron ve kan dolaşımının basitleştirilmiş şeması	9
Şekil 3. Glomerulün hücresel yapısı	10
Şekil 4. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi.....	20
Şekil 5. Metallerin katalizlediği lipid peroksidasyonu.....	26
Şekil 6. Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler.....	27
Şekil 7. Memeli Hücrelerinde Antioksidan Sistem.....	28
Şekil 8. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon	36
Şekil 9. Stobadin'in yapısı.....	40
Şekil 10. TBA-MDA kompleksi oluşumu.	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Rat böbrek dokularına ait Ortalama $\pm$ Standart sapma olarak SOD, CAT, GSH-Px ve GST enzim aktiviteleri ile TBARS değerler.....	53
--	----

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: MDA Standart Grafiği	46
Grafik 2: Protein Standart Grafiği.....	50
Grafik 3: Kontrol, CCl ₄ , Stobadine ve CCl ₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait SOD aktiviteleri	55
Grafik 4: Kontrol, CCl ₄ , Stobadine ve CCl ₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait CAT Aktiviteleri.....	55
Grafik 5: Kontrol, CCl ₄ , Stobadine ve CCl ₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait GSH-Px Aktiviteleri.....	56
Grafik 6: Kontrol, CCl ₄ , Stobadine ve CCl ₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait GST Aktiviteleri.....	56
Grafik 7: Kontrol, CCl ₄ , Stobadine ve CCl ₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait TBARS Değerleri.....	57
Grafik 8: Kontrol, CCl ₄ , Stobadine ve CCl ₄ + Stobadine uygulanan Rat Böbrek dokusuna ait Enzim Aktiviteleri ve TBARS Değerleri {CAT(:100), GST(x10) }.....	57

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Kontrol grubuna ait panoramik böbrek.....	59
Resim 2: Kontrol grubuna ait büyük büyültmede böbrek korteksi	60
Resim 3: Kontrol grubuna ait böbreğin medullası	61
Resim 4: Karbon tetraklorür grubuna ait böbreğin korteksi	62
Resim 5: Karbon tetraklorür grubuna ait böbrek korteksinin büyük büyültmesi	63
Resim 6: Karbon tetraklorür grubuna ait korteks.....	64
Resim 7: Karbon tetraklorür grubuna ait kortekste vasküler konjesyon ...	65
Resim 8: Karbon tetraklorür grubuna ait medulla.....	66
Resim 9: Karbontetraklorür ve stobadine grubuna ait böbrek korteksi.....	67
Resim 10: Karbontetraklorür ve stobadine grubuna ait böbrek korteksinin büyük büyültmesi	68
Resim 11: Karbontetraklorür ve stobadine grubuna ait medulla	69
Resim 12: Stobadine grubuna ait böbrek korteksi	70
Resim 13: Stobadine grubuna ait büyük büyültmede böbrek korteksi	71
Resim 14: Stobadine grubuna ait böbreğin medullası	72

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

CCl ₄ :	Karbontetraklorür
CCl ₃ · :	Triklormetil radikali
JGA :	Juktaglomerular Aparatus
GFH :	Glomerular Filtrasyon Hızı
ROT :	Reaktif oksijen türleri/bileşikleri
RNT :	Reaktif Nitrojen Türleri
mM :	Milimolar
µmol :	Mikromol
IU :	İnternasyonal Ünite
CAT :	Katalaz
SOD :	Süperoksit dismutaz
GSH :	Glutasyon
GST :	Glutasyon-s-transferaz
MDA :	Malondialdehit
GSH-Px :	Glutasyon peroksidaz
GSSG :	Okside glutasyon
OH· :	Hidroksil radikali
O ₂ · :	Süperoksit
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
NO· :	Nitrik Oksit
NOS :	Nitrik Oksit Sentaz
NO ₂ · :	Nitrojen Dioksit Radikali
ONOO· :	Peroksinitrit
HCOL :	Hipokloröz Asit
HOBR :	Hipobromöz Asit
FAD :	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN :	Flavin Mononükleotit
MPO :	Myeloperoksidaz
ROO· :	Peroksit Radikal
RO· :	Alkoksil Radikal
¹ O ₂ :	Singlet Oksijen
IP :	intraperitoneal

1. GİRİŞ

Böbrekler vücudun homeostatik mekanizmalarında temel rol oynayan bir organ olup, başlıca görevleri arasında metabolik artık maddeler ile ilaç, toksin gibi ekzojen maddelerin eliminasyonunu sağlamak üzere kanı filtre ederek metabolizmanın son ürünlerini idrar şeklinde dışarı atmak gelir. Bununla beraber vücuttaki su dengesinin korunması, elektrolit ve asit baz dengesinin korunması gibi hayati öneme sahip görevleri de üstlenen böbreğin metabolik fonksiyonları da vardır. Bunlar:

1. Renin, eritropoetin, prostaglandinler, büyüme faktörleri gibi hormon ve benzeri maddelerin sentezi.
2. İnsülin, glukagon, parathormon, kalsitonin, prolaktin, büyüme hormonu, vazopressin ve gastrointestinal hormonların yıkımı ve katabolizması.
3. Hafif zincirler gibi düşük molekül ağırlıklı proteinlerin katabolizması.
4. Glukoneogenez ve lipit metabolizması gibi diğer metabolik fonksiyonları vardır.

Karbon tetraklorür ile deneysel olarak oluşturulan intoksikasyondan ve sirozdan pekçok organ (karaciğer, dalak, pankreas, timus, lenf düğümleri, akciğerler, kalp) ile sistem doğrudan veya dolaylı bir şekilde etkilenmektedir.

Deneysel amaçlı kullanılan CCl_4 'ün böbrek üzerindeki etkisi serbest radikal reaksiyonlarıyla direkt olabildiği gibi dolaylı da

olabilmektedir. CCl_4 'ün karaciğerde yaptığı siroza bağlı sistemik hemodinamik değişiklikler böbreği de etkilemektedir. Böylece sirotik böbrek ve hepatorenal sendrom gibi böbrek patolojileri ve böbrek yetmezliği meydana gelmektedir.

Serbest radikaller, dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron taşıyan, yüklü veya yüksüz, atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller; organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında meydana gelebildikleri gibi, dış etkenlerle de oluşabilirler. Biyolojik sistemlerde bulunan serbest radikallerin başlıcaları; süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil ($\text{OH}^{\cdot}$) radikalleridir. Yaşam süreleri çok kısa, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif olan bu bileşikler tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Serbest radikallerin lipid peroksidasyonunu tetikleyerek oksidatif stresi arttırdığından da bahsedilmektedir.

Canlılarda serbest radikallerin hasarını önleyen, sınırlandıran veya kısmen onaran antioksidan mekanizmalar mevcuttur. Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol alan antioksidanlar; enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non enzimatik yapıda da olabilirler.

Çalışmamızda CCl_4 ile deneysel olarak siroz oluşturulan ratlarda, CCl_4 kullanımının böbrek dokusunda ortaya çıkardığı serbest radikal reaksiyonlarıyla oluşan oksidatif durum ve antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) takip edilmeye çalışılacak. Ayrıca histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama teknikleriyle de hücresel boyuttaki değişiklikler değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. Karbon tetraklorür:

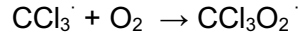
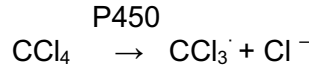
Karbon tetraklorür (CCl_4), klorinatlı bir hidrokarbon bileşiğidir. Önceleri tütsü yapımında, yangın söndürücü olarak, kuru temizleme ajanı olarak, çözücü ve dondurucu olarak kullanılmasına rağmen günümüzde yalnızca soğutucu (freon) floroklorokarbonların üretiminde ara kimyasal bileşik olarak da kullanılmaktadır. Karbon tetraklorürün 3-5 ml insanlarda ağız yoluyla alınması durumunda ölümle sonuçlanabilir. Vücuda solunum, sindirim ve deri yoluyla alınabilir. Emilimden sonra bütün organ ve dokulara dağılır. En çok yağ dokusunda birikir. 2-6 gün içinde yavaş olarak dokulardan ayrılarak başlıca akciğerler ve az miktarda da böbrekler yoluyla atılır.¹

2.1.1. Karbon tetraklorür'ün Organizmaya Olan Etkileri:

Karbon tetraklorür zehirlenmesi merkezi sinir sisteminin baskılanmasına yol açar. Buna bağlı olarak görülen başlıca belirtiler baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, ataksi, titreme, hafıza kaybı, konuşmada saçmalama, uyuma hali ve bilinç kaybıdır. İlk günden itibaren bulantı, kusma ve karın ağrısı, ishal, midede irritasyona bağlı yangı tipi ağrı yapar. Görme bulanıklığı, optik sinir hasarı, işitme kaybına neden olabilir. Emilimden birkaç gün sonra karaciğer yağlanması ve hasarı ile ilgili belirtiler ortaya çıkar. Karaciğer hücrelerinin nekrozu ve şişmesi sonucu AST ve aldolaz enzim düzeyleri artar. Protrombin zamanı uzar.^{2,3} Karaciğerin mikrozomal enzimlerindeki değişimler nedeniyle aminoasit alımı bozulur ve protein sentezi azalır.

CCl₄'ün seçici hepatoksik etkisi olduğu bilinmekte ve deney hayvanlarında siroz oluşturmak için kullanılmaktadır. CCl₄ mikronodüler siroz oluşturur. CCl₄'ün tekrarlayan uygulamalarının serbest radikal üretimine neden olarak sirozu indüklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.^{4,5,6,7,8}

CCl₄'ün yaptığı karaciğer nekrozu lipid peroksidasyonu sonucu oluşur. Toksik etki sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin hücre membranlarındaki lipidlerin doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girmesi membranları oksidatif yıkıma uğrattır.^{9,4,10} CCl₄ karaciğer düz endoplazmik retikulumunda NADPH-sitokrom P 450 elektron transport zincirinde kullanılan karma fonksiyonlu oksidaz sistemi tarafından haloalkan serbest radikali olan triklorometil radikali (CCl₃·) ve triklorometil peroksil radikaline (CCl₃O₂·) metabolize edilir.^{11,7,8}



Bu olayları karaciğerde hücre düzeyinde yağ birikimi ve hücre ölümü izler. Haloalkanlardan karbon tetraklorür ve dibromoetan eş zamanlı olarak sıçan hepatositlerine ya da sağlıklı hayvanlara uygulandığında lipid peroksidasyonunun stimülasyonunda ve hepatosit ölümünde sinerjistik etki yaptığı görülmüştür.⁸

Triklorometil radikalinin oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır. Bu olayları takiben reaktif serbest radikal üretimi karaciğerde antioksidan savunmaları aşar ve bu hücre membranlarının oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.^{12,8}

Karbon tetraklorür karaciğerde hidropik dejenerasyon, yağlanma ile hepatosellüler zon 3 nekrozunda yapmaktadır.^{13,14} Karaciğer hücreleri lipid tutan protein ve trigliseridlerden lipoprotein yapımını başaramaz ve hücrelerde lipid birikimi olur. Peroksit radikallerden yeni radikaller meydana geldiği için bu reaksiyon otokataliktir. Böylece lipidlerin dekompozisyonu nedeniyle ER un yapı ve fonksiyonun da hızlı bir yıkım başlar. Endoplazmik retikulum zedelenmesini mitokondri zedelenmesi izler. Plazma membran geçirgenliğinin artışına bağlı olarak hücrede ilerleyici şişme ve bunu takiben hücre içinde kalsiyum birikimi ve hücre ölümü olur.¹⁵

Karbon tetraklorür ile deneysel olarak oluşturulan intoksikasyondan ve sirozdan pekçok organ (karaciğer, dalak, pankreas, timus, lenf düğümleri, akciğerler, kalp) ile sistem doğrudan veya dolaylı bir şekilde etkilenmektedir.^{16,17,18}

Deneysel amaçlı kullanılan CCl₄ 'ün böbrek üzerindeki etkisi serbest radikal reaksiyonlarıyla direkt olabildiği gibi dolaylı da olabilmektedir. CCl₄'ün karaciğerde yaptığı siroza bağlı sistemik hemodinamik değişiklikler böbreği de etkilemektedir. Böylece sirotik böbrek ve hepatorenal sendrom gibi böbrek patolojileri ve böbrek yetmezliği meydana gelmektedir. Sirozun bütün türlerinde böbrek içi kan dolaşımında olan değişiklikler hepatorenal sendrom için yatkınlık sağlar. Karaciğer fonksiyonları düzeldiğinde geri dönebilir.^{19,20}

2.2.Oksidatif Stres –Böbrek ilişkisi

Kronik böbrek yetmezliği sıklıkla oksidatif stres ile ilişkilidir. Artmış oksidatif durum ve azalmış antioksidan sistem kronik böbrek yetmezlikli hastalardaki üremik kronik komplikasyonların sıklığının artmasına neden olmaktadır. Oksidatif stresin şiddetinin

değerlendirilmesinde çeşitli parametreler kullanılmaktadır. Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehid (MDA) sıklıkla kullanılan bir parametredir.⁶ Bununla birlikte eritrositlerdeki antioksidan olarak bilinen enzimler glutatyon peroksidaz (GSH-Px), superoksit dismutaz (SOD) ve katalaz'ın (CAT) da üremik hastalarda azaldığı gösterilmiştir.^{21,22,23}

Karbon tetraklorürün böbrek yapısı ve fonksiyonu üzerinde etkisinin araştırılması amacıyla deneysel amaçlı CCl₄ kullanılarak siroz oluşturulan ratlarda siroza bağlı olarak hem böbrek yapısında değişiklikler (glomerul ve mezenşial hipersellülerite ve kapiller duvarda kalınlaşma), hem de böbrek fonksiyonlarında değişiklikler (glomerul filtrasyon hızında azalma plazma renin konsantrasyonu ve aktivasyonunda azalma) saptanmıştır.^{24,25}

Ürettiği serbest radikal reaksiyonlarıyla iyi bir hepatotoksik ajan olarak karaciğer bozukluklarına neden olan CCl₄, aynı zamanda oksidatif stresin sonucu olarak akut ve kronik böbrek yetmezliğine de neden olur. Bununla ilgili olarak böbrek homojenat dokusunda yapılan çalışmalarda SOD,CAT ve GSH-Px enzim seviyelerinde anlamlı düşüş saptanmıştır.²⁶

CCl₄ verilmiş ratların böbrek dokularında yapılan başka bir çalışmada histolojik olarak renal korteksde glomeruler ve tubuler değişikliklere neden olurken homojenatlarında yapılan çalışmalarda SOD ve katalaz düzeylerinde anlamlı artış olurken GSH-Px aktivitesi düşük olarak bulunmuştur.²⁷

Deneysel olarak CCl₄ verilen ratlarda yapılan kontrollü çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. SOD, katalaz, GST, GSH-Px düzeylerinin hepsinde kontrol grubuna göre anlamlı düşüş görülen çalışmalar da vardır.²⁸

CCl₄ 'ün böbrek dokusu üzerindeki etkileri histolojik olarak da gösterilmiştir. Renal korteks ve kortiko-meduller ara bölgede glomeruler ve tubuler dejenerasyon, intertitsiel mononükleer hücre infiltrasyonu, tubul çevresinde vasküler konjesyon, intertitsiel hemoraji gibi bulgular gözlemlenirken medullar bölgede etkilenim sınırlıdır.²⁹

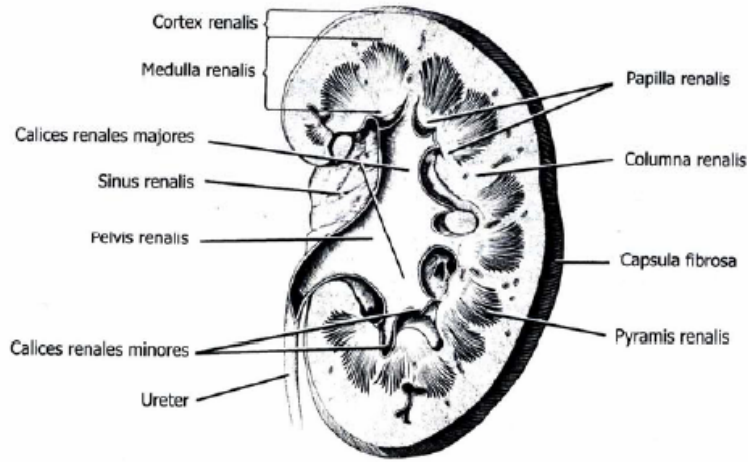
Deneyssel amaçlı kullanılan CCl₄'ün böbrek üzerindeki etkisi direkt olabildiği gibi dolaylı da olabilmektedir. CCl₄ 'ün karaciğerde yaptığı siroza bağlı sistemik hemodinamik değişiklikler böbreği de etkilemektedir. Böylece sirotik böbrek ve hepatorenal sendrom gibi böbrek patolojileri ve böbrek yetmezliği meydana gelmektedir.

Karbon tetraklorür'ün insanlarda çizdiği klinik tabloda karaciğer hasarının hiç olmaması veya çok az olması halinde bile akut böbrek yetmezliği en baskın klinik etkisini oluşturmaktadır. Böbrek yetmezliği, karbon tetraklorürün insanlarda yarattığı toksisite tablosunda en önemli ölüm nedenini oluşturmaktadır. Karbon tetraklorür'ün böbrek üzerindeki etkileri albuminüri, akut böbrek yetmezliği ve crush sendromudur.³⁰

2. 3. Böbrek Anatomisi, Histolojisi ve Fizyopatolojisi

Böbrekler vücudun homeostatik mekanizmalarında temel rol oynar. Başlıca görevleri arasında kanı filtre ederek metabolizmanın son ürünlerini idrar şeklinde dışarı atmak gelir. Hücre dışı sıvıdaki iyonların (sodyum potasyum, hidrojen, fosfat vb.) konsantrasyonlarını düzenler. Böbrekler retroperitenoal organlardır. Erkeklerde 150 gr, kadınlarda 135 gr ağırlığındadır. Böbrek, içinden sinirlerin, damarların, üreterlerin geçtiği karakteristik bir yapıya sahiptir.^{16,31}

Böbrekler arka abdominal bölgede yerleşmişlerdir ve üreter adı verilen bir tüp aracılığı ile idrarın depolandığı mesaneye bağlanırlar. Üreterin işlevi böbreklerde oluşan idrarın mesaneye drenajını sağlamaktır. Mesane ise düz kaslardan oluşan yapısı ile içindeki sıvıyı gerektiğinde kolaylıkla dışarı atar.³²

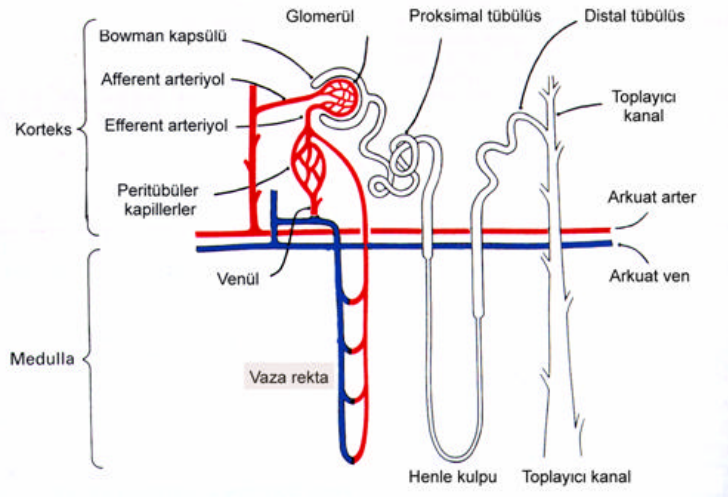


Şekil 1: Böbreğin Yapısı³³

Böbrek korteks ve medulladan oluşur. Meduller yapı tabanları korteksde yer alan uç kısımları papilla adını alan ve böbreğin kaliksleri içine uzanan koni şeklindeki oluşumları (piramitleri) oluşturur. Böbrek piramitlerinin sayısı 10 ile 15 arasında değişir. Her bir kaliks minöre 1-3 papilla açılır. Bir piramit ve onu kuşatan korteks parçasına birlikte bir böbrek lobu denir. Buna göre bir böbrekte piramit sayısı kadar böbrek lobu vardır. Her bir böbrek parankimi bağ dokusuyla birbirine bağlı nefronlardan oluşmuştur. Nefronlardan gelen idrar pelviste toplanarak üreteropelvik noktada üreter içine akar. Üreterler her bir böbrekte oluşan idrarı mesaneye taşıyıp orda depolanmasını sağlar.^{32,34}

2.3.1 Nefronlar

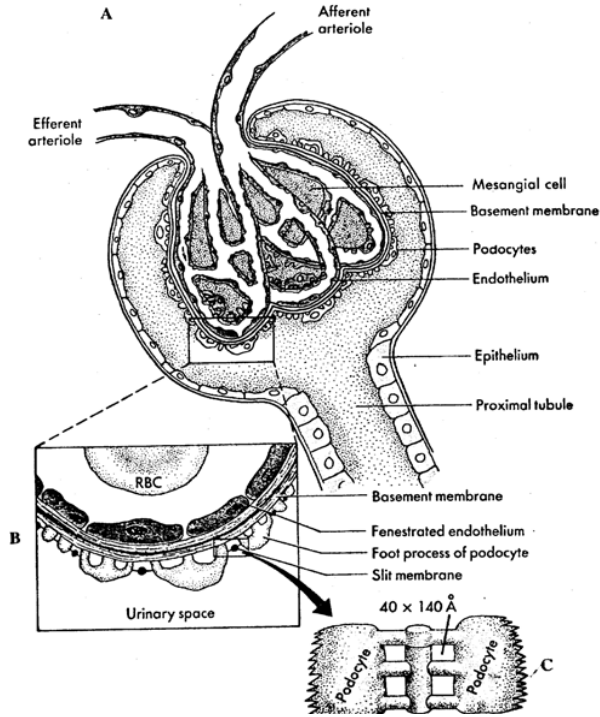
Böbreğin işlevsel ünitesini oluşturup her bir böbrek içinde yaklaşık 1 ile 4 milyon nefron bulunmaktadır. Her bir nefronda, glomerul (böbrek cisimciği de denen kapiller yumak), proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı kanal bulunur. Glomeruller özelleşmiş bir kılcal damar ağından oluşmuştur. Her böbrek cisimciğinin (Malpighi cisimciği, renal corpuscle) çapı yaklaşık 200 mikrondur ve kapiller bir yumak olan glomerülden (glomerulus) oluşmuştur.³¹



Şekil 2 . Nefron ve kan dolaşımının basitleştirilmiş şeması³⁴

Bu yumak Bowman kapsülü olarak adlandırılan iki tabakalı epitel bir kapsülle sarılmış durumdadır. Kapsülün iç tabakası (visseral tabaka) glomerulusun kapillerlerini örter (Şekil 3). Dış tabaka renal cisimciğin en dıştaki sınırını oluşturur ve Bowman kapsülünün parietal tabakası adını alır. Bowman kapsülü proksimal kıvrımlı tübülün başlangıcını oluşturur. Proksimal tübül nefronun metabolik olarak en aktif bölümü olup, önce henlenin aşağı inen ince kulpuna boşalır ve yukarı doğru uzanan ilk ince dal, sonra da yukarı doğru çıkan kalın ilmeği oluşturur. Yukarı doğru çıkan ince dalın hücreleri aşağı doğru inen kulptakilere çok benzer, ancak suya geçirgenlikleri ve aktif taşıma

yetenekleri açısından önemli farklılıkları vardır. Henle kulpunun ana görevi seruma kıyasla daha hipertonic ve konsantre idrar üretimini sağlamaktır. Distal tübül yukarı doğru çıkan henle kulbunu toplayıcı tübülle birleştirir. Sodyum, potasyum, klorür ve hidrojen iyon atılımı ve geri emiliminde görev alır.



Şekil 3: Glomerulün hücresel yapısı.³⁶

Henle'nin yukarı doğru çıkan kulpunun kendi nefronunun Bowman kapsülünün çok yakınından geçtiği yerde tübül hücreleri ve afferent arteriyol bölgesel özelleşme gösterir. Tübül makula densa'yı oluşturur, arteriyoler hücreler renin içeren granüllerle doludur. Bu bölge Juktaglomerular Aparat(JGA) olarak adlandırılır. JGA dolaşımdaki damar içi kan hacmini ve sodyum konsantrasyonunu düzenleyerek sistemik kan basıncının sürdürülmesinde önemli rol oynar.³¹

2.3.2.Böbreğin Histofizyolojisi

Böbrek; filtrasyon, aktif emilim, pasif emilim ve salgılama işlevlerini kapsayan karmaşık bir dizi işlem aracılığı ile iç ortamın kimyasal bileşimini düzenler. Filtrasyon işlemi, kan plazması ultrafiltratının olduğu glomerülde gerçekleşir. Nefronun tübül kısımları, özellikle de proksimal kıvrımlı kanallar bu filtrat içindeki vücut metabolizmasına yararlı olan maddeleri emer, bu şekilde iç ortamdaki homeostazın devamını sağlar. Tubüller, aynı zamanda idrarla atılan belli zararlı maddeleri, kandan tübül lümenine aktarır. Toplayıcı kanallar, belli koşullarda kan plazmasından daha hipertonic olan idrarın derişimine göre suya geçirgen hale geçer. Bu yolla organizma suyunu, intersellüler sıvısını ve osmotik dengesini kontrol eder.

İki böbrek dakikada 125 ml filtrat üretir; bu miktarın 124 ml'si emilir ve yalnız 1 ml'si idrar olarak kalikslere salınır. Her 24 saatte ortalama 1500 ml idrar oluşmaktadır.^{40,41}

Filtrasyon erişkin bir kişide her iki böbreğe gelen kan dakikada 1.2 ile 1.3 L'yi bulur. Bu durum vücutta dolaşan bütün kanın her 4-5 dakikada bir böbrekten geçmesi anlamını taşır. Glomerül filtratının kimyasal bileşimi kan plazmasına benzer ancak makromoleküller glomerül duvarını geçemediği için hemen hiç protein içermez. Glomerül filtratına geçebilen en büyük proteinin molekül ağırlığı 70.000 civarındadır ve filtratta az miktarda albumin görülür.^{40,41}

Proksimal Kıvrımlı Tubulus: Böbrek cisimciğinde oluşan glomerüler filtrat, absorpsiyon ve ekskresyonun başladığı yer olan proksimal kıvrımlı tubulusa geçer. Farklı maddelerin emildiği bölgeleri tam olarak ayırdetmek mümkündür. Proksimal kıvrımlı tubulus glukoz ve aminoasidlerin tümünü, suyun ve sodyum kloridin %85'ini emer. Glukoz, amino asidler ve sodyum, proksimal tübül hücrelerinin bazolateral

membranları üzerinde bulunan $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ etkinliğine bağılı olarak emilirler. Su ise ozmotik gradyanı izleyerek pasif olarak emilir.

Filtratta az miktarda bulunan proteinin emilimi pinositozla gerçekleştirilir. Proteinler lizozomlar tarafından sindirilir ve aminoasidler burada bulunan hücreler tarafından yeniden kullanılır.³⁷

Henle Kulpu: Henle kulpu su tutma işleminde rol oynar, böbreklerinde bu tür yapılar bulunan hayvanlar hipertonic idrar üretebilir ve vücut suyunu koruyabilirler.

Henle kulpunun inen ince kısmının suya geçirgen olmasına karşın çıkan bölümün tümü suya geçirgen değildir. Çıkan kalın kolda klor aktif olarak tübülde dışarı atılır, sodyum ise pasif olarak kloru izler. Bu şekilde idrarın konsantre hale gelmesi için gereken gradyan sağlanmış olur.³⁷

Distal Kıvrımlı Tubulus: Aldosteron konsantrasyonu yeterince yüksek olduğunda distal kıvrımlı tubulusda sodyumun emildiği, potasyum iyonlarının dışarı verildiği bir iyon değişim bölgesi bulunur. Burası vücuttaki total su ve tuzları kontrol eden düzeneğin bulunduğu bölgedir. Distal tübül aynı zamanda tübüldeki idrara hidrojen ve amonyum iyonlarını salar. Bu etkinlik kandaki asid-baz dengesinin korunmasında çok önemlidir.³⁷

Toplayıcı Kanallar: Toplayıcı kanalların epiteli arka hipofizden salgılanan antidiüretik hormona (ADH) duyarlıdır. Su alımı azaldığında, ADH salgılanır ve toplayıcı kanalların epiteli suya geçirgen hale geçer. Ortamda ADH bulunduğunda lümen membranındaki membran içi partiküller suyun emildiği kanalları oluşturacak biçimde çökme gösterebilir.^{34,40}

2. 3.3 Böbrek İşlevinin Değerlendirilmesi

Böbreğin 3 temel işlevi vardır:

- Metabolizma sırasında oluşan veya doğrudan vücuda alınan toksik maddelerin itrahi.
- Vücut sıvı dengesinin düzenlenmesi
- Hormonların üretimi

Böbreklerde akut veya kronik yetmezlik söz konusu olduğunda vücutta nitrojen metabolizmasının son ürünleri birikir ve non-protein nitrojenlerin düzeyi yükselir. Bu da kan üre-nitrojen (BUN) ve serum kreatinin düzeylerinde yükselmeye neden olur. Nitrojen ürünlerinin birikimi sonucu 'azotemi' gelişir. Bu durum ise böbreklerin metabolizma artıklarını atabilme yeteneklerini kaybettiği 'üremi' ile sonuçlanır. Böbrekler vücut sıvısının tonisite, hacim, asid-baz dengesi ve kimyasal bileşiminin düzenlenmesinden sorumludur. Hücredeki metabolik işlevlerin maksimum etkinlikte gerçekleşebilmesi için hücre içi sıvı bileşiminin dar bir aralıkta tutulması gereklidir. Intraselüler sıvı hücreyi çevreleyen ekstraselüler sıvının bileşiminden büyük oranda etkilenir.

Ekstraselüler sıvı içeriği ise, solunum sistemi ve böbrekler tarafından düzenlenir. Akciğerler, parsiyel basınçları ve asid-baz sisteminin solunumsal komponentini oluşturan kan gazlarının konsantrasyonlarını denetlerken, böbrekler uçucu olmayan maddelerin konsantrasyonlarını belirler. Bu yüzden organizmanın su dengesi, elektrolit konsantrasyonları ve asid -baz dengesi, böbrek işlevinin sağlıklı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini ve bu işlevdeki olası bozuklukları yansıtmak açısından önem taşır.⁴²

Böbrekler aynı zamanda 1,25-(OH)₂ kolekalsiferol (D3 vit.) oluşumu ve eritropoetin sentezi gibi endokrin fonksiyonlardan sorumludur.

Kalsiyum ve fosfor düzeylerindeki veya eritrosit kitlesindeki anormallikler böbreklerle ilgili bozuklukları yansıtır. Bir maddenin klirensi GFH'na paralel ise filtrasyondaki bir azalmaya bağlı olarak bu maddenin serum konsantrasyonunun artması beklenir. Normal koşullarda üretim hızının göreceli olarak sabit olduğu varsayılırsa söz konusu maddenin dolaşımdaki miktarının saptanması GFH'nı belirlemede yararlı olabilir. Bu nedenle, böbrek yetmezliği durumlarında kan kreatinin ve üre düzeyi ölçümlerine sıkça başvurulur.^{42,43}

Üre protein metabolizmasının başlıca son ürünüdür ve vücuttan atılan nitrojenin yaklaşık % 80'ini oluşturur. Böbreklerde filtrasyonun yanısıra geri emilime de uğraması ve üretiminin dışarıdan alınan miktar, katabolizma ve gastrointestinal sistemden protein kaybı gibi nedenlere bağlı olarak değişebilmesi nedeniyle üre klirensi böbrek fonksiyonunu değerlendirmede güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmez. Üre'nin metabolizmasında ve böbreklerdeki tutulumunda oluşabilecek değişiklikler kan üre azotu konsantrasyonunun (BUN) her zaman için renal parankimal fonksiyonla uyumlu olmaması sonucunu doğurur. Ayrıca, kan üre düzeyi prerenal (aşırı üretim, azalmış böbrek kan akımı), renal (parankimal böbrek hasarı) veya postrenal (genitoüriner sistem obstrüksiyonu) nedenlere bağlı olarak değişebilir. Dolaşımdaki üre düzeylerinin aşırı üretime bağlı olarak yükseldiği durumlarda BUN 40 mg/dl' yi nadiren geçer. Bunun üzerindeki BUN düzeyleri ise renal hasar, idrar yollarında tıkanıklık veya böbrek kan akımında azalma gibi nedenleri düşündürür.⁴²

2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

2.4.1.Oksidatif Stres

Oksijene gereksinimi olan tüm canlı sistemlerde oksidatif stres doğal olarak oluşmaktadır. Bu stresi ortadan kaldırmaya yönelik antioksidan savunma sistemleri de oluşmaktadır. Bu iki oluşum arasında bir denge vardır ve bu durum “Oksidatif Denge” olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden etkilenmemektedir. Oksidatif stresin dolayısıyla serbest radikallerin oluşum hızında artma veya antioksidan sistemin bu oluşumu ortadan kaldırma hızında düşme olduğunda denge bozularak oksidatif hasar meydana gelmektedir.^{44,45,46,47}

Oksidatif stres insandaki birçok patolojik durumun meydana gelmesinde, ilerlemesinde ve komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli yere sahiptir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar çoğunlukla oksijenin indirgenmesiyle oluşan serbest radikallerin organizmadaki biyolojik ve kimyasal özelliklerine aittir. Oksijen, serbest radikallerin ana kaynaklarından birisi olup genel görüş, serbest radikallerin oksidan özelliğinin yapısındaki oksijenden kaynaklandığı yönündedir.⁴⁸

Gerçekte oksijen radikallerinin üretimi normal biyolojik fonksiyonların ayrılmaz bir parçasıdır.⁴⁹ Serbest radikaller her zaman oksidan aktivite göstermez ve sadece oksidatif stresten sorumlu değildirler. Serbest radikaller ve oksidasyon organizmada birçok biyokimyasal reaksiyon ve hücre iletim sisteminde rol almaktadırlar.⁵⁰ Bazal koşullarda tüm aerobik hücrelerde solunum, fagositoz, araşidonik asit metabolizması gibi reaksiyonlarda bir miktar serbest oksijen radikali oluşur ve bunlar sağlıklı bir organizmada antioksidan savunma mekanizmalar tarafından hızla ortadan kaldırılır.⁴⁹ Serbest radikaller üretim hızlarına, aktivitelerine ve savunma sistemine bağlı olarak oksidatif

stres oluştururlar. Serbest radikallerin fazla üretilmesi birtakım enzimlerin (oksidazlar, hem içeren proteinazlar, metaloproteinazlar) hücre dışına çıkması, demir, bakır gibi bazı maddelerin serbest radikallerle kompleks yapması ve savunma sistemindeki bozukluklar oksidatif stresin artmasına neden olurlar.⁵⁰ Günümüzde oksidatif stres ile birçok önemli hastalığın patogenezi açıklanmaya çalışılmaktadır. Oksidatif stres kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve yaşlanmayla birlikte olan dejeneratif hastalıkların patogenezinde etkilidir.

Oksidatif stres, tüm hücrelerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler oluşturarak hasara neden olabilir. Oksidatif stresin hücredeki başlıca bilinen hedefleri çoklu doymamış yağlar, şekerler, proteinler ve nükleik asittir. Oksidatif stres, iyon dengesi hücre redoks sistemini, hücre içi haberleşmeyi ve gen transkripsiyonunu etkiler, sonuç olarak, hücre döngüsünü etkileyerek hücrenin ölümüne neden olur.⁵¹

2.4.2. Serbest Radikaller

Serbest radikal, orbitalinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya atom gruplarıdır.^{52,53} Bu eşleşmemiş elektron, serbest radikali karasız bir konuma getirir. Serbest radikalin kararlı, stabil bir yapıyı tekrar kazanabilmesi için elektronunu bir başka elektronla eşleştirmesi gerektiğinden bu durum serbest radikale kimyasal olarak büyük bir aktivite kazandırır.^{54,55}

İnsanlar aerobik metabolizmaya sahip oldukları için hayatları boyunca serbest radikal üreticisi konumundadırlar. Birçok sistem ve metabolizma üzerine etkili olan serbest radikaller, normal metabolik olaylar sırasında ortaya çıkabildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler.^{13,56,57}

Serbest radikallerin oluşumunda üç temel mekanizma rol oynar:⁵⁸

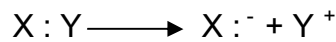
1) Kovalent bağların homolitik kırılması:

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık, kimyasal bağların kırılmasına neden olarak kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ve her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron kalır böylece iki adet serbest radikal oluşur.



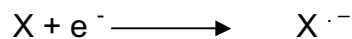
2) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi:

Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken kendilerinin radikal formları oluşur. Bu tipteki bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır ve serbest radikal değil iyonlar meydana gelir.



3) Normal bir moleküle elektron transferi:

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi radikal formu olan superoksidin oluşumuna neden olur.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller daha çok elektron transferi sonucu özellikle de oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mo^{+3} gibi bazı geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.⁵⁹

2.4.2.1 Serbest Radikal Kaynakları

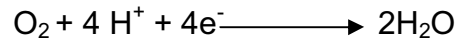
Serbest radikallerin kaynakları ile ilgili olarak eksojen ve endojen kaynaklar olmak üzere iki kaynak öne sürülmektedir.

Ekzojen kaynaklar: Hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüslerdir.⁶⁰

Endojen kaynaklar ise, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelyal hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamin oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır¹² (Şekil 4).

Organizmanın yapısında bulunan proteinler, serbest amino asitler, DNA, lipidler ve nükleik asitler gibi makro moleküller bu sistemler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin etkilerine maruz kaldıklarında hasara uğramaktadırlar.⁶¹ Oksidatif hasar oluşturan türler (reaktif oksijen türleri, nitrojen ve klorin türleri) metabolizma ürünleri, fizyolojik mediyatörler ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkabilirler. Serbest radikaller kalsiyum metabolizmasına etki ederek hücre içi kalsiyumun kontrolsüz yükselmesine, dolayısıyla hücrenin zarar görmesine ya da

ölmesine neden olmaktadır.⁶² Aerobik organizmalarda O₂ esansiyel bir molekül ve aynı zamanda oksidan bir ajandır. Normal koşullar altında moleküler oksijenin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğramaktadır. Fizyolojik koşullarda O₂'nin %98'i mitokondride bulunan sitokrom oksidaz tarafından indirgenmekte ve 4 elektron alarak suya dönüşmektedir.



Bununla birlikte %1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılan bir çok reaktif ürün ortaya çıkar. Aerobik organizmalarda radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde bulunmaktadır.⁶³

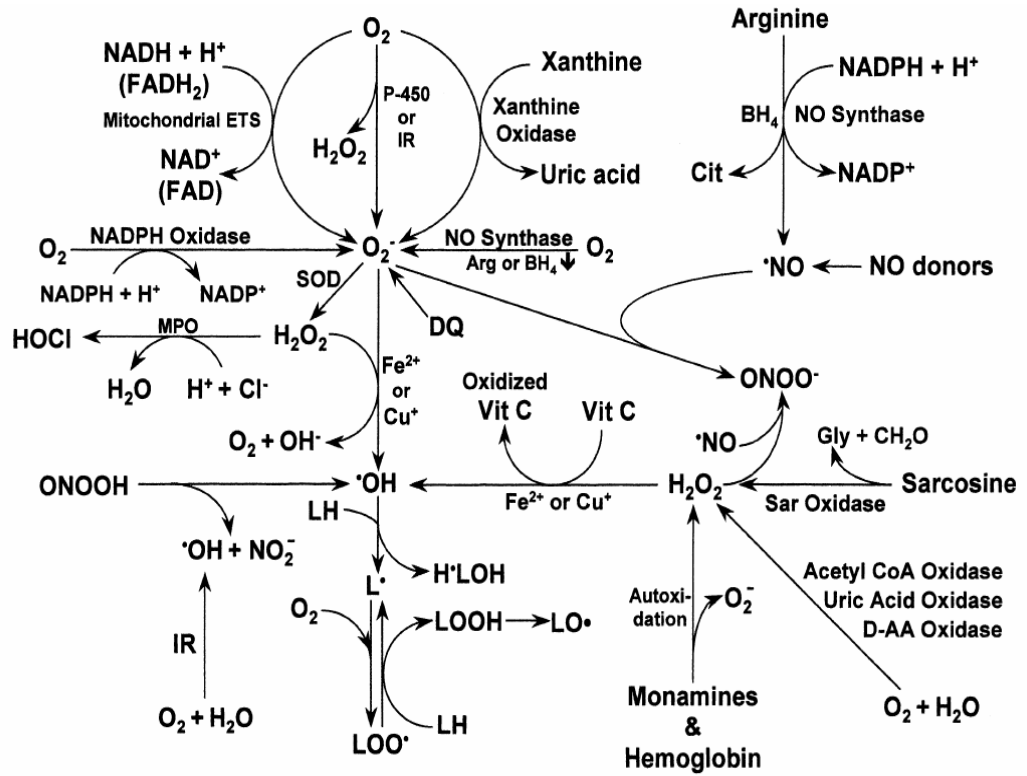
Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidir. Zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli bir çok fonksiyonun gerçekleştirilmesinde önemli rol oynarlar.⁶⁴ Steroid yapıdaki çok sayıda bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur.⁶⁵ Serbest radikallerin en iyi bilinen zararlı etkileri hücre membranı, yağ asitleri ve lipoproteinlere saldırarak lipid peroksidasyonu olarak bilinen bir zincir reaksiyonunu başlatmalarıdır. Lipid peroksidasyonunun ürünleri ileri aşamalarda membran proteinlerinde de hasara yol açarak yapısal ve fonksiyonel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olurlar.⁵⁸

2.4.2.2. Serbest Radikal Türevleri

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) oluşumu için oksijen gereklidir. Serbest oksijen radikallerine

süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) ve hidroperoksil radikali ($OOH^{\cdot}$) örnek verilebilir.

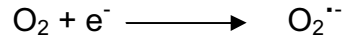
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot}$) radikalleri de RNT'yi oluşturur. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), hipokloroz asit ($HOCl$), hipobromöz asit ($HOBr$) gibi diğer reaktiflere de dönüşebilirler.



Şekil 4: Memeli hücrelerinde reaktif (oksijen ve nitrojen) türlerin meydana geliş yolları.¹³ (IR:İyonize radyasyon, Sit:Sitrülin, D-AA:D-Amino asit, BH₄:Tetrahydrobiopterin, Gly:Glisin, L⁻:Lipit radikali, SOD:Süperoksit dismutaz, MPO: Myeloperoksidaz)

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

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan süperoksit radikal anyonu meydana gelir. Kendisi direk olarak nükleofilik atak yapması yanı sıra hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olarak davranış sergilemesi önemli reaksiyonlarındandır.



Mitokondriyal elektron transport zinciri sırasında O_2 'nin otooksidasyonu sonucu oluşur. Süperoksit radikali O_2 varlığında ksantin oksidaz'ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH'nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondriyal elektron transport sistemi ile $NADH_2$ ve $FADH_2$ 'nin NAD ve FAD'ye dönüşümü sırasında, O_2 'nin iyonize radyasyonla, sit P_{450} ile ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur.^{58,59} Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz sırasında O_2 tüketimi artar ve bu durumda plazma membranında bulunan NADPH oksidaz tarafından $O_2^{\cdot-}$ oluşumu tetiklenir.



$O_2^{\cdot-}$ in kimyasal davranışı hangi ortamda çözüldüğüne göre değişmektedir. Suda çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak, okside edici ajan olarak davranabilir. Örneğin askorbik asidi okside etmektedir.⁶⁰

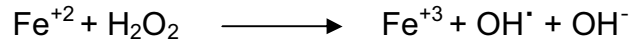
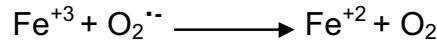


Organik çözücülerde daha reaktif ve tehlikelidir. Biyolojik membranlarda oluştuğunda oldukça fazla hasar meydana getirmektedir.

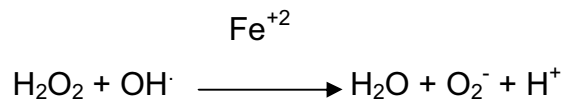
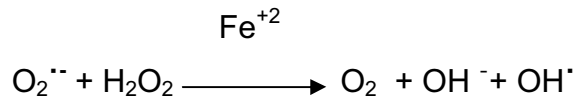
$O_2^{\bullet-}$ çeşitli organik ya da inorganik bileşiklerle de reaksiyona girebilir. Nitrik oksit ile reaksiyona girebilir. Nitrik asit ile reaksiyona girip peroksinitriti oluşturması önemlidir.⁶⁶

2.4.2.2.2. Hidroksil Radikali ($OH^\bullet$)

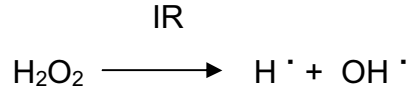
Yarılma ömrü kısa ve güçlü bir serbest radikal olan hidroksil radikali tüm biyolojik substratlarla reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir. Toksik $OH^\bullet$ oluşumunda demir, bakır gibi bazı metal iyonları da rol oynar. Asıl olarak Fe^{+2} molekülünün de katıldığı Fenton reaksiyonu ile oluşur.⁶⁷ Fe^{+3} 'ün $O_2^{\bullet-}$ ile indirgenmesi sonucu oluşan Fe^{+2} , H_2O_2 ile reaksiyona girerek $OH^\bullet$ radikalini meydana getirir. Bu reaksiyon 'Fenton Reaksiyonu' olarak adlandırılır.



Ayrıca demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla da $OH^\bullet$ oluşmaktadır.¹⁵



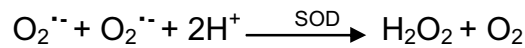
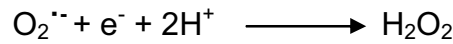
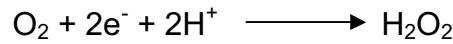
İyonize radyasyon etkisi ile de $OH^\bullet$ oluşur.¹³



Açığa çıkan hidroksil radikali protein ve lipidler arası çapraz bağlar oluşturarak, proton çıkararak ve elektron transferi yaparak canlı sistemlerde önemli hasar oluşturabilmektedir.

2.4.2.2.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin iki elektron alarak indirgenmesi veya Süperoksit radikalinin yapısına bir elektron katılmasıyla peroksit molekülü oluşup bu da 2 hidrojen atomuyla birleşerek Hidrojen Peroksit molekülünü meydana getirmektedir. Biyolojik sistemlerde daha sık olarak iki süperoksit molekülü, iki protonla birleşerek hidrojen peroksit ve oksijen oluşturur.⁵²



H₂O₂ bir serbest radikal olmamasına karşın yüksüz bir molekül olduğundan membranlardan hücre içerisine kolaylıkla girebilen uzun ömürlü bir moleküldür. O₂'den iki elektronun (sit p450, yağ-açıl KoA oksidaz, asetil KoA oksidaz, ürik asit oksidaz, α-hidroksiasit oksidaz veya D-amino asit oksidaz ile) redüksiyonu ile H₂O₂ oluşabilir. Ayrıca monoaminler (dopamin, epinefrin, norepinefrin), hemoglobinin otooksidasyonu ve glisin sentezinde de H₂O₂ oluşur.⁶⁸ Peroksizomlar fazla miktarda oksidaz içerdiklerinden hücresel H₂O₂ için potansiyel kaynaktır. H₂O₂ özellikle Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla yıkılarak ve Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan OH[•] oluşur.¹³

2.4.2.2.4. Hipokloröz Asit (HOCl)

Nötrofiller, sitoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluştururlar.⁶⁹



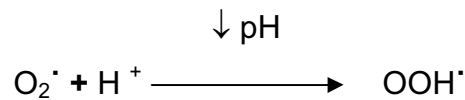
2.4.2.2.5. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmaması sebebiyle serbest oksijen radikali olmayıp reaktif oksijen türleri grubunda yer alan bir moleküldür. Singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. DNA, proteinler ve lipidlerle reaksiyona girebilir.^{70,71}

Moleküler oksijen elektronlarının dışardan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün ters yönündeki farklı bir yörüngeye geçmesi ile oluşabileceği gibi, $\text{O}_2^{\cdot -}$ radikalinin dismutasyonu ve MPO'nun katalizlediği H_2O_2 'nin HOCl ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir.⁷²

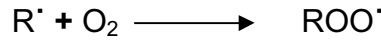
2.4.2.2.6. Perhidroksil radikali ($\text{OOH}^{\cdot}$)

$\text{O}_2^{\cdot -}$ radikali asidik ortamda daha reaktif olup protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan $\text{OOH}^{\cdot}$ radikalini oluşturur.⁵²



2.4.2.2.7. Peroksil radikali (ROO[•])

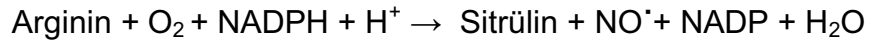
R[•]radikalleri hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek ROO[•]’yi oluştururlar.⁵² ROO[•], lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür.



2.4.2.2.8. Nitrik Oksit

Memeli hücrelerinde NO başlıca Nitrik Oksit Sentaz (NOS)’ın aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden sitrülün ve NO’yu oluşturur. Bu olay, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (BH₄) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar.⁷²

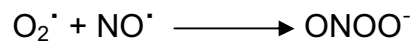
NOS

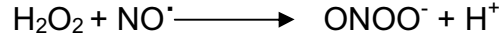


Eşleşmemiş elektronu nedeniyle bir serbest radikal türü olarak bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO[•] damar tonusunun kontrolünde, platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün sitotoksitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşır.¹⁴

2.4.2.2.9. Peroksinitrit (ONOO⁻)

Süperoksit radikali veya hidrojen peroksitin NO[•] ile reaksiyona girmesi ile oluşur.⁷³



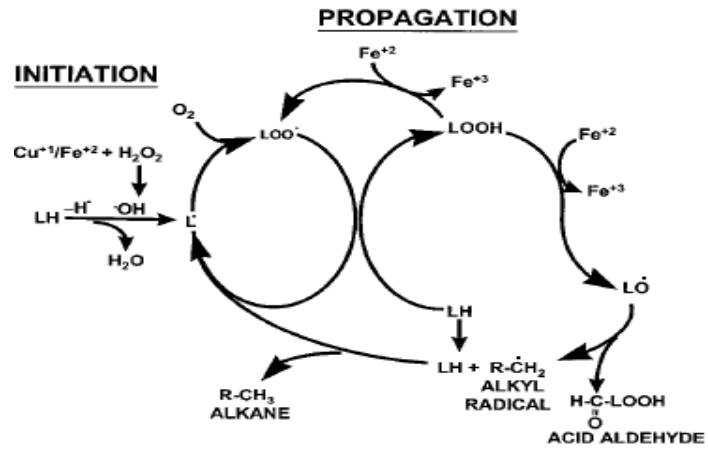


Oluşan peroksinitrit radikalinin oksidatif potansiyeli $\text{O}_2^\bullet$ ve H_2O_2 'ye göre daha yüksektir.¹³

NO 'dan türeyen reaktif nitrojen türlerinin (RNT) artan miktarları organizmada nitrozatif stresi meydana getirir.^{6,74} Nitrozatif stres ile iskemi, inflamasyon olayları ve nörotoksisite gibi patolojik olaylarla bağlantılı bulunmuştur.⁶ Her iki stresi ortaya çıkaran reaktif türler birbirleriyle etkileşim halindedir.^{6,75}

2.3.5. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

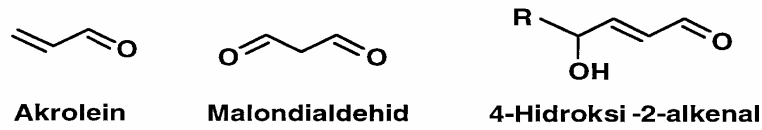
Lipidler reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan biyolojik moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur (Şekil 5). Kendi kendini devam ettiren bu zincir reaksiyonu sayesinde ilerleyen lipid peroksidasyonu ile geri dönüşümsüz, membran hasarı meydana gelir.^{63,76}



Şekil 5. Metallerin katalizlediği lipid peroksidasyonu⁷⁷

Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metod MDA ölçümüdür.

Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehydler; serbest radikallere göre daha stabildirler (şekil 6). Hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkarak daha uzak bölgelerdeki proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipidler ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilirler. Bunun sonucunda molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri kurabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilirler. Üç karbonlu bir ketoaldehit olan MDA, normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO₂'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir.⁷⁸



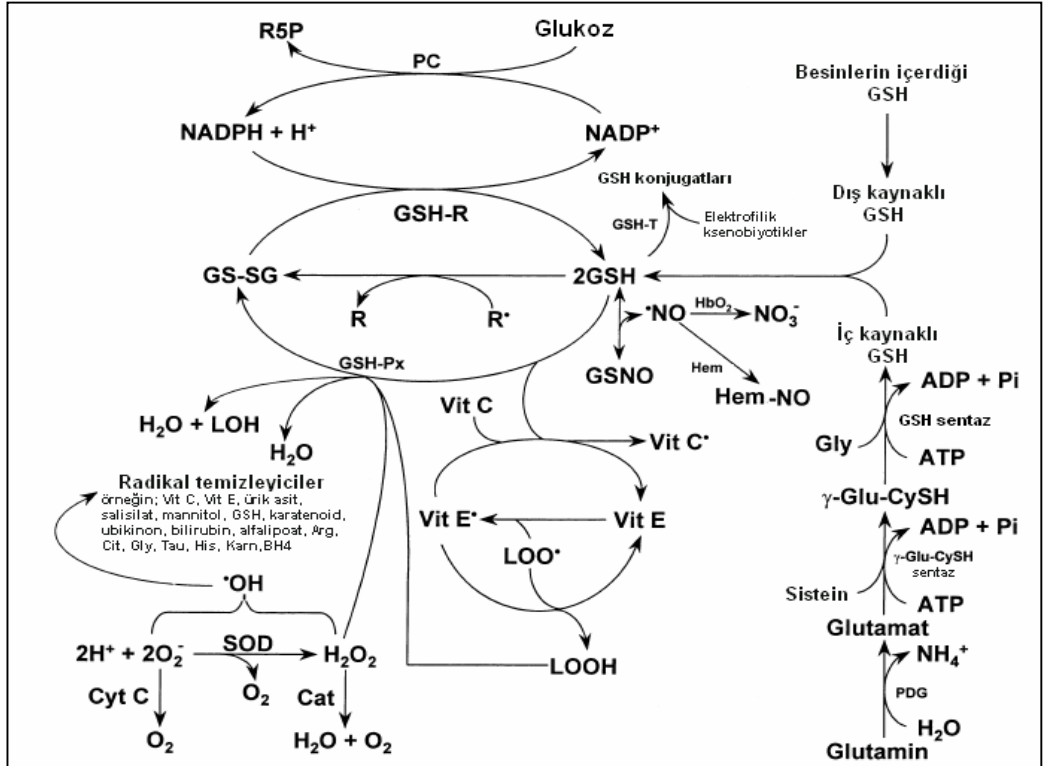
Şekil 6. Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehydler.⁷⁹

2.5. Antioksidan Sistem

Antioksidan moleküller oksidan moleküllerin hücreye hasar vermesini engellemektedirler. Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi, serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de sınıflandırılırlar.⁸⁰ Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol oynayan antioksidanlar enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler.⁶

Antioksidanlar genel olarak aşağıdaki prensipler doğrultusunda koruma sağlarlar.⁸¹

- Oksijenden türeyen moleküllerin oluşumunu en az düzeye indirerek,
- Radikallerle doğrudan kimyasal yolla temasa geçerek,
- Enzim aktivitesi üzerinden veya doğrudan kimyasal reaksiyonlar yoluyla,
- Reaktif metabolitlerin temizlenmesini veya bu radikallerin daha az aktif ve toksik olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak,
- Zayıf reaktif türlerin daha zararlı türlere dönüşümü için gereksinim duyulan metal iyonlarını bağlayarak,
- Hedef molekülde oluşan hasarı onarma yoluyla,
- Hasarın çok büyük olduğunda, hasara uğramış molekülü uzaklaştırarak.



Şekil 7. Memeli Hücrelerinde Antioksidan Savunma Sistemleri ¹³

Antioksidan maddeler oksidan moleküllere karşı etkilerini birkaç yolla gösterebilirler⁸²:

1) Süpürücü etki gösterenler: Yeni radikal oluşumunu engelleyerek, meydana gelen radikalleri daha az zararlı hale getirirler. SOD, GSH-Px, ferritin, serüloplazmin ve metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinler bu tür etkiye örnektir.

2) Giderici etki gösterenler: Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir. β -karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3) Zincir kırıcı etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak, bazı vitaminler, mineraller, hemoglobin, ürik asit, bilirubin ve albümin verilebilir.

4) Onarıcı etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz örnek gösterilmektedir.

2.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, kaynaklarına göre ekzojen ve endojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Ekzojen kaynaklı olanlar: Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, folik asit vb.) NADPH Oksidaz inhibitörleri (kalsiyum kanal blokerleri, antienflamatuvar ilaçlar vb.), deferroksamin, seruloplazmin, mannitol, albumin, barbitüratlar gibi ilaçlar ile vitamin A, vitamin C, vitamin E'den oluşur.

Endojen kaynaklı olanlar enzimatik ve enzim olmayanlar olarak ikiye ayrılır. Enzimatik olmayan antioksidanlar: Hemoglobin, ferritin,

miyogloblin, ürik asit, bilirubin, laktoferrin, transferrin, melatonin, askorbik asit, albümin ve glutatyondan oluşur.

Enzim yapısında olanlar: Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutatyon-s-Transferaz, Glutatyon Peroksidaz, Sitokrom Oksidaz gibi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır.^{83,84,13}

Enzim olan endojen antioksidanlar

- Süperoksit dismutaz (SOD).
- Glutatyon peroksidaz (GSH-Px).
- Glutatyon S-Transferazlar (GST).
- Katalaz (CAT).
- Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi.
- Hidroperoksidaz.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar

- Melatonin.
- Seruloplazmin.
- Transferrin.
- Miyoglobin.
- Hemoglobin.
- Ferritin.
- Bilirubin.
- Glutatyon.
- Sistein.
- Metiyonin.
- Ürat.
- Laktoferrin.
- Albümin.

Vitamin yapısında eksojen antioksidanlar

- α -tokoferol (vitamin E)
- β -karoten
- Askorbik asit (C vitamini)
- Folik asit (folat)
- Gıdalardaki eksojen antioksidanlar
- Butylated hydroxytoluene (BHT)
- Butylated hydroxyanisole (BHA)
- Sodium benzoate.
- Ethoxyquin.
- Propylgalate
- Fe-superoxyde dismutase.

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar

- Ksantin oksidaz inhibitörleri
- NADPH oksidaz inhibitörleri
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox-C
- GSH-Px aktivitesini artıran maddeler ve asetilsistein
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri
- Nötrofil adezyon inhibitörleri.
- Sitokinler
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri.

2.5.1.1. Glutasyon (GSH)

GSH vücudun birçok hücresinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir.⁸⁵ Glutasyon (γ -glutamilsisteinilglisin), organizmada tiyol grubu içerir ve düşük molekül ağırlıklıdır. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonlar dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır.⁸⁶ GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubunun kazandırdığı düşünülmektedir.

Glutasyon disülfid (Okside glutasyon GSSG), GSH'daki sisteinin tiol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. Hücrede bulunan GSH'ın üçte bire yakın miktarı disülfid şeklinde ve tiol grubu içeren sistein, koenzim-A gibi bileşikler ile beraber bulunur.⁸⁷ GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde (detoksifikasyon) ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır.⁸⁸ GSH' daki en aktif grup tiol grubu olup, oksitlenmesi ile oluşan GSSG antioksidan özelliğini kaybeder. Tiyol grubunun asitliği GSH'ın kendi anyonu (RS^-) ile sulu çözeltilerde kuvvetli reaksiyon vermesine neden olur. Reaksiyonun oluşma sıklığı ortam pH'ının artışı ile doğru orantılıdır.⁸⁷

GSH birçok enzimin kofaktörüdür (örneğin HMG CoA redüktaz). Tiroid hormon sentezinde rol oynar. Bunun dışında proteinlerdeki $-SH$ gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Demirin +2 halde tutulmasını sağlar. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini engeller. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller hatta rejenere olmalarını sağlar. Karaciğer vücut GSH içeriğinin en önemli kaynağını

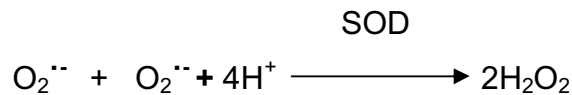
oluşturmaktadır. Ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur.

GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutatyonu oluşturur. GSH negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nin hidrolizi gerekir.⁸⁹

2.5.2. Enzimatik Yapıda Olan Antioksidanlar

2.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

SOD süperoksit anyonunu hidrojen peroksite çeviren bir metalloenzimdir.



Bu reaksiyon, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olduğundan oksidatif strese karşı en etkin savunma olarak değerlendirilir.

SOD, gerçekte detoksifiye edici bir enzim değildir. Çünkü ürünü olan H_2O_2 toksik bir ajandır. Ancak bu reaksiyon reaktif oksijen radikallerinin detoksifikasyonuna giden yolun ilk basamağıdır. İkinci basamak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından H_2O_2 'in suya ve moleküler oksijene dönüşmesini katalizler.⁹⁰

Memelilerde üç çeşit SOD enzimi bulunmaktadır.¹⁰:

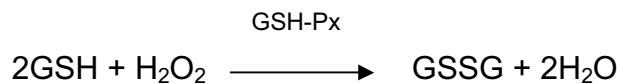
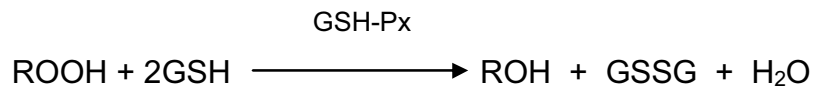
1) Sitozolik SOD (Cu-ZnSOD, SOD1): Genellikle sitozolde ve lizozomal fraksiyonlarda yer alır, fakat mitokondriyal boşlukta da bulunmaktadır. İki alt birimden oluşmaktadır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden çinko sorumludur.

2) Mitokondrial SOD (Mn-SOD, SOD2): Mitokondride bulunup, tetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır, pH 7'nin üzerine çıktığında aktivitesini kaybeder.⁹⁰

3) Ekstrasellüler SOD (EC-SOD, SOD3): Tetramerik yapıdadır ve ekstrasellüler bölümlere salgılanır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır, bazı bakterilerde Fe-SOD da saptanmıştır.⁹²

2.5.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx; EC.1.11.1.9) ve Glutasyon Redüktaz (GR; EC.1.6.4.2)

GSH-Px lipit peroksitlerini daha az toksik yağ asitlerine indirgerken substrat olarak indirgenmiş glutasyonu (GSH) kullanmaktadır. Ayrıca eritrositlerden H₂O₂'nin temizlenmesinde de yine substrat olarak GSH'ı kullanarak GSSG ve su oluşumunu katalizlemektedir.



GSH-Px, hücrede H₂O₂'nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden biri olup diğer enzim ise katalazdır. Glutasyon-GSH-Px sistemi

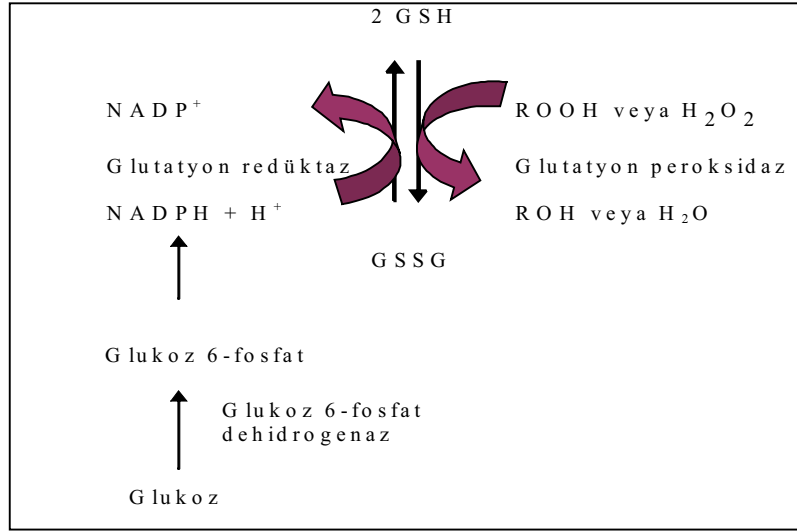
H₂O₂'nin H₂O'ya indirgenmesini katalizlerken organik hidroperoksitleri de parçalamaktadır.⁶³

GSH-Px, bir çift H₂O₂ molekülüne etki eden katalazdan farklı olarak, tek molekül H₂O₂'nin ortadan kaldırılmasını sağlar.^{12,94}

Genel olarak GSH-Px'ın H₂O₂'e karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir. Tetramerik yapıda olan enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivitede bulunur. %60-75'i stoplazmada, %25-40'ı mitokondride yer alır.

Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px (Se-GSH-Px) sitozol ve mitokondride bulunmaktadır ve hem H₂O₂ hem de lipit hidroperoksitleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GSH-Px (non-Se GPx) ise sadece lipit hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipit peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir.⁹³

Glutasyon Redüktaz (GR) hücrel GSH redox siklusundan sorumlu olup endojen peroksitlerin detoksifikasyonu için önemlidir.⁸¹ GSH-Px peroksitleri temizlemek için hidrojen donörü olarak GSH'a ihtiyaç duymaktadır. Okside formu olan GSSG, GR ile yeniden redükte glutatyona (GSH) dönüşmektedir. Gerekli olan NADPH, pentoz fosfat yolundan sağlanmaktadır.⁶⁰



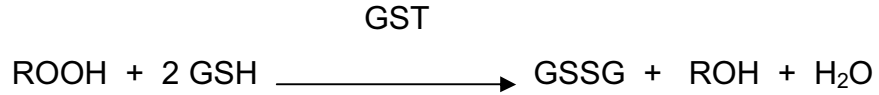
Şekil 8. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon

2.5.2.3. Glutasyon-S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.8)

Glutasyon-S-transferazlar (GSTs), hücresel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesidir. Genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir.⁹⁵

Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak yabancı maddeleri glutatyondaki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler. Ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir. GSH'dan glutamat ve glisin koparılmasından sonra sisteinin serbest amino grubu asetillenerek merkaptürik asitlere dönüştürülür. Ksenobiyotiklerin klasik atılım ürünleri olan merkaptürik asitler (N-asetil sisteinin S-alkile olmuş türevleri) daha sonra safra ile atılırlar.^{96,97,98,79}

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler.



GST'ler, glutatyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır.

99

Antioksidan aktivitelerine ilaveten çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup hem, bilirubin ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddeleri reversibl olarak bağlayarak bunların hücre içinde transportunda görev alırlar. Bazı güçlü alkilleyici ajanlara doğrudan kovalent bağlanarak, hücresel proteinler ve makromolekülleri bu ajanların etkisinden korurlar. GST'ler LTB4 ve prostaglandin sentezinde de rol oynarlar.

2.5.2.4. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6)

Peoksizomlarda lokalize, dört tane hem grubu bulunan hemoproteindir. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir. H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalar. ¹⁰⁰



Aynı zamanda fenol ve alkollerin de detoksifikasyonunu sağlayan katalaz; hidrojen peroksitin fenton reaksiyonları ile demir ve bakır iyonları tarafından reaktif hidroksil radikaline dönüşümünü engeller. ¹⁰¹

2.5.2.5. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH, EC 1.1.1.49)

Pentoz fosfat (heksoz monofosfat) yolunun oksidatif faz hız kısıtlayıcı enzimidir. ATP üretilmeyen bu yolun; indirgeyici reaksiyonlar (yağ asiti ve steroid biyosentezi gibi) için NADPH üretmek ve nükleik asit biyosentezi için 5 karbonlu üniteleri sağlamak gibi iki önemli işlevi vardır. Bu işlevlerinden dolayı hücresel metabolizma ve oksidatif stres arasında anahtar bir role sahiptir. Glukoz tüketimindeki ana yollar glikoliz ve pentoz fosfat yoludur. Pentoz fosfat yolu karaciğer, böbrek, eritrosit, adrenal korteks, yağ dokusu ve laktasyondaki meme bezinde aktiftir. Eritrositlerdeki pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH okside olmuş glutatyonun FAD içeren flavoprotein enzimi olan glutatyon redüktaz ile indirgenmiş glutatyona çevrilmesini sağlar. Daha sonra indirgenmiş glutatyon glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen bir tepkimeyle H_2O_2 'i eritrositlerden uzaklaştırır. NADPH thioeredoksin redüktaz reaksiyonundaki indirgeyici ekivalanları sağlamakla birlikte katalaz aktivitesi için de gereklidir. G6PDH eksikliği oksidan ajanların detoksifiye edilememesi sonucu oluşan hemolitik anemi ile karakterize X'e bağlı ressesif bir hastalıktır. İnsanlarda hastalığa neden olan en sık görülen enzim anomalisidir. ¹⁰²

2.6. Böbrek ve Antioksidan Enzimler

Son yıllarda yapılan hayvan çalışmaları ROT ların ister akut ister kronik ve ister immün, ister non-immün olsun, böbrek hastalıklarında patofizyolojik öneme sahip olduklarını göstermiştir.¹⁰³ Böbrek dokusu veya idrarda oksidan hasar ürünlerinin saptanması yanında ROT inhibitörleriyle koruyucu etkinin gösterilmesi bu ilişkiyi kanıtlamıştır.

Normal koşullarda böbreklerde oluşan ve doku hasarına yol açan oksidan radikaller, antioksidan savunma sistemleriyle temizlenirler. Böbrek hücreleri, nötrofilleri veya dolaşımdaki diğer hücreler başlıca ROT kaynakları olabilir.^{104,105}

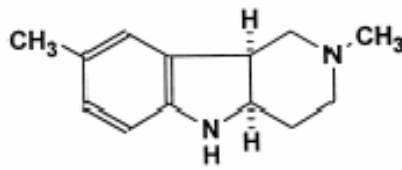
Endojen antioksidan enzimler, böbreklerin oksidan hasarına karşı gelişen en önemli savunma sistemidir. E vitamini ve selenyumdan fakir diyetin antioksidan aktivitede düşüşe neden olarak yoğun proteinüri ve GF hızında da azalma yaptığı gösterilmiştir.¹⁰⁶ Rabdomiyolize bağlı gelişen akut böbrek yetmezliği oksidan stresin rol aldığı önemli bir tablodur. Dimetiltioüre veya deferroksamin ile antioksidan savunma güçlendirilerek GFH üzerine olumlu etki sağlanır.^{106, 107} Böylece oksidatif böbrek hasarında endojen antioksidan enzimlerin belirgin koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Minimal lezyon hasarlarında tedavide kullanılan glikokortikoidlerde glomerüler akıntı kaybını ve glomerüler lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu azaltıp, antioksidan enzimleri artırarak etkili olduğu belirtilmektedir.¹⁰⁸

Renal antioksidan enzimlerin postnatal gelişim gösterdiği, SOD ve CAT enzimlerinin jukstamedüller bölge ve kortikal nefronlarda olduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir.¹⁰⁹ Antioksidan enzimlerin aktivitesi biyolojik uyarıyla böbrek hücreleri ve diğer birçok hücrede artış göstermektedir.¹⁰⁶

Böbrekler oksidatif hasara uğradıktan sonra ortamdaki antioksidan enzimler lokal antioksidan savunma genlerinin aktivasyonu ile regüle edilirler.^{106,107} Sonuç olarak böbrekler, oksidatif stres karşısında antioksidan savunma mekanizmasını kullanır ve bu savunma doğal veya farmakolojik ajanlarla güçlendirilebilir. Bu ve buna benzer etken maddeler aracılığı ile birçok hasara karşı yeni tedavi yaklaşımlarının araştırılması gerekir.

2.7.Stobadine (STB)

Oksidan moleküllerin hücreye hasar vermesini engellemek amacıyla geliştirilen antioksidanlar arasında Stobadin de bulunmaktadır. Heterosiklik indol türevlerinden bir pridindol olan Stobadin ile ilgili olarak halen günümüzde devam etmekte olan birçok çalışma yapılmaktadır. Stobadin, (-) cis 2,8 dimetil 2,3,4,4a,5,9b heksahidro 1H pridindol (4,3b-indol); 1983'de hazırlanmış bir moleküldür, ilaç değildir.¹¹⁰



Şekil 9. Stobadin'in yapısı

Elektron redoks potansiyelinin $E=0,58$ olması nedeniyle biyolojik sistemlerde güçlü bir antioksidandır. Bu özelliğinden dolayı biyolojik sistemlerde $-SH$ gruplarının oksidasyonunu, amino asit oksidasyonunu ve singlet oksijen oluşumunu engeller. Düşük toksisiteye sahip olan stobadin; peroksil, alkoksil ve hidroksil radikalleri üzerinde

temizleyici; singlet oksijen üzerinde ise baskılayıcı etkiye sahiptir. Süperoksit radikali üzerindeki etkisi ise önemsiz olmayacak derecededir.^{111,112} Stobadinin bu özellikleri indolik nitrojen üzerinde nitrojen merkezli stabil radikal oluşturma yeteneğinden kaynaklanır. Böylece oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu azaltır.^{112,113}

Stobadin; kalp¹¹⁴ ve merkezi sinir sistemi¹¹⁵ üzerinde koruyucu etkilere sahipken; antiülserojenik,¹¹⁶ antihistaminik¹¹⁷ antimutajenik¹¹⁸ antidisritmik¹¹⁹ ve α adrenolitik⁹⁷ özellikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Farmakokinetik çalışmalarda gastrointestinal sistemden kolayca emildiği, kan-beyin bariyerini geçebildiği gösterilmiştir.^{120,121} Hayvanlarda yapılan akut, subakut ve kronik toksisite çalışmalarında embriyojenik, teratojenik, mutajenik, genotoksik etkileri araştırılmış olan stobadin'in güvenilirliği belirlenmiştir.¹¹³

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1. Deney Grupları

Deney hayvanları Gazi Üniversitesi hayvan deneyleri laboratuvarından sağlanmıştır. Bilimsel araştırma için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul'undan izin alınmıştır.

Çalışmada toplam 40 adet sağlıklı Wistar albino cinsi erkek rat (ortalama 250-300 gr ağırlığında) kullanıldı. Ratlar rastgele her bir grupta 10 adet rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Ratlar serbest diyet ve çeşme suyuyla beslenerek 12 saat aydınlık 12 saat karanlık sürecinde ve normal nem ortamında ve sıcaklıkta plastik kafeslerde tutuldu.

Grup 1- Kontrol grubu (K) (n=10): Ratlara 8 hafta boyunca standart rat diyeti ve çeşme suyu verilmiştir.

Grup 2- CCl₄ grubu (C) (n=10): Ratlara 8 hafta boyunca haftada 3 kez intraperitoneal olarak %10'luk (%v/v) zeytinyağı içinde çözülmüş CCl₄ aşağıda izah edilen şekilde verildi.

1.hafta: 0.3ml/kg vücut ağırlığı oranında

2.hafta: 0.7ml/kg vücut ağırlığı oranında

Sonraki 6 hafta boyunca: 1ml/kg vücut ağırlığı oranında CCl₄ intraperitoneal olarak verildi.¹³⁰

Grup 3- Stobadine Grubu (S) (n=10): Sekiz hafta boyunca 3 doz/hafta olmak üzere oral yolla %0.5 karboksi metil selüloz (Avicel çözeltisi) içerisinde çözülmüş 24.7 mg/kg/gün olarak verildi.¹²²

Grup 4- Stobadine + CCl₄ Grubu (S+C) (n=10): Ratlara Sekiz hafta boyunca 3 doz/hafta olmak üzere oral yolla %0.5 karboksi metil selüloz (Avicel çözeltisi) içerisinde çözülmüş 24.7 mg/kg/gün stobadine ve intraperitoneal olarak 1/10 (v/v) zeytin yağı içerisinde çözülmüş grup 2 de açıklanan şekilde CCl₄ verildi^{122,123}

Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar genel anestezi ve kas gevşetici 40 mg/kg Alfamin ve 2.5 mg/kg Alfazyne karıştırılarak intramuskuler olarak uygulanarak feda edildi, kardiyak kan örnekleri alındı, böbrek dokuları çıkartıldı. Dokular soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra analiz gününe kadar -74°C'de saklandı.

3.2. Kullanılan Aletler

- Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)
- Homojenizatör (Heidolph DIAX900)
- Vorteks (Heidolph Reax 2000)
- Benmari (Heto)
- Santrifuj (Hermle Z 380K)
- Soğutmalı santrifuj (Damon IEC,B-20A soğutmalı, Hermle Z 323K)
- pH metre (Jenway)
- Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)
- Otomatik ve cam pipetler

- Manyetik karıştırıcı
- Diğer laboratuvar gereçleri

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

3.3.1. Böbrek Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

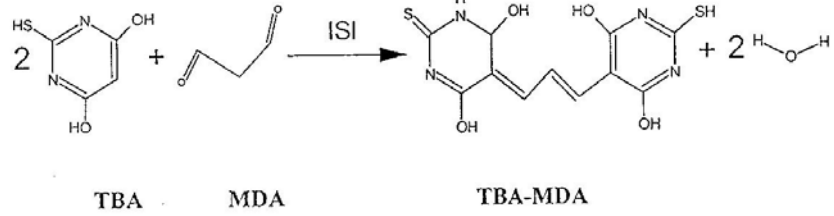
Böbrek doku örneklerinde enzim aktivitesi çalışılacağı zaman dokular derin dondurucudan çıkarıldı. Dokular ¼ (m/v) oranında serum fizyolojik ile Heidolph DIAX900 marka homojenizatör ile soğukta (buz içinde) 1-1.5 dakika 4000 devirde homojenize edildi ve 4500 rpm ve 4 °C de 10 dakika santrifüj edilerek supernatantları ayrıldı.

Ham ekstraktan yeterince katalaz enzim aktivitesi Thiobarbituric rective Substances (TBARS) ve protein tayini için ayrıldı. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar 5/3 (v/v) etanol/kloroform karışımı ile 1/1 oranında karıştırıldı. Soğutmalı santrifüjde 12.000 rpm'de 15 dakika tekrar santrifüj edildi. Üst tabaka SOD, GST, GSH-Px enzim aktiviteleri ile protein tayini için ayrıldı. Ham ekstrat ve süpernatantlar her bir parametre için ayrı ayrı eppendorf tüplerine konularak derin dondurucuda -74° C' de analiz gününe dek saklandı. Tüm analizler bir hafta içerisinde gerçekleştirildi.

3.3.2. Böbrek Dokusunda TBARS Tayini

TBARS tayini Van Ye TM ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı.¹²⁴

Metodun prensibi: İki mol TBA asidik ortamda ve 85-100 °C sıcaklıkta bir mol MDA ile birleşerek mor renkli TBA-MDA kompleksini oluşturur. Bu kompleksin verdiği absorbans 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 10. TBA-MDA kompleksi oluşumu.

Kullanılan Reaktifler

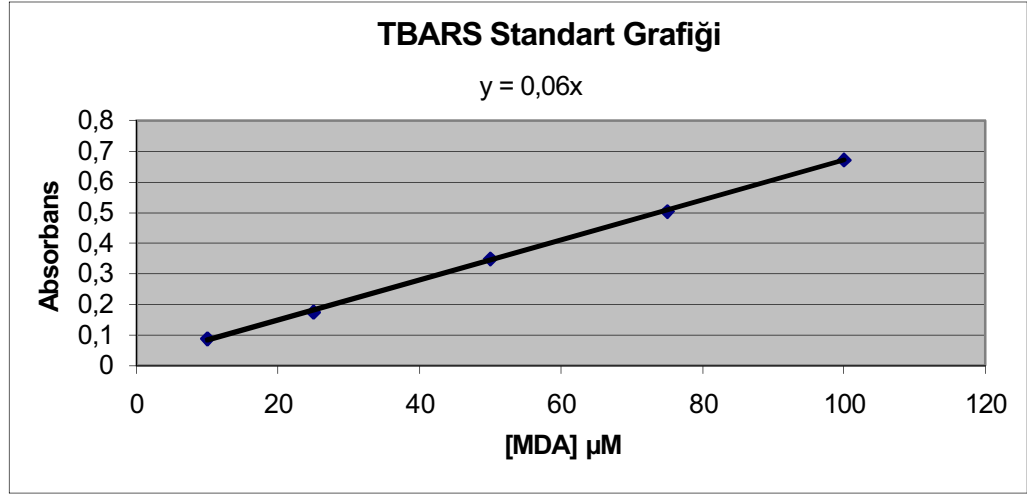
- Fosfat Tamponu : 100 mM, pH:6 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$)
- % 20'lik(m/v) TCA çözeltisi
- % 1'lik (m/v) TBA çözeltisi
- MDA standardı: 1,1,3,3-Tetraetoksi propan standart çözelti olarak kullanıldı. 1,1,3,3-Tetraetoksi propandan önce 10 mM'lık stok çözelti hazırlandı, stok çözeltiden uygun seyreltmelerle 10, 25, 50, 75 ve 100 μM 'lık standart çözeltiler hazırlanarak standart grafik çizildi.

Absorbans=f (Konsantrasyon) grafiğinin eğiminden de numunelerdeki MDA miktarları hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Deneyin Yapılışı:

Her bir numune ve standart için kör çalışıldı. Numune ve standart tüplerine tampon çözelti, etanol, TBA, TCA ve numune/standart eklenirken, kör tüplerine TBA hariç diğerleri eklenerek hazırlandı. 60 dakika kaynar su banyosunda (85-100 °C) bekletildikten sonra çeşme suyu altında soğutuldu, 5000 g'de 20 dakika santrifüj edildi.

Süpernatantları ayrıldı. Daha sonra standart ve numune kör tüplerine TBA eklendi iyice karıştırıldı ve 532 nm.'de her bir tüpün absorbansı distile suya karşı okundu.



Grafik 1: TBARS Standart Grafiği

3.3.3. Böbrek Dokusunda Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Böbrek doku örneklerinde SOD aktivitesi Durak I ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı¹²⁵.

Metodun prensibi: Nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan reaktifler

- Ksantin (0.30mM)
- NBT (150 μM)
- Na_2CO_3 (400mM)
- BSA (1g/l)

- XO (167U/l)
- CuCl₂ (8mM)

Deneyin yapılışı:

Numune tüplerine ölçüm reaktifi, numune ve ksantin oksidaz enzimi; kör tüplerine ise ölçüm reaktifi ve ksantin oksidaz enzimi konuldu. Tüpler 25°C'da 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numune tüplerine CuCl₂, kör tüplerine ise CuCl₂ ve numune eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra her bir tüpün absorbansı 560 nm'de distile suya karşı okundu. Sonuçlar U/mg. protein olarak verildi. Metoda göre 1U SOD aktivitesi, NBT indirgenmesini %50 inhibe eden enzim aktivitesi olarak tarif edilmektedir

3.3.4. Böbrek Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini:

GSH-Px aktivitesi Paglia DE ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı¹²⁶.

Metodun prensibi: 340 nm'de NADPH'nin absorbans değişimine dayanmaktadır. Enzim aktivitesi ise NADPH'nin ϵ değerinden ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) yararlanılarak hesaplandı.

Kullanılan Reaktifler:

- GSH: (150 mM) ;
- NADPH: (3mM);
- H₂O₂: (100mM);
- NaN₃: (2M);
- Fosfat tamponu (pH: 7,0; 50 mM): (Na₂HPO₄/KH₂PO₄)

- GSH-red: Sıvı enzimden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile seyreltilerek hazırlanılır.

Deneyin yapılışı:

Numune tüplerine Fosfat tamponu+5mM EDTA, NaN_3 , GSH, NADPH, GSH-red ve numune konuldu. Kör tüpüne ise H_2O_2 hariç diğer reaktifler kondu. 340 nm de suya karşı sıfırlandıktan sonra körün absorbansı ve H_2O_2 ilave edilir edilmez numunedeki absorbans azalması 0.,1.,2.,3., dakikalarda okunur. Sonuçlar IU/mg. protein olarak verildi.

3.3.5. Böbrek Dokusunda Katalaz Aktivitesinin Ölçümü:

Böbrek doku örneklerinde Katalaz aktivitesinin ölçümü Aebi H'nın metoduna göre yapıldı¹²⁷.

Metodun prensibi: 240 nm'de katalaz tarafından yıkılan hidrojen peroksitin absorbans değişiminin izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan reaktifler

- Fosfat tamponu(50mM,pH=7)
- Tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi

Deneyin yapılışı:

Tampon çözelti ile sıfır ayarı yapılmış spektrofotometreye içerisinde tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi bulunan küvet konuldu. Absorbans değişimi bir süre takip edildi. Daha sonra numune ilave edildi, küvet 2-3 kez altüst edilip karıştırılarak numunenin absorbansı 240 nm'de 3-5 dakika

takip edildi. Lineer olan bölge hesaplamada kullanıldı. Sonuçlar IU/mg protein olarak verildi.

3.3.6. Böbrek Dokusunda Glutasyon-S- Transferaz Tayini:

Glutasyon-S-Transferaz aktivitesi tayini Habig WH ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı¹²⁸.

GST

1-Cloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) + GSH → S-2,4-dinitrofenilglutasyon (DNPG) + H⁺ + Cl⁻

Bu reaksiyon sırasında oluşan DNPG bileşiği'nin 340 nm. de absorbans artışı takip edilmektedir.

Reaktifler

- 100 mM. pH:6 fosfat tamponu (Na₂HPO₄/KH₂PO₄)
- CDNB (1-Kloro 2,4-Dinitrobenzen): 25 mM, saf etanolde çözüldü.
- GSH:50 mM (tamponda çözülür)

Deneyin Yapılışı:

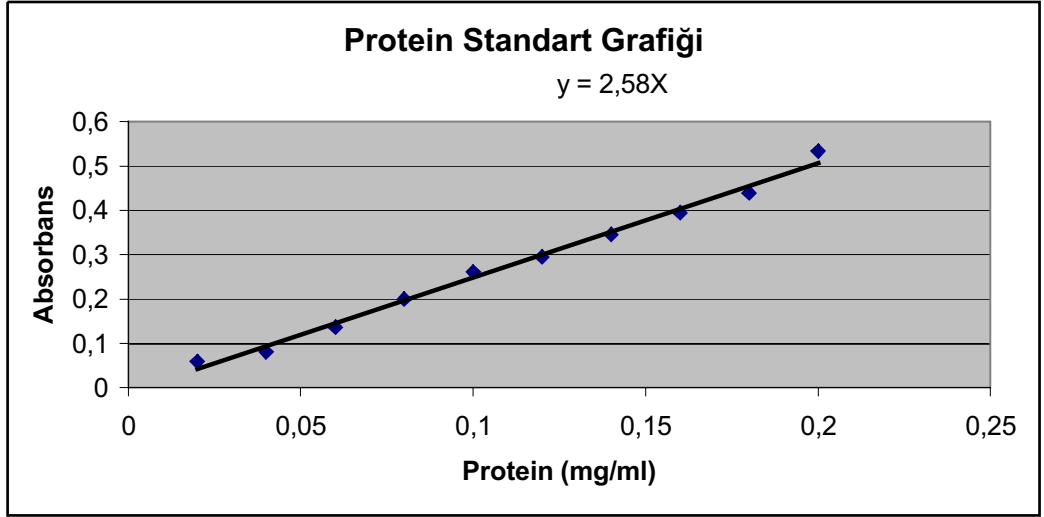
Numune ve kör tüplerine fosfat tamponu, CDNB, numune eklenip iyice karıştırıldı. 340 nm de köre karşı sıfır ayarı yapıldıktan sonra numunedeki absorbans değişimi 1-3 dakika takip edildi. Daha sonra küvete redükte glutasyon (GSH) eklendi ve absorbans değişimi 3 dakika boyunca takip edildi. GST aktivitesi DNPG'un ε katsayısından yararlanılarak hesaplandı (ε: 10 mM⁻¹.cm⁻¹).

Sonuçlar spesifik aktivite (IU/mg.protein) olarak verildi.

3.3.7.Böbrek Dokusunda Protein Tayini:

Homojenat ve süpernatantlardaki protein miktarı Lowry metoduna göre yapıldı¹²⁹.

Protein standartı olarak BSA (Sigma) kullanıldı. 0.02-0.2mg/ml konsantrasyon aralığında standartlar kullanılarak standart grafik çizildi ve eğimden numunelerdeki protein miktarı hesaplandı. Sonuçlar mg/ml olarak verildi.



Grafik 2: Protein Standart Grafiği

Metodun Prensibi: Alkali ortamda proteinler Cu^{2+} ile Cu^{2+} -protein kompleksi oluşturarak, Folin-Ciocalteau-Phenol reaktifini redükleyerek mavi-mor renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Reaktifler:

1) A reaktifi: 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1.0 gr $\text{Na}_3\text{-Sitratt}$ bir miktar distile suda çözündükten sonra 100ml'ye tamamlandı.

2) B reaktifi: 20gr Na_2CO_3 ve 4.0 gr NaOH bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlandı.

3) C reaktifi: 50 ml B çözeltisi + 1.0 ml A çözeltisi karışımı hazırlandı.

4) D reaktifi (Folin-Ciocalteu Çözeltisi): 10 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi 10 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Kör ve numune tüplerine 2.5 ml C reaktifi ve numune tüpüne 10µl süpernatant eklendikten sonra iyice karıştırılarak laboratuvar sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Kör ve numune tüplerine 250 µl D reaktifi eklendikten sonra laboratuvar sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve 700 nm'de numunelerin absorbanları köre karşı okundu. Sonuçlar standart eğim grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

3.3.8.Böbrek Doku Hücrelerinde Histopatolojik Değerlendirme

Böbrek örnekleri deney hayvanından alınır alınmaz serum fizyolojik ile yıkanarak %10'luk formol solüsyonunda tespit edildi. Ardından alışılagelmiş histopatolojik takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar haline getirildi. Bloklardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler lamlar üzerine alınıp 60 °C'lik etüvde ardında ksilollerde deparafinize edilip azalan alkol gradiyentinde rehidrate edilerek distile suya kadar getirildiler. Takiben Hematoksilen&Eozin ile boyanarak lamelle kapatıldı. Histopatolojik değerlendirme ve fotoğraflama işlemi Leica DM 4000 B (Wetzlar, GERMANY) ışık mikroskobunda yapıldı.

Hematoksilen –Eozin Boyası

5 mikron kalınlığında alınan kesitler 60 °C de etüvde ve ksilolde deparafinize edildikten sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek

rehidrate edildiler. Havada kuruyan doku kesitleri hematoksilende 10 dk boyandıktan sonra musluk suyunda yıkandı ve %3'lük amonyaklı suya daldırılarak mordantlandı. Yeniden yıkanan dokular 10 dk eozin ile boyandılar. 10 dk'lık musluk suyunun ardından artan alkol serilerinden geçirilip dehidrate olan dokular ksilolde 45 dk bekletildikten sonra entellan ile kapatıldılar.

3.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı ve ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. İstatistiksel karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanıldı ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal ve Histopatolojik Bulgular

Rat böbrek dokularına ait enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu yıkım ürünü olarak TBARS seviyelerine ait analiz sonuçları gruplara göre Tablo 1 ve Grafik 1-8 de görülmektedir. Histolojik bulgular ise Resim 1-14 de görülmektedir.

Tablo 1: Rat böbrek dokularına ait Ortalama $\pm$ Standart sapma olarak SOD, CAT, GSH-Px ve GST enzim aktiviteleri ile TBARS değerleri.

Gruplar	SOD (U/mg p)	CAT (IU/mg p)	GSH-Px (mIU/mg p)	GST (mIU/mg p)	TBARS (nmol/mg p)
Kontrol(K)	64.36 $\pm$ 9.50	3264 $\pm$ 647	26.2 $\pm$ 9.0	1.12 $\pm$ 0.41	11.4 $\pm$ 4.00
CCl ₄ (C)	20.11 $\pm$ 6.86	2476 $\pm$ 411	10.7 $\pm$ 3.9	2.60 $\pm$ 1.00	18.8 $\pm$ 6.40
Stobadine(S)	41.52 $\pm$ 11.11	3847 $\pm$ 664	31.2 $\pm$ 9.7	1.69 $\pm$ 0.53	15.7 $\pm$ 4.30
S+CCl ₄ (S+C)	32.64 $\pm$ 9.14	2702 $\pm$ 550	12.7 $\pm$ 4.9	2.14 $\pm$ 0.50	16.4 $\pm$ 4.18
İstatistiksel değerlendirme (Mann Whitney –U ve paired- independent t-test)					
Groups	SOD	CAT	GSH-Px	GST	TBARS
K-C	P<0.0001	P<0.01	P<0.001	P<0.0025	P<0.05
K-S	P<0.0025	p>0.05	p>0.05	P<0.01	P<0.05
K-(S+C)	P<0.0001	p>0.05	P<0.005	P<0.001	P<0.05
C-S	P<0.0001	P<0.0001	P<0.001	p>0.05	p>0.05
C-(S+C)	P<0.0025	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
S-(S+C)	p>0.05	P<0.025	P<0.0025	p>0.05	p>0.05

Tablo 1 ve Grafik 1-8 den de görüldüğü gibi SOD aktivitesi tüm gruplarda {Kontrol/CCl₄, Kontrol/Stob, Kontrol/Stob + CCl₄, CCl₄/Stob ve CCl₄-(Stob+CCl₄)} kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak

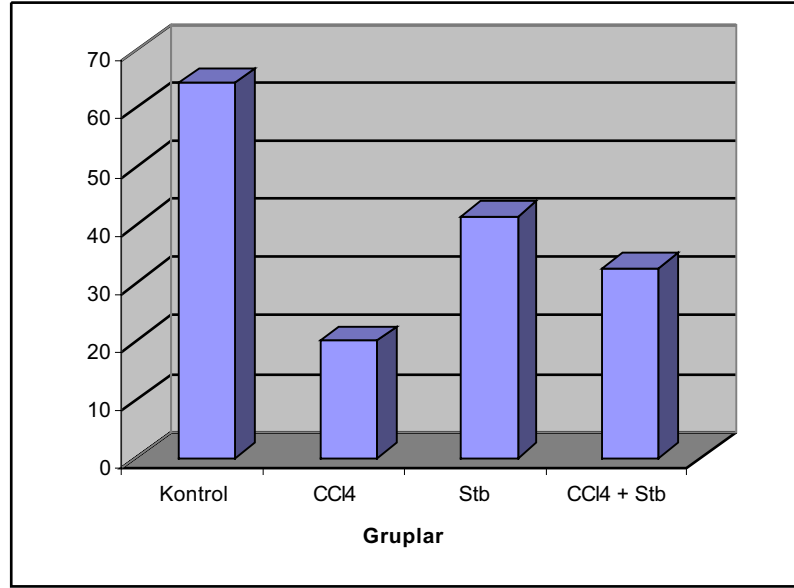
bulunmuştur sırası ile $p<0.001$, $p<0.0025$, $p<0.0001$, $p<0.0001$ ve $p<0.0025$ dir. Ancak stobadine-stobadine+CCl₄ grupları kıyaslandığında, stobadine grubuna göre Stob+CCl₄ grubunda SOD aktivitesinde bir düşme söz konusu olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır $p>0.05$.

Gruplar arası Katalaz aktivitesi incelendiğinde bazı gruplarda kontrol grubuna göre farklı seviyelerde yükselme söz konusudur. Bu yüksek CAT aktiviteleri kontrol-CCl₄, CCl₄-stob ve stob-(stob+CCl₄) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur sırası ile $p<0.01$, $p<0.0001$ ve $p<0.025$ dir. CAT aktivitesi ile ilgili olarak gruplar arası diğer karşılaştırmalar ise istatistiksel olarak anlamsız olarak tesbit edilmiştir $p>0.05$.

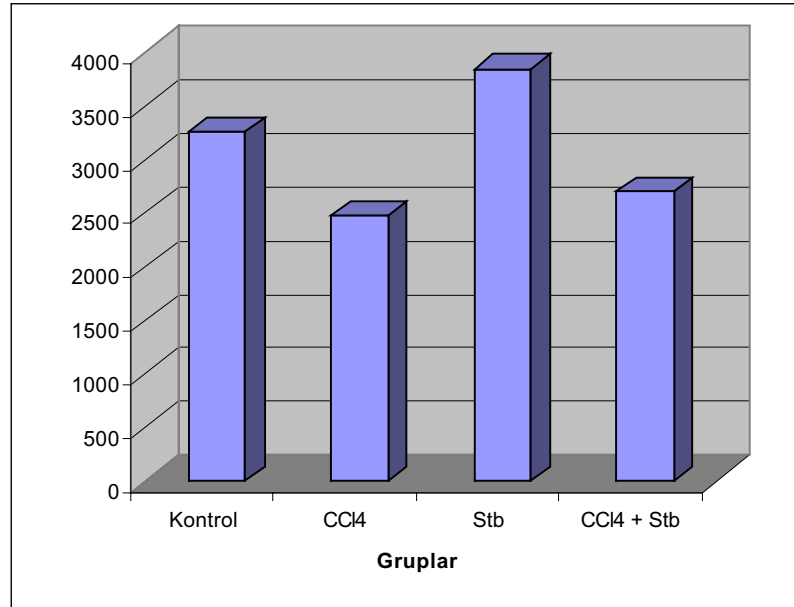
Glutasyon peroksidaz aktivitesi CCl₄ ve stob+CCl₄ gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir azalma gösterirken $p<0.001$ ve $p<0.005$, stobadine grubunda kontrol grubuna göre kısmi bir artış söz konusu olmuştur, ancak istatistiksel olarak anlamsızdır. CCl₄ ile stobadin ve CCl₄ ile stob+CCl₄ grupları incelendiğinde; stobadin grubunda CCl₄ grubuna göre anlamlı derecede yükselme söz konusu iken stob+CCl₄ grubunda bir yükselme olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır. Sırasıyla $p<0.01$, $p>0.05$. Öte yandan stobadine grubu ile stobadine + CCl₄ grubu kıyaslandığında stobadine grubuna göre stob + CCl₄ grubunda anlamlı bir azalma görülmektedir $p<0.0025$.

Glutasyon-s-transferaz enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna göre hem CCl₄ hem stobadine ve hem de stob+CCl₄ gruplarında anlamlı bir yükselme görülmektedir (sırası ile $p<0.0025$, $p<0.01$ ve $p<0.001$).

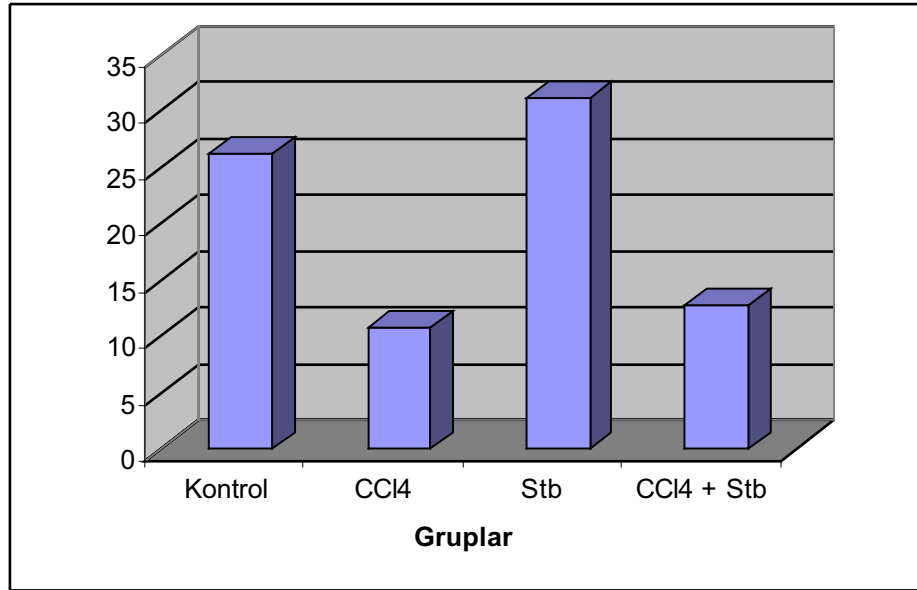
TBARS seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında CCl₄, Stobadine ve Stob+CCl₄ gruplarında anlamlı bir artış göstermektedir $p<0.05$. Ancak diğer grupların birbirleri ile kıyaslandığında anlamlı bir artış görülmemektedir. En belirgin artış sırası ile CCl₄ ve Stobadine + CCl₄ grubunda görülmektedir.



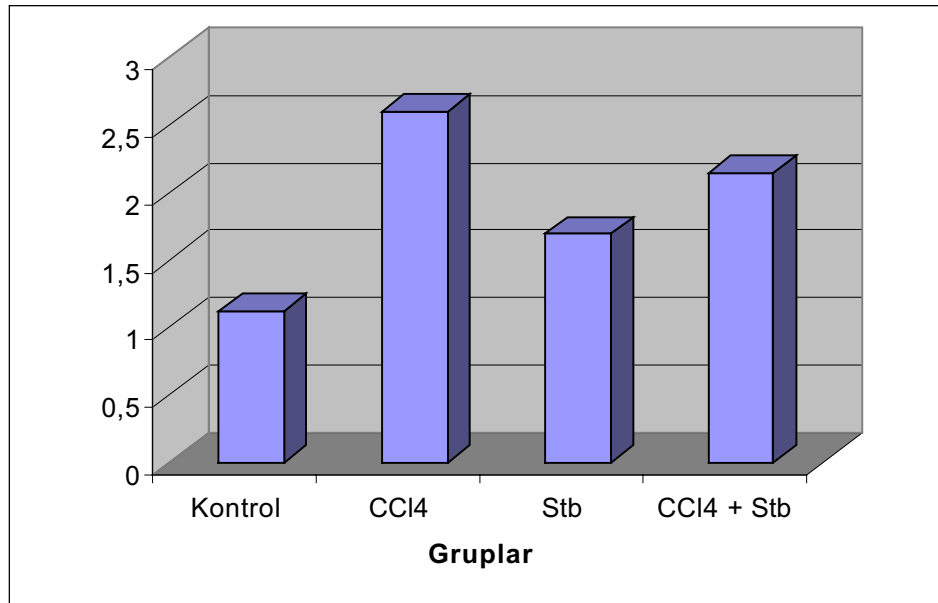
Grafik 3: Kontrol, CCl₄, Stobadine ve CCl₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait SOD aktiviteleri



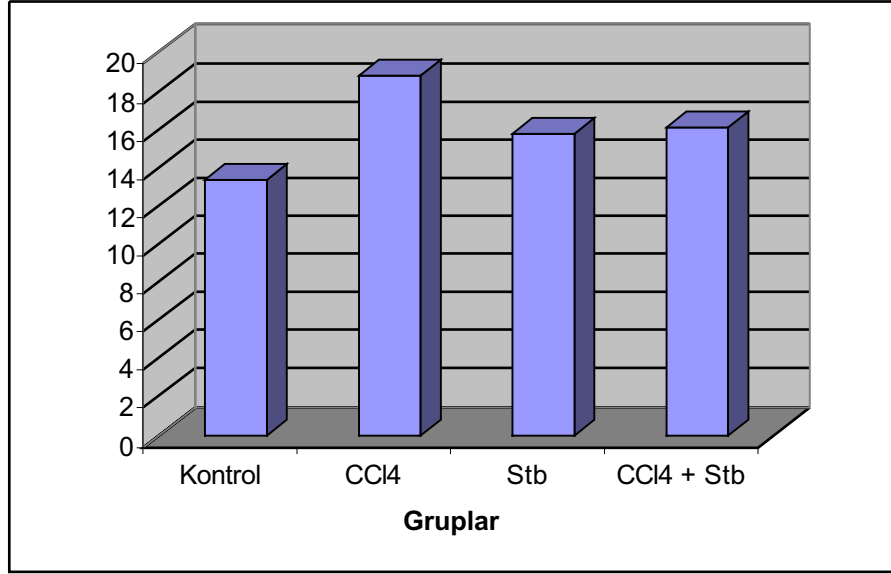
Grafik 4: Kontrol, CCl₄, Stobadine ve CCl₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait CAT Aktiviteleri



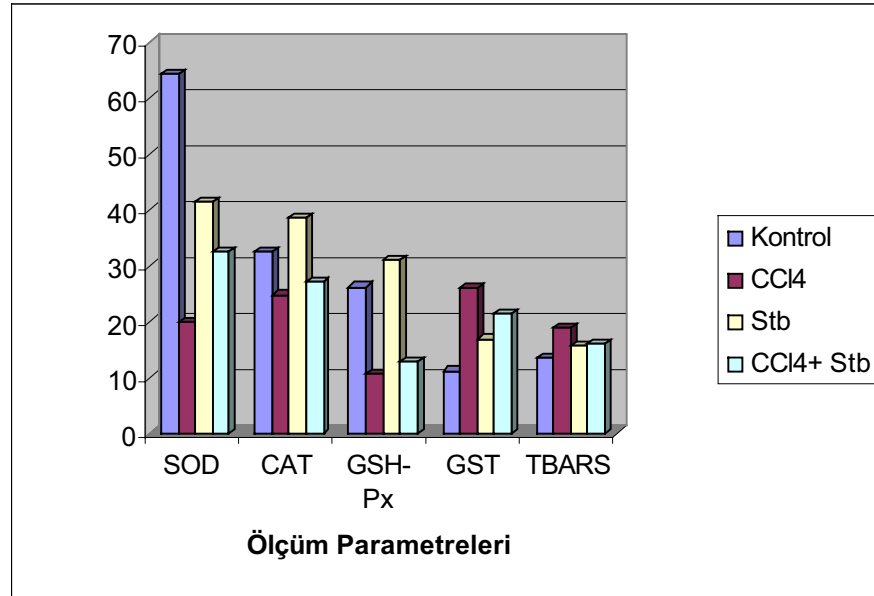
Grafik 5: Kontrol, CCl₄, Stobadine ve CCl₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait GSH-Px Aktiviteleri



Grafik 6: Kontrol, CCl₄, Stobadine ve CCl₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait GST Aktiviteleri



Grafik 7: Kontrol, CCl₄, Stobadine ve CCl₄ + Stobadine verilen rat böbrek dokularına ait TBARS Değerleri.



Grafik 8: Kontrol, CCl₄, Stobadine ve CCl₄ + Stobadine uygulanan Rat Böbrek dokusuna ait Enzim Aktiviteleri ve TBARS Değerleri {CAT(:100), GST(x10) }

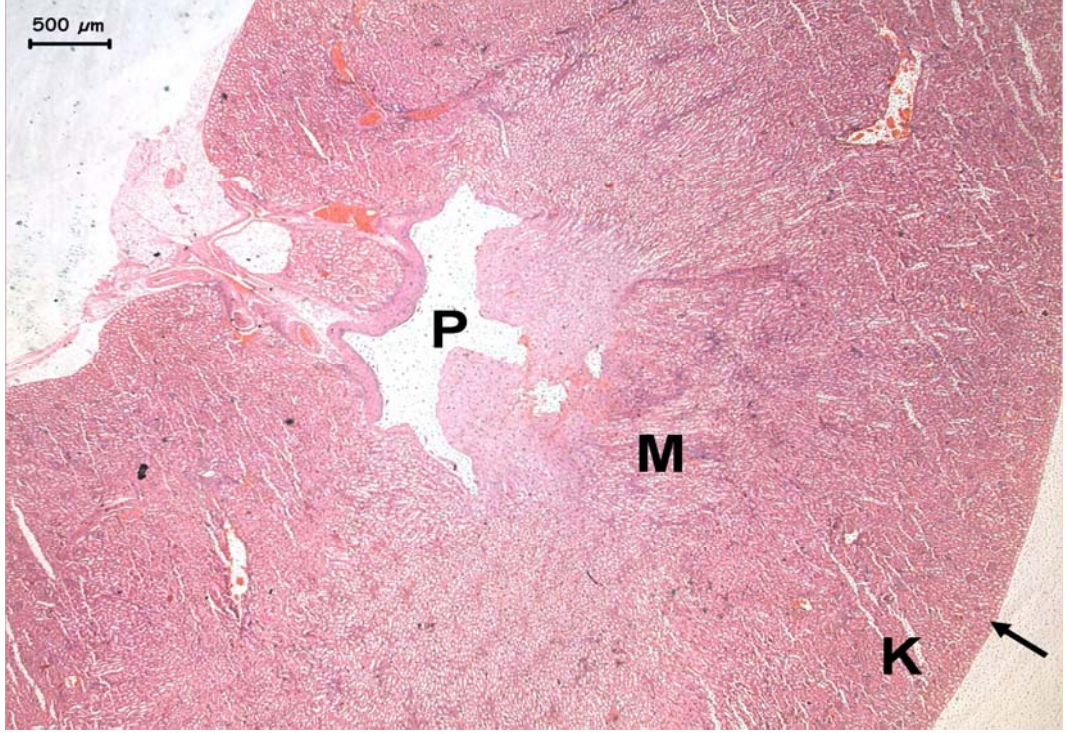
4.2. Histopatolojik Bulgular:

Kontrol grubuna ait kesitlerde böbrek korteksinde glomerül, proksimal ve distal tübülüs yapıları ve interstisyel bölge normal morfolojik yapısında değerlendirildi (Resim1,2,3). Karbon tetraklorür uygulanan grupta böbrek korteksinde glomerüler yapıda hiperselülarite, tübül hücrelerinde hidropik dejenerasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hem korteks hem de medulla da konjesyon saptandı. (Resim 4,5,6,7,8)

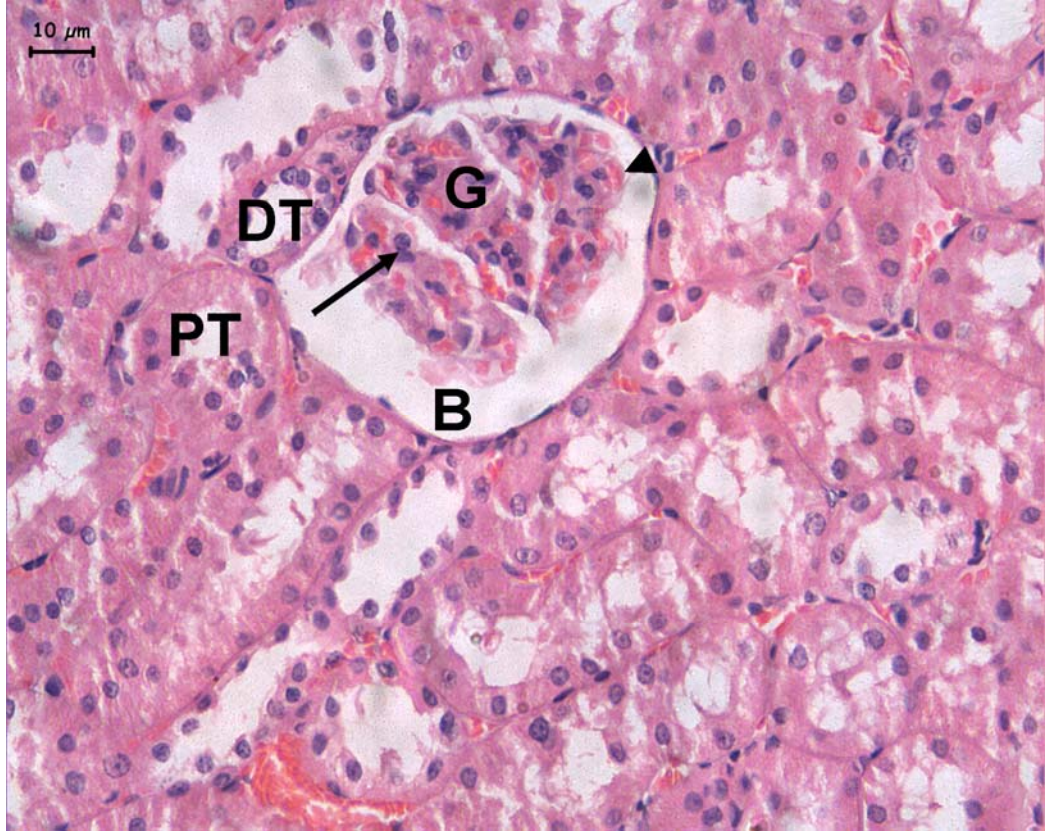
Karbon tetraklorür'e ek olarak stobadin uygulanan grupta böbrek korteksinde glomerüler yapıdaki hiperselülaritede Karbon tetraklorür uygulanan gruba göre azalma saptandı. Tübül hücrelerindeki hidropik dejenerasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda değişiklik izlenmezken hem korteks hem medulladaki konjesyonda belirgin azalma dikkati çekti (Resim 9,10,11)

Sadece stobadin uygulanan grupta ise tüm kesitler kontrol grubu ile benzerlik gösteriyordu. Glomerüler yapı, proksimal ve distal tübülüsler, interstisiyel alanlar normal morfolojik yapıda izlendi (Resim 12,13,14)

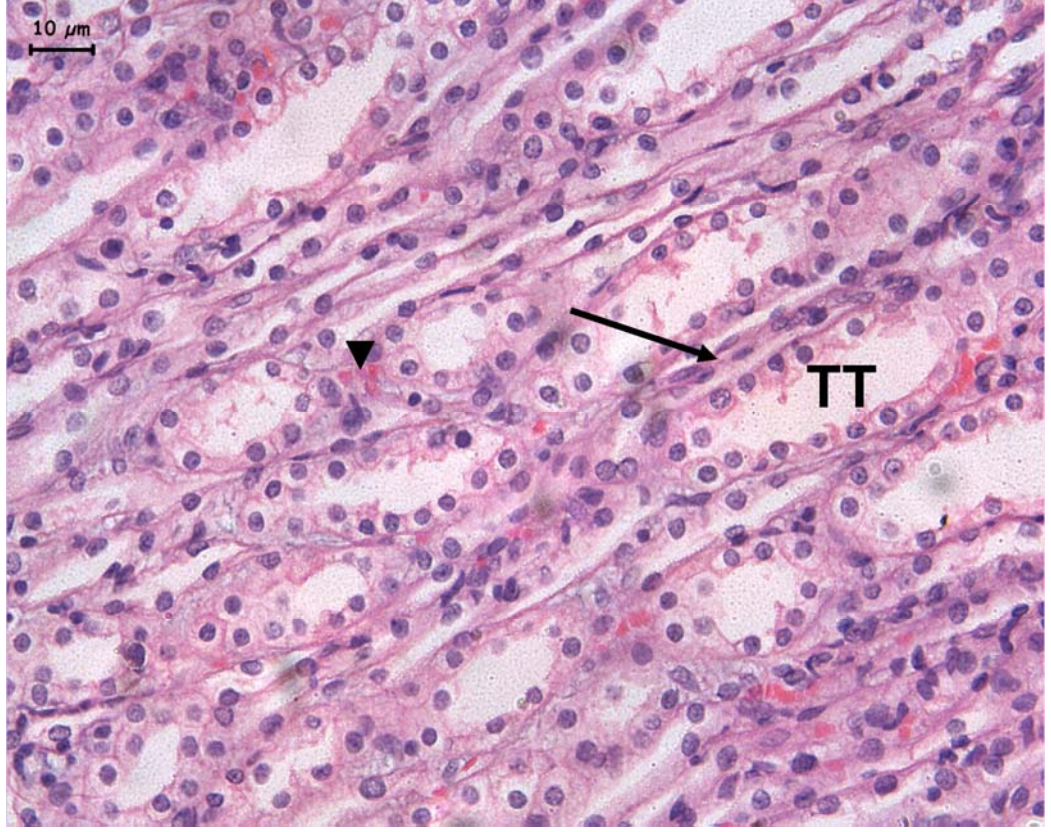
Sonuç olarak karbon tetraklorürün karaciğerle birlikte böbrekte de sirotik prosesi başlattığı belirlenmiştir. Stobadin karbontetraklorürün meydana getirdiği glomerüler hiperselülarite, ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda azalmaya neden olmazken, tübüllerdeki hidropik dejenerasyonu düzeltmekle beraber hem korteks hem de medulladaki kapiller konjesyonu azaltmıştır.



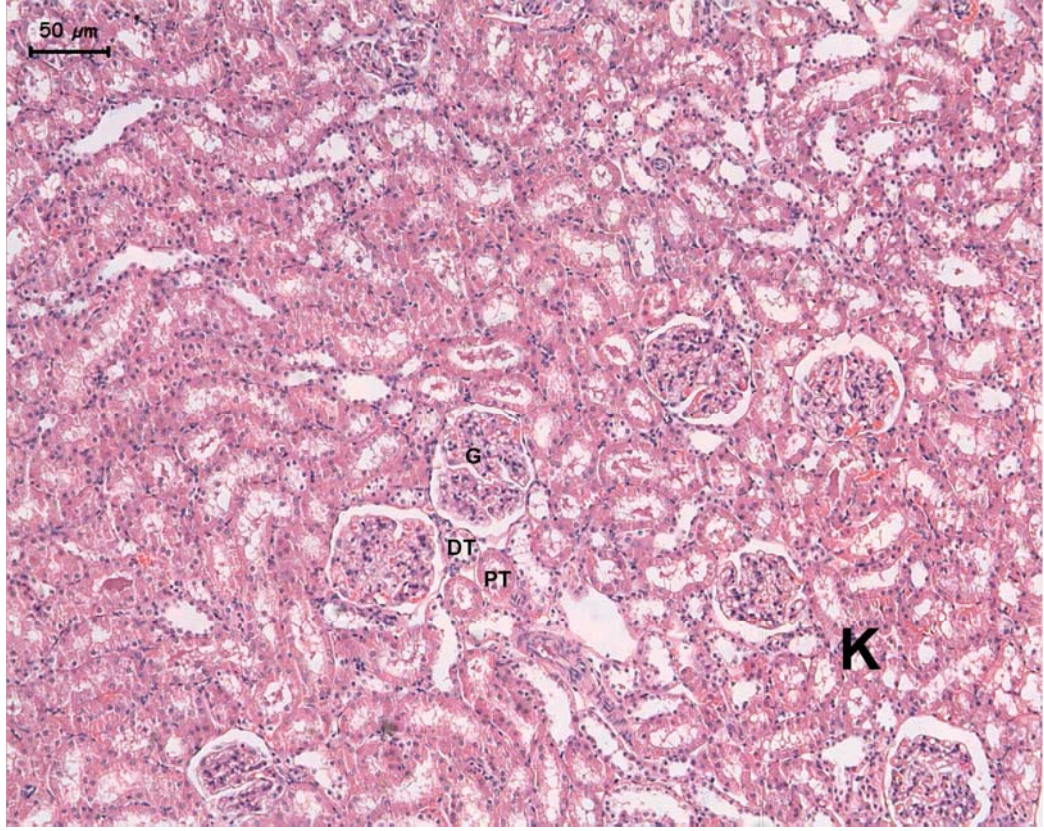
Resim 1: Kontrol grubuna ait resimde böbrek panoramik olarak izleniyor. Böbrek kapsülü (↑) korteks (K), medulla (M), renal pelvis (P) normal yapıda dikkati çekiyor. (Hematoksilen&Eozin, bar: 500μm)



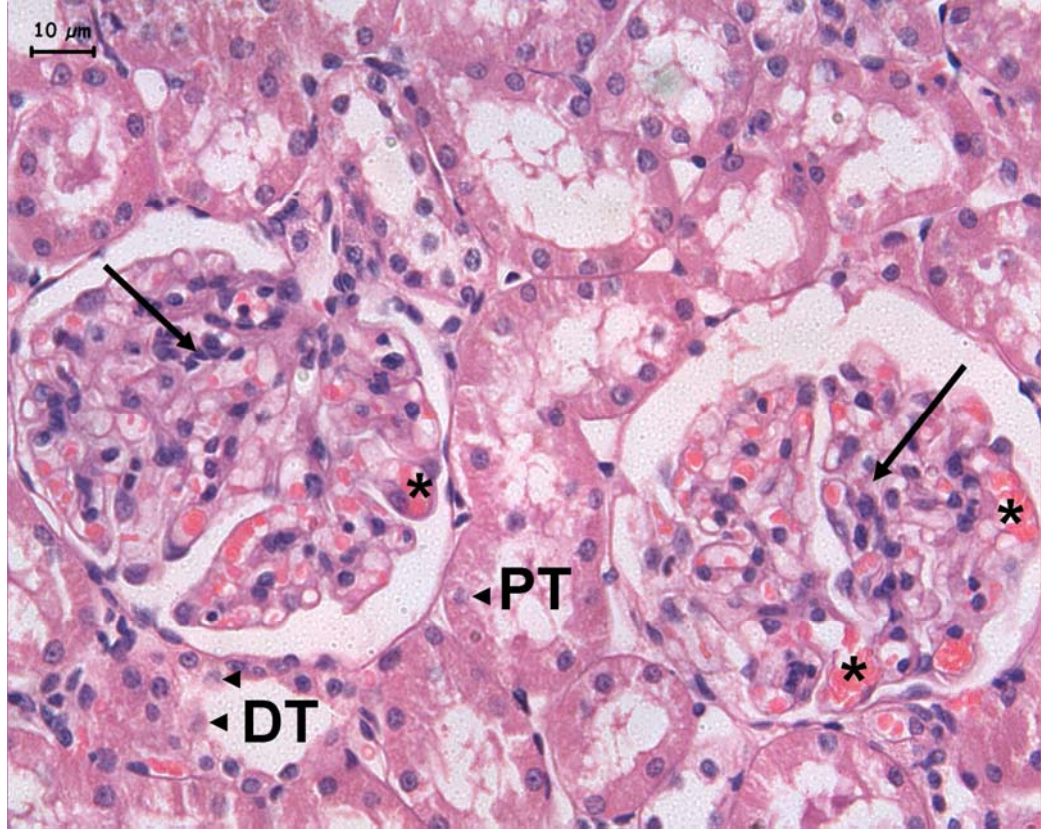
Resim 2: Kontrol grubuna ait büyük büyültmede böbrek korteksi izleniyor. Proksimal tübülüs (PT), distal tübülüs (DT), glomerül (G), Bowmann kapsülü (B), glomerüler kapillerler (►) ve mezangiel hücreler (↑) normal yapıda dikkati çekiyor. (Hematoxilen&Eozin, bar: 10 μm)



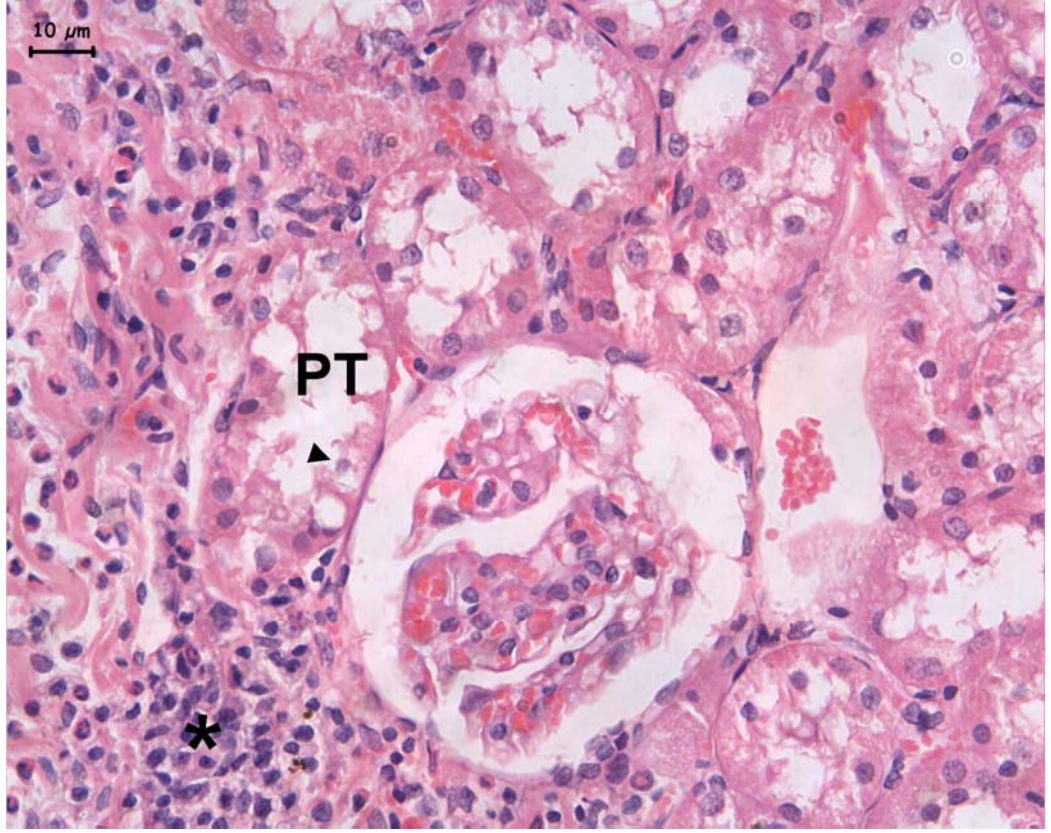
Resim 3: Kontrol grubuna ait böbreğin medullası izleniyor. Toplayıcı tübüller (TT), Henle kulbu (↑), kapillerler (▶) normal yapıda dikkati çekiyor. (Hematoksilen&Eozin, bar: 10 μm)



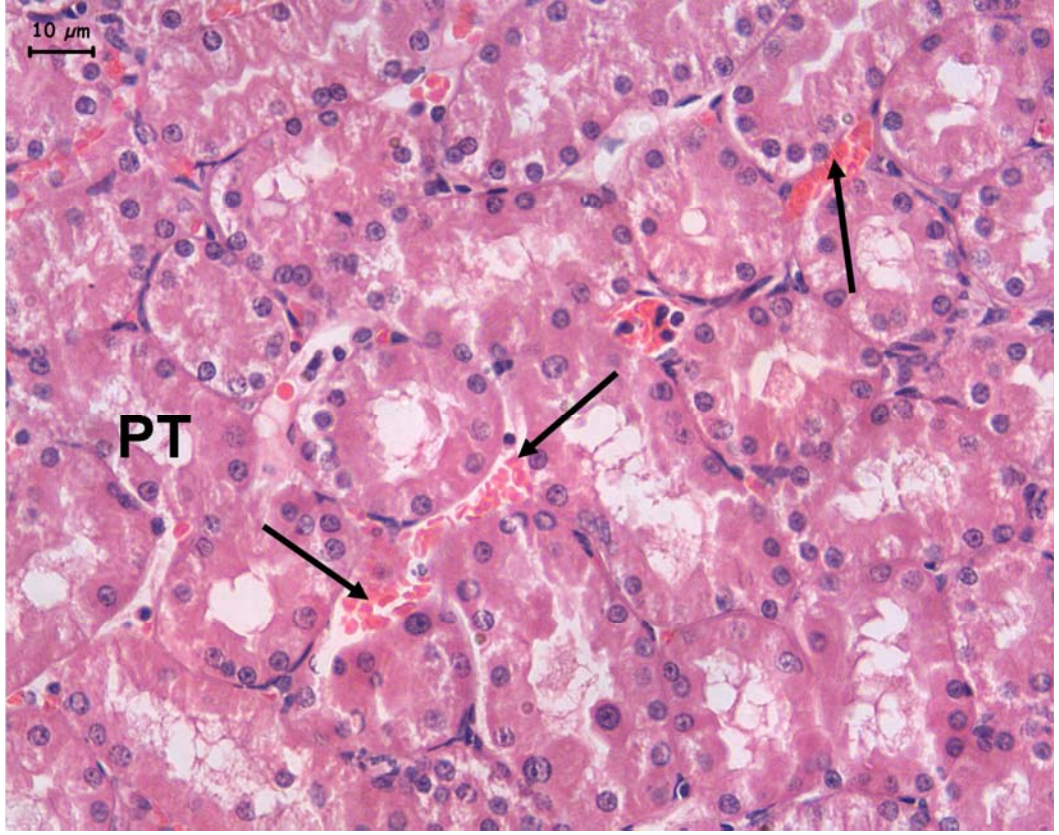
Resim 4: Karbon tetraklorür grubuna ait böbreğin korteksi izleniyor. (Hematoksilen&Eozin, bar: 50 µm)



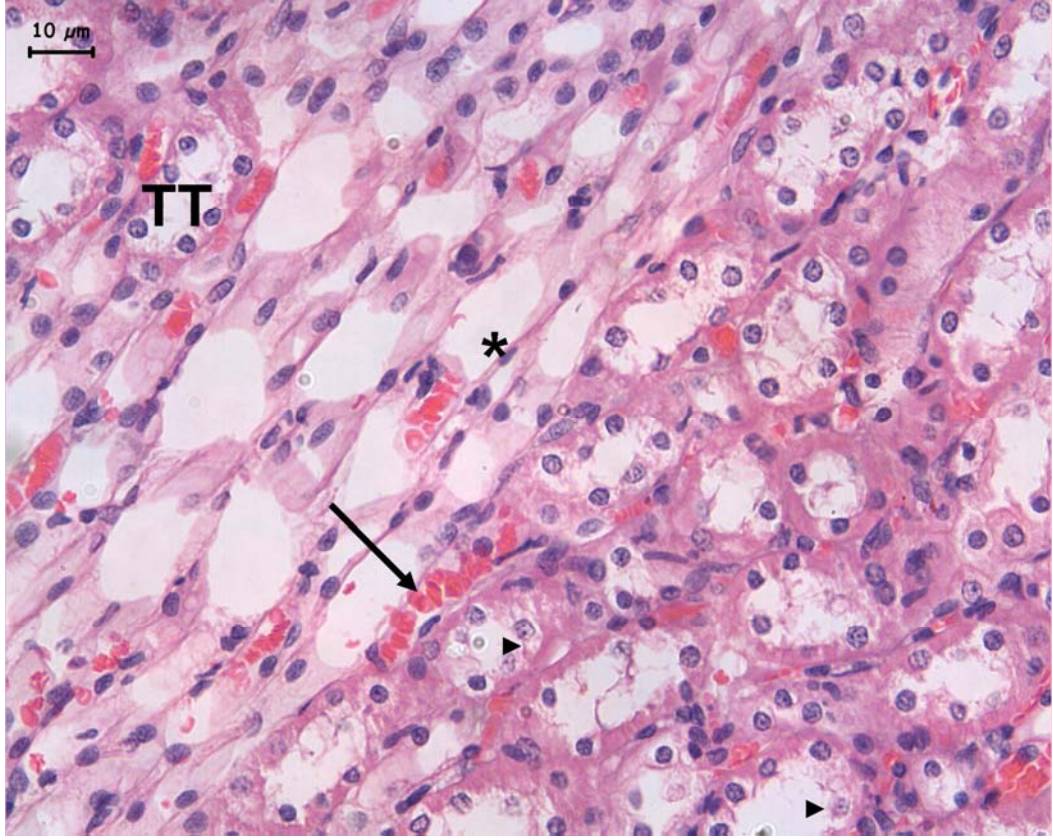
Resim 5: Karbon tetraklorür grubuna ait böbrek korteksinin büyük büyültmesi izleniyor. Glomerüler hiperselülarite (↑), kapiller konjesyon (*), proksimal tübül (PT) ve distal tübül (DT) hücrelerinde hidropik dejenerasyon (►) dikkati çekiyor. (Hematoksilen&Eozin, bar: 10 µm)



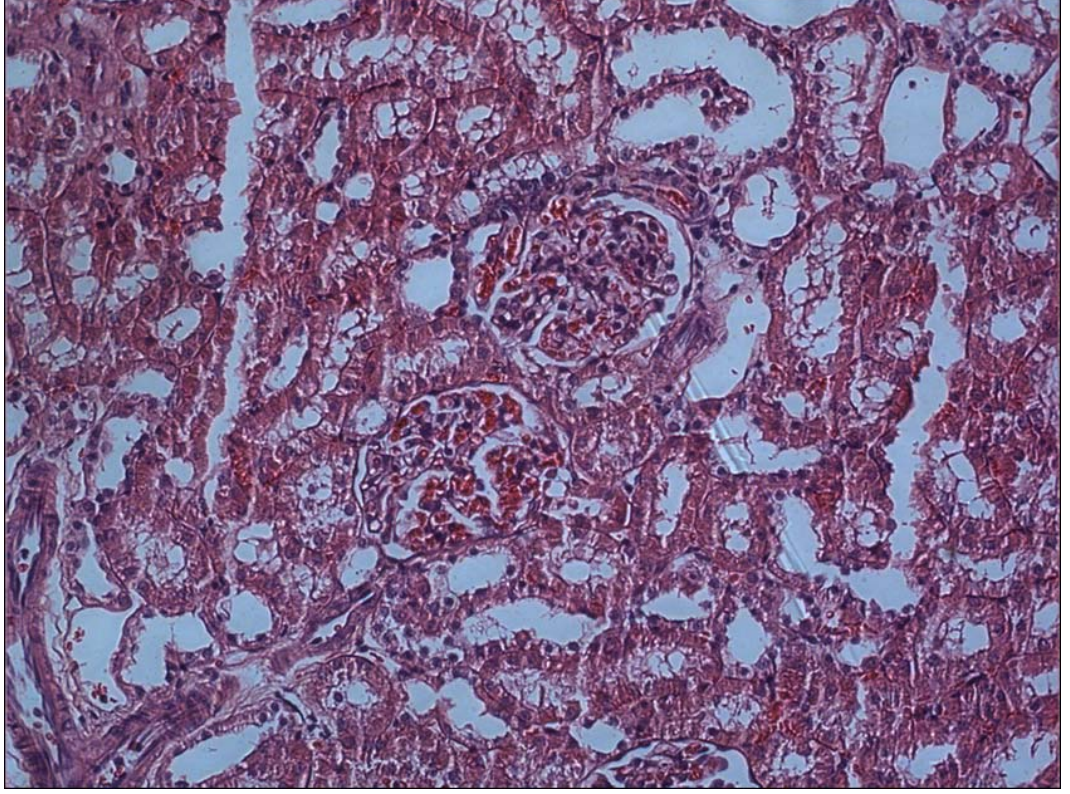
Resim 6: Karbon tetraklorür grubuna ait kortekste proksimal tübül (PT) hücrelerinde hidropik dejenerasyon(►), ayrıca interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu(*) izleniyor. (Hematoksilen&Eozin, bar: 10 μm)



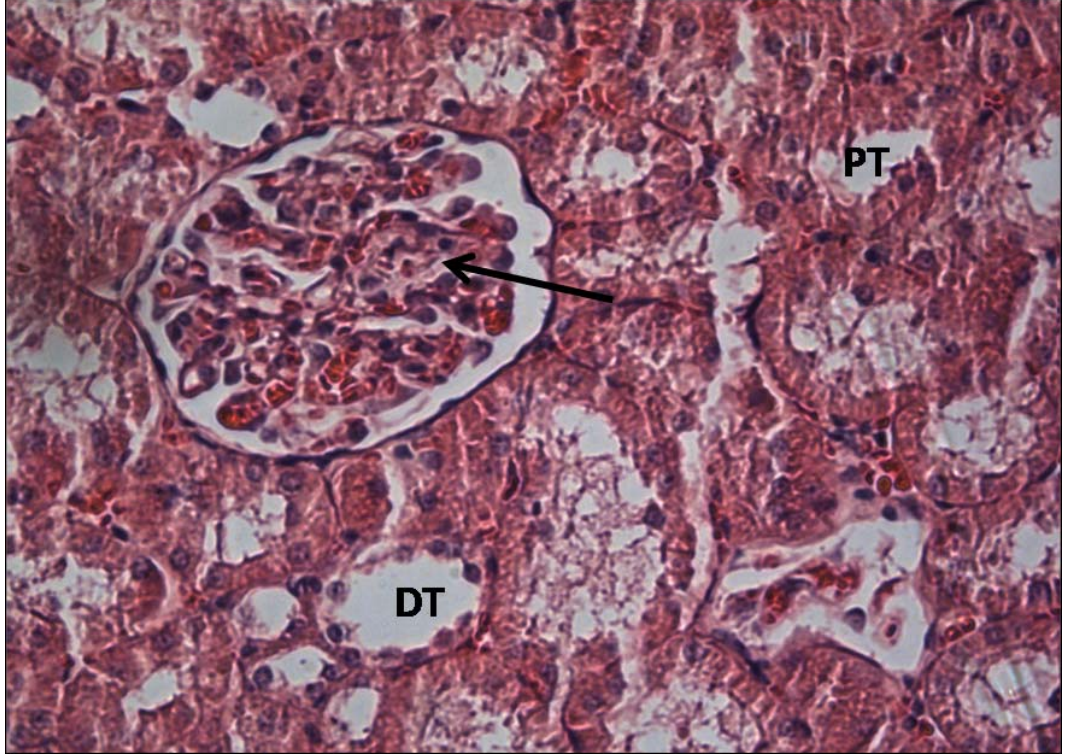
Resim 7: Karbon tetraklorür grubuna ait kortekste vasküler konjesyon (↑) izleniyor. (Hematoksilen&Eozin, bar: 10 μm)



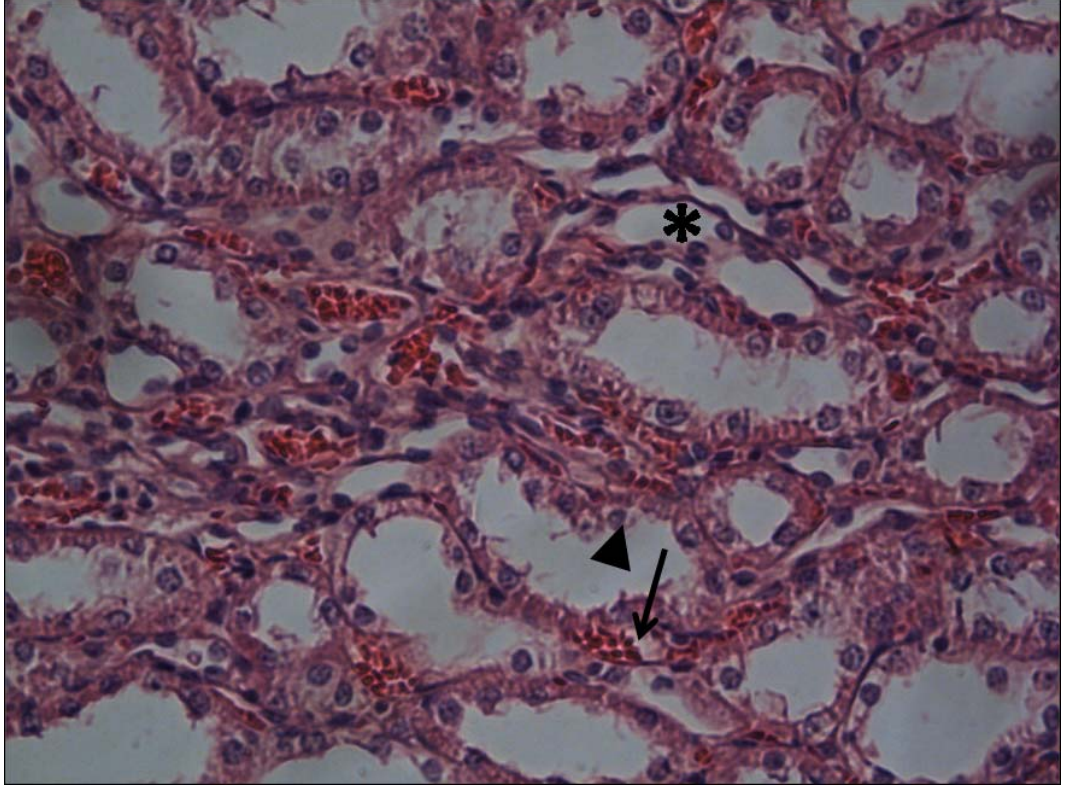
Resim 8: Karbon tetraklorür grubuna ait medullada hidropik dejenerasyon gösteren tübül hücreleri (►), ve kapiller konjesyon (↑) ve normal yapıda Henle kulbu (*) izleniyor. (Hematoksilen&Eozin, bar: 10 µm).



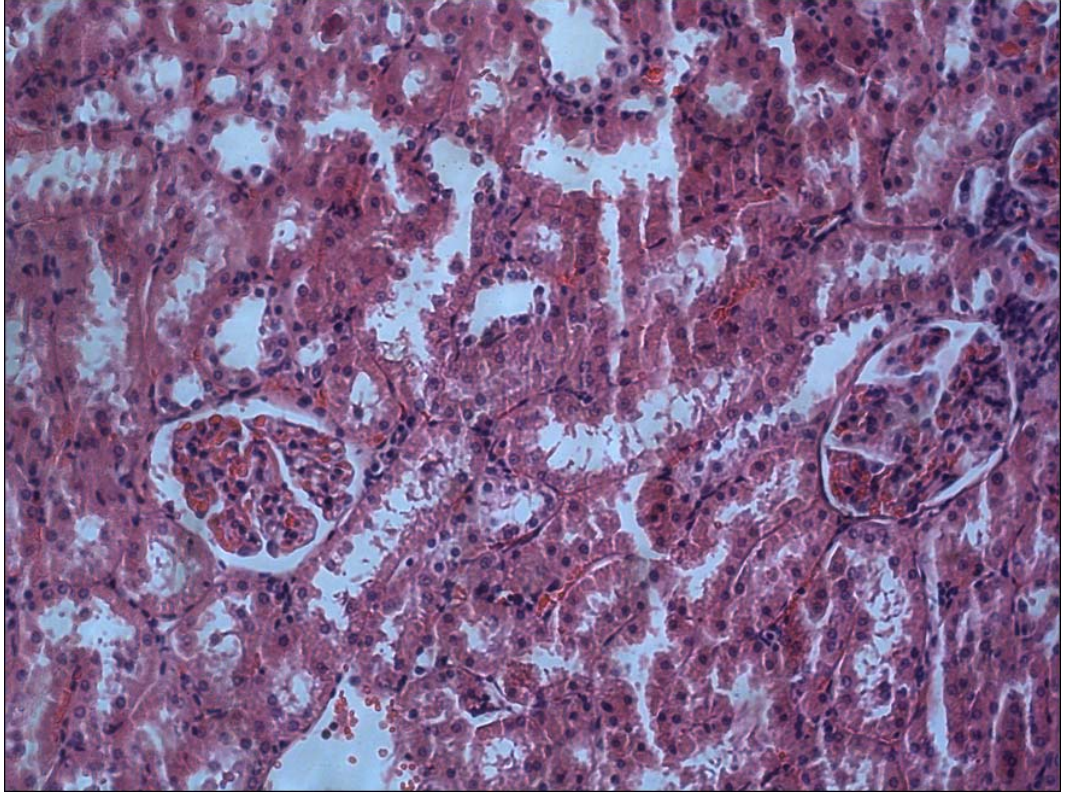
**Resim 9: Karbontetraklorür ve stobadin grubuna ait böbrek korteksi izleniyor.
(Hematoksilen&Eozin, x200)**



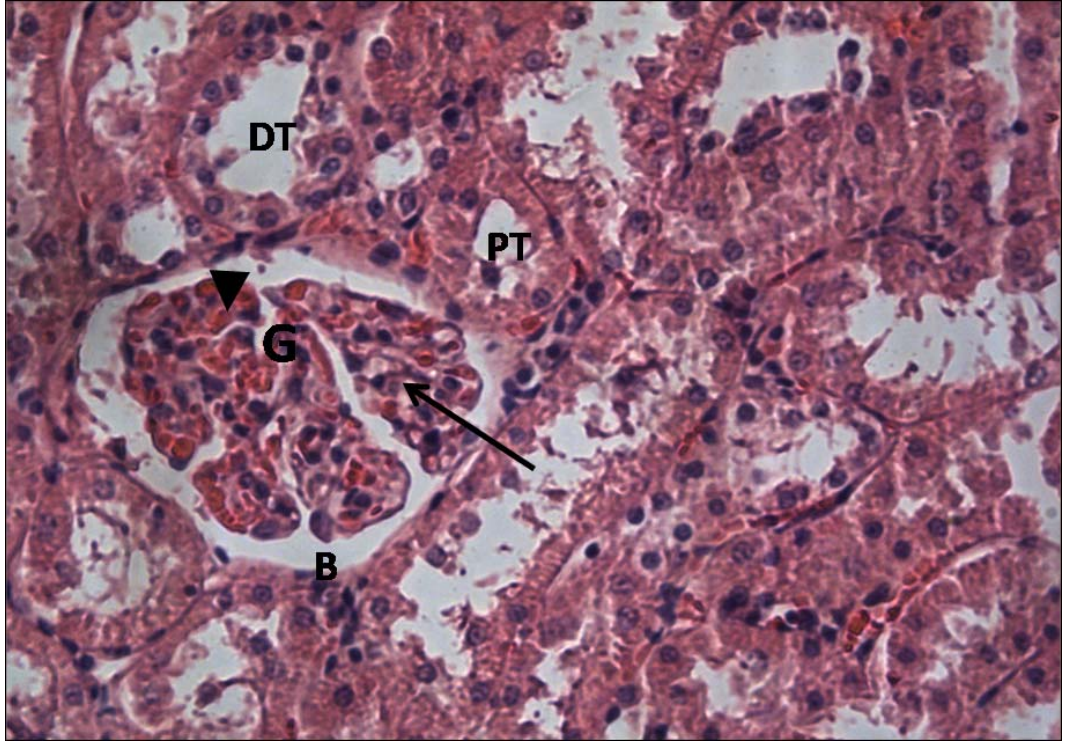
Resim 10: Karbontetraklorür ve stobadin grubuna ait böbrek korteksinin büyük büyültmesi iz izleniyor Glomerüllerde hiperselülarite (↑), proksimal tübül (PT) ve distal tübül (DT) hücrelerinde hidropik dejenerasyonda karbontetraklorür grubuna oranla azalma izleniyor (Hematoksilen&Eozin, x400)



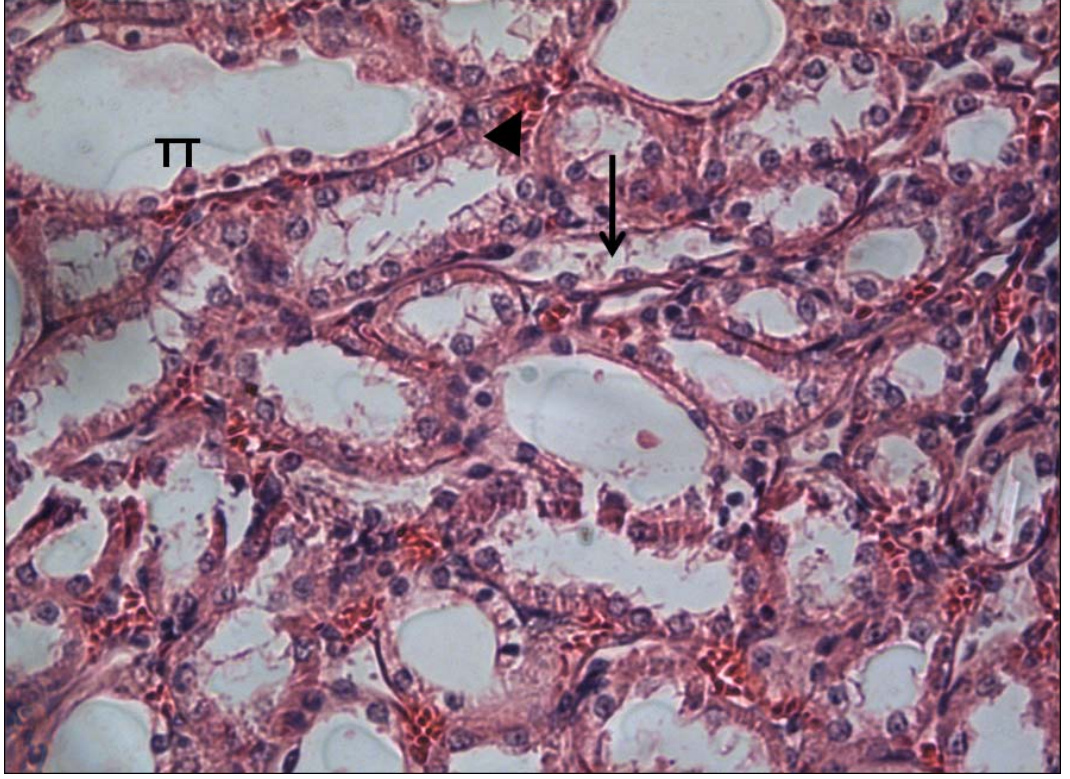
Resim 11: Karbontetraklorür ve stobadin grubuna ait medulla izleniyor. Hidropik dejenerasyon gösteren tübül hücreleri (►), minimal kapiller konjesyon (↑), morfolojisi normal Henle kulbu (*) dikkati çekiyor. (Hematoksilen&Eozin, x400)



Resim 12: Stobadin grubuna ait böbrek korteksi izleniyor. (Hematoksilen&Eozin, x200)



Resim 13: Stobadin grubuna ait büyük büyültmede böbrek korteksi izleniyor. Proksimal tübülüs (PT), distal tübülüs (DT), glomerül (G), Bowmann kapsülü (B), glomerüler kapillerler (▶) ve mezangiel hücreler (↑) normal yapıda dikkati çekiyor (Hematoksilen&Eozin, x400)tübüller (TT), Henle kulbu (↑), kapillerler (▶) normal yapıda dikkati çekiyor.



Resim 14: Stobadin grubuna ait böbreğin medullası izleniyor. Toplayıcı tübüller (TT), Henle kulbu (↑), kapillerler (►) normal yapıda dikkati çekiyor. (Hematoksilen&Eozin, x400)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sanayinin birçok alanında ve tarımda değişik amaçlarla kullanılan CCl_4 , hepatoksitesi ve nefrotoksitesi bilinen bir kimyasal maddedir.¹³¹

Özellikle endüstriyel yanı ağır basan bir kimyasal madde olarak karbon tetraklorür (CCl_4), kuru temizleme sanayi başta olmak üzere birçok alanda kullanılan, özellikle karaciğer ve diğer organlara toksik etkisi olan bir bileşiktir.^{27,132} Karbon tetraklorür'ün karaciğer başta olmak üzere böbrek, testis, kalp, akciğer, beyin diğer dokularda da toksik etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. CCl_4 'ün böbrekler üzerindeki toksik etkisi akut veya kronik tahribatlara yol açmaktadır.^{132,29} Hayvan deneyi modelleri ile yapılan çalışmalarında bu etkiyi serbest oksijen radikallerine aracılığı ile yaptığı gösterilmiştir. CCl_4 , lipid peroksidasyon ürünlerinde (MDA, CD ve HNEA, LPO vs) seviyelerinde artışa, buna karşılık antioksidan enzim aktivitelerinde de baskılamalara yol açtığı belirtilmektedir. Bu etkiler CCl_4 'ün sitokrom P450 enzimiyle daha toksik olan triklorometil ve triklorometil peroksit ($\text{CCl}_3/\bullet\text{CCl}_3\text{O}_2$) veya N-asetil-p-benzokinonelmin (NAPQI) serbest radikallerinin oluşumu sonucu meydana geldiği belirtilmektedir. Hepato/nefrotoksitenin ise özellikle sitokrom P450 2E1 aktivitesiyle gerçekleştiği de ileri sürülmektedir.^{133,134}

Çalışmamızda değişik literatürlerden faydalanarak Wistar albino cinsi erkek ratlara materyal metod kısmında ayrıntılı olarak belirtildiği şekilde 8 hafta boyunca haftada 3 kez intraperitoneal olarak %10'luk (%v/v) zeytinyağı içinde çözülmüş CCl_4 verilerek bu ratların böbrek dokularında serbest radikal metabolizmasında görev alan

antioksidan enzimlerden SOD, CAT, GSH-Px ve GST (antioksidan) enzim aktiviteleri ile, lipid peroksidasyonu göstergesi olarak kabul edilen TBARS (oksidan) seviyeleri araştırılmıştır. Ayrıca antioksidan bir madde olarak literatürlerde yer alan stobadin'in CCl_4 'ün böbrek dokusuna etkisini nasıl değiştirebileceği enzimatik açıdan araştırılmıştır. Bunlara ilave olarak her bir gruba ait böbrek dokularındaki histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu ile gösterilmiştir.

Böbrek dokusuna ait antioksidan/oksidan parametreler incelendiğinde Tablo 1 ve grafiklerden den de görüldüğü gibi:

SOD aktivitesi tüm gruplarda {Kontrol/ CCl_4 , Kontrol/Stob, Kontrol/Stob+ CCl_4 , CCl_4 /Stob ve CCl_4 -(Stb+ CCl_4)} kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur, sırası ile $p<0.001$, $p<0.0025$, $p<0.0001$, $p<0.0001$ ve $p<0.0025$ dir. Ancak stobadine-stobadine+ CCl_4 grupları kıyaslandığında, stobadine grubuna göre Stob+ CCl_4 grubunda SOD aktivitesinde bir düşme söz konusu olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır $p>0.05$.

Gruplar arası katalaz aktivitesi incelendiğinde bazı gruplarda kontrol grubuna göre farklı seviyelerde yükselme söz konusudur. Bu yüksek CAT aktiviteleri kontrol- CCl_4 , CCl_4 -stob ve stob-(stob+ CCl_4) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur sırası ile $p<0.01$, $p<0.0001$ ve $p<0.025$ dir. CAT aktivitesi ile ilgili olarak gruplar arası diğer karşılaştırmalar ise istatistiksel olarak anlamsız olarak tesbit edilmiştir $p>0.05$.

Glutasyon peroksidaz aktivitesi CCl_4 ve stob+ CCl_4 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir azalma gösterirken $p<0.001$ ve $p<0.005$, stobadine grubunda kontrol grubuna göre kısmi bir artış söz konusu olmuştur, ancak istatistiksel olarak anlamsızdır. . CCl_4 ile stobadin ve CCl_4 ile stob+ CCl_4 grupları incelendiğinde; stobadin

grubunda CCl_4 grubuna göre anlamlı derecede yükselme söz konusu iken stob+ CCl_4 grubunda bir yükselme olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır. Sırasıyla $p<0.01$, $p>0.05$. Öte yandan stobadine grubu ile stobadine + CCl_4 grubu kıyaslandığında stobadine grubuna göre stob + CCl_4 grubunda anlamlı bir azalma görülmektedir $p<0.0025$.

Glutasyon-s-transferaz enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna göre hem CCl_4 hem stobadine ve hem de stob+ CCl_4 gruplarında anlamlı bir yükselme görülmektedir (sırası ile $p<0.0025$, $p<0.01$ ve $p<0.001$).

TBARS seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında CCl_4 , Stobadine ve Stob+ CCl_4 gruplarında anlamlı bir artış göstermektedir $p<0.05$. Ancak diğer gruplar birbirleri ile kıyaslandığında anlamlı bir artış görülmemektedir. En belirgin artış sırası ile CCl_4 ve Stobadine + CCl_4 grubunda görülmektedir.

Çalışmamızda sekiz hafta süreyle CCl_4 verilen rat böbrek dokularında proksimal tübül mikrovillusları düzensiz, glomerül kapilleri genişlemiş gözlenirken, intraglomerüler mezengium artışı izlenmemiştir. Doğukan ve arkadaşları 0,15 ml/kg dozda 7 hafta süreyle CCl_4 verdikleri rat böbrek dokularında ışık mikroskopisi değerlendirmesi ile interstisiyel fibrosis ve inflamasyon geliştiğini göstermişlerdir.¹³⁵ Öztürk ve arkadaşlarının CCl_4 ile oluşturulan böbrek hasarında Betainin doku koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, CCl_4 1 ml/kg, 11 gün uygulamışlar ve yoğun kortikal hasar, fokal glomeroskleroz gözlemlemişlerdir.²⁷ Bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzere CCl_4 'ün böbrek dokusu hasarı üzerine farklı etkiler göstermesi CCl_4 'ün uygulama dozuna ve süreye bağlı olarak değişiklikler göstermektedir.

Böbrek dokularında ya da genel olarak CCl_4 'e maruz bırakılan ratlarda meydana gelen harabiyetlerin fizyopatolojisinde radikalik

hasar sorumlu tutulmaktadır. Kim ve arkadaşları'nın CCl₄ verilen farelerle yaptıkları bir çalışmada renal toksitesinin cinsiyet farklılığına bağlı olarak değiştiğini erkek farelerin CCl₄ nefrotoksitesine dişilere nazaran daha hassas olduklarını bildirmektedirler. Bu durumu, hepatik yetmezliğe bağlı testosteronun böbreğe daha yüksek konsantrasyonlarda ulaşması ve renal Cyp izoenzimlerini indüklemesi sonucu erkek farelerin böbreklerinin daha fazla oksidan hasara maruz kalmasıyla meydana geldiğini ileri sürmektedirler.¹³⁴

Stobadine+CCl₄ uygulanan grupta CCl₄ uygulanan gruba göre böbrek harabiyetinin daha az olduğu görülmektedir.

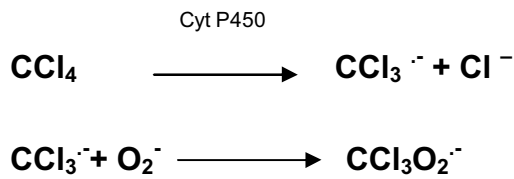
Sonuç olarak, CCl₄ böbrek glomerüllerinde ve proksimal tübül yapılarında oksidan strese bağlı olarak değişikliklere sebep olurken, stobadine uygulanması'nın antioksidan etki göstermesi beklenirken enzimatik açıdan bakıldığında hem Tablo 1 den hem de grafiklerden (3-8) görüleceği gibi SOD hariç diğer tüm enzimlerde kontrol grubuna göre anlamlı ve/veya anlamsız düzeyde yükselmelere sebep olmuştur. Ayrıca günümüzde hala lipid peroksidasyonu göstergesi olarak en sık baş vurulan oksidanlardan TBARS seviyelerinde de artışa sebep olmuştur. Buna karşılık histopatolojik bulgularda kontrol grubu ile benzer yapı göstermesi yaptığımız deneyin dikkat çekici sonuçlarındandır. Bu olay muhtemelen enzim aktivitelerinde gerek kendisi gerekse uğradığı metabolik yol sonucu açığa çıkan metabolitleri ya da CCl₄ ile oluşturabileceği muhtemel ara ürünlerce enzim aktivitelerinde baskılanmaya ve lipid peroksidasyonunda da artışlara yol açtığı ön görülebilir. Histopatolojik açıdan CCl₄'ün verdiği hasarı kontrol grubu seviyesine yakın hale getirmesi, ya kendisinin ya da metabolitlerinin lipid peroksidasyonu tarafından oluşturulan böbrek harabiyetini başka mekanizmalar aracılığı ile en aza indirerek gösterebileceği düşünülebilir; bu durumun aydınlatılması için serbest radikal metabolizmasında görev alan enzimler'in kinetik özellikleri üzerine stobadine'nin etkisinin araştırılarak aydınlatılması gerekmektedir.

Karbon tetraklorür'ün oksidatif strese bağlı akut ve kronik toksisitesi ile ilgili başta hepatik ve renal olmak üzere bir çok yayın mevcuttur. Karbon tetra klorür'ün toksik etkisi oksidatif ve hidroksi radikallerinin lipid peroksidasyonu ve başka yollarla hepatosit ve diğer hücre/doku membranı hasara uğratabileceği *invivo* / *invitro* birçok ortamlarda deneysel olarak gösterilmiştir.^{136,137,138,139,140,141,142}

Song A ve arkadaşları ratlar üzerinde CCl₄ ve geleneksel Çin tıbbında kullanılan Xylaria nigripes (XN-T) ile yaptıkları bir çalışmada, CCl₄ verilen grupta SOD, CAT, GSH-Px aktivitelerinde ve TBARS seviyelerinde bir baskılanma gözlerken, XN-T verildiğinde bu baskılanmanın ortadan kalktığını bildirmektedirler. Bu etkinin güçlü bir antioksidan özellik sergileyen XN-T'nin oksidatif stresi baskılamasından kaynaklandığına bağlamışlardır. Benzer sonuçlar bizim çalışmamızda da görülmektedir, bizim çalışmamızda kontrol ve stobadine gruplarına göre CCl₄ grubunda TBARS seviyesi yükselirken GST hariç diğer enzim aktiviteleri baskılanmıştır. Stobadine verildiğinde ise tam tersi durum sergilenerek enzim aktiviteleri artarken TBARS seviyesi CCl₄ grubuna göre düşmüştür. Bu sonuç stobadinenin CCl₄ kaynaklı oksidatif strese bağlı baskıyı antioksidan özellik sergileyerek ortadan kaldırdığını göstermektedir.¹³⁶

Yine bizim sonuçlarımıza paralel bir sonuç ta Khan RA ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada görülmektedir. Yazarlar yaptıkları çalışmada haftada iki kez olmak şartı ile 4 hafta boyunca i.p olarak 3mL/kg (%30'luk zeytin yağı içerisinde) CCl₄ verilen Sprague-Dawley erkek ratların böbrek dokularında TBARS, GGT, H₂O₂ ve NO₂⁻ seviyesinde önemli derecede bir artışın, buna karşılık antioksidan enzimlerden CAT, SOD, GST, GSR, GSH-Px aktivitelerinde azalmanın olduğunu belirtmektedirler. Bu değişimlerin yine CCl₄'ün oksidatif strese sebep olarak antioksidan sistemi baskılayıp oksidan parametreleri artırdığını ileri sürmektedirler.¹³⁹

CCl_4 kararlı olmayan baslangıç metaboliti olan triklorometil ($\text{CCl}_3^\cdot$) serbest radikalini oluştuktan sonra, lipidler ve proteinler ile kovalent bağlar oluşturarak O_2 varlığında hızla triklorometil peroksite ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$) veya hidrojen atomlarını kaybetmiş olan kloroform (HCHO) formuna dönüşür. Daha sonra sekonder olarak oluşan konjuge dien, lipid hidroperoksit ve malondialdehid gibi ürünler ile kısa zincirli karbonhidrat türevleri oluşur.



Yukarıdaki reaksiyon gereği $\text{CCl}_3^\cdot$ radikalinin oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen $\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$ radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısı olarak bilinir. Bu olayları takiben serbest radikal üretimi hücre/dokuda antioksidan savunmaları baskılar. Bunun sonucu olarak da hücre membranlarının oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı meydana gelir. ^{143,144,145}

Herhangi bir etkenle (kimyasal, travma, radyasyon, stres vs) oksidatif strese maruziyet söz konusu olduğunda, hücre ve dokuların (canlı organizmanın) fazla hasar görmemesi için organizmada mevcut olan antioksidan savunma sistemine ek olarak eksojen antioksidan maddelerin (gerekli durumlarda) alınmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Halliwell B, Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49:1341-1348.
2. Horakova L, Stolc S, Chromikova Z, Pekarova A, Derkova L, Mechanisms of hippocampal reoxygenation injury. Treatment with antioxidants, *Neuropharmacol* 1997; Feb, 36 (2): 177-184.
3. Podolsky D K, Isselbacher K J, Cirrhosis of the Liver. Harrison 's Principles of Internal Medicine. Wilson J D, Braunwald E, Isselbacher K J, Petersdorf R G. Martin J B, Fauci A S, Root R K. Editors. McGraw-Hill, New York :1991; 1340-1350.
4. Cowden WB, Lewis-Hughes PH, Clark IA, Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the free radical scavenger butylated hydroxyanisole, *Biochem. Pharmacol* 1985; 34 (19): 3601-3603.
5. Guido M, Rugge M, Leandro G et al, Hepatic stellate cell immunodetection and cirrhotic evolution of viral hepatitis in liver allografts, *Hepatol* 1997; 26: 310-314.
6. Jerry P, Liu L, Zeng M, Stamler J.S, An apoptotic model for nitrosative stress, *Biochem* 2000; 39:1040-1047.
7. Kaplan P, Matejovicova M, Mezesova V, Iron-induced inhibition of Na⁺-K⁺ ATPase and Na⁺/Ca⁺² exchanger in synaptosomes: protection by the pyridoindole stobadine, *Neurochem Res* Dec. 1997; 22 (12): 1523-1529.
8. Kvaltinova Z, Lukovici L, Machova J. Alpha 1-adrenoceptor blocking action of DH 1011. *J Pharmac* 1986; 17:187.
9. Armbrust T, Batusic D, Ringe B and Ramadari G, Mast Cells Distribution in Human Liver Disease and Experimental Rat Liver Fibrosis. Indications for Mast Cell Participation in Development of Liver Fibrosis, *J Hepatol* 1997; 26: 1042-1054.

10. Lai C.C, Huang W, Askari A, Wang Y, Differential regulation of superoxide dismutase in copper deficient rat organs, Free Radic. Biol. Med 1994; 16:613-620.
11. Aneja R, and Upadhyaya G, Ameliorating effect of Phytoestrogens on CCl₄-induced oxidative stress in the livers of male wistar rats, Artificial Cells, Blood substitutes and Biotechnol 2005;201-213.
12. Akkus I, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya 1995;13-19.
13. Fang Y.Z, Yang S, Wu G, Free radicals, antioxidants and nutrition.nutr 2002; 18:872-879.
14. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells 1997; TIBS, 22:477-481.
15. Chen S, Schopfer P, Hydroxyl-radical production in physiological reactions a novel function of peroxidase, Eur J. Biochem 1999; 260:726-735.
16. Guyton A.C. Textbook of Medical Physiology. 10th Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia ;2000.
17. Masaki N, Yamada S, Orgata, I. Ohta Y. Fujiwara, K. Enhancement of Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury by Glucagon and Insulin Treatment. Res. Exp. Med 1998; 188: 27-33.
18. Ozeki T, Funakoshi K, Iwaki K Rapid Induction of Cirrhosis by administration of Carbon-tetrachloride Plus Phospholipase D. British Journal of Experimental Pathol 1985; 66:385-390.
19. Sherlock S, Dooley J, Hepatic Cirrhosis. Disease of the Liver and Biliary System. Black well science,London 1997; 371-383.
20. Tankurt E, Karaciğer sirozu ve Komplikasyonları. İliçin G, Ünal S., Berberoğlu K, Akalın S, Süleymanlar G, Editörler. Temel İç Hastalıkları. İstanbul: Güneş Kitabevi 1996; 1114-1154.

21. Demir M, Demir Vural C, Yılmaz N. Yüksel Ş, Vural H, Sezer MT. Tek seans hemodiyalizinin çeşitli oksidatif stres markerları üzerine etkisi. *Tıp Araştırmaları Derg* 2007;5(2): 74–77.
22. Ozden M, Maral H, Akaydin D, Cetinalp P, Kalender B. Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clin Biochem* 2002; 35: 269-273.
23. Dursun E, Dursun B, Suleymanlar G, Ozben T. Effect of haemodialysis on the oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2005; 42: 123-128.
24. Rincon AR, Covarrubias A, Pedraza-Chaverri J, Poo JL, Armendáriz-Borunda J, Panduro A. Differential effect of CCl₄ on renal function in cirrhotic and non-cirrhotic rats. *Exp. and Toxicol. Pathol* 1999; 51: 199-205.
25. Rivera-Huizar S, Rincón-Sánchez AR, Covarrubias-Pinedo A, Islas-Carbajal MC, Gabriel-Ortiz G, Pedraza-Chaverri J, Alvarez-Rodríguez A, Meza-García E, Armendáriz-Borunda J.:Renal dysfunction as a consequence of acute liver damage by bile duct ligation in cirrhotic rats. *Exp. and Toxicol. Pathol* 2006; 58(2-3): 185-195.
26. Manna P, Sinha M, Sil PC. Aqueous extract of Terminalia arjuna prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders.*BMC Pharmacol* 2005 Jan 31;5(1):2.
27. Oztürk F. Ucar M, Ozturk İÇ, Vardi N, Batcioglu K. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. The histologic findings of this study were presented during the VIth National Histology and Embryology Congress; 2002 September 12–15; Istanbul, Turkey.
28. Rajesh MG, Latha MS. Protective activity of Glycyrrhiza glabra Linn. on carbon tetrachloride-induced peroxidative damage *School of Biosciences* 2004; 36(5): 284-287.

29. Ogeturk M, Kus I, Kavakli A, Oner J, Kukner A, Sarsilmaz M. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration Cell Biochem Funct 2005; 23: 85-92.
30. MICROMEDEX (R) Healthcare Series Vol. 146 expires 12/2010
31. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania ;2005.
32. Calbreath, D.F. Anathomy and physiology of the kidney. Clinical Chemistry: A Fundemental Textbook. Editor: D.F. Calbreath, W.B. Saunders Company, Philedelphia, 1992; 11:240-248.
33. Ozan H. Ozan Anatomi. 1. baskı, Ankara, Nobel Tıp Kitabev 2004; 293-297,
34. Rang, H.P, Dale, M.M., Ritter, J.M. The kidney. Pharmacology. Editörs: H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, Chuchill Livingstone 1999; 20:351-369.
35. Ganong, W.F. Formation and Excretion of Urine. Review of Medical Physiology, Editor: W.F. Ganong, Lange Medical Publications, California:1985; 8:572-574.
36. Renal Anatomy and Circulation, (03.05.2010 okundu), southhill.vsb.bc.ca/Departments/BEST/.../Renal-Anatomy.pdf
37. Murathanoğlu O, Histoloji. İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul; 1996.
38. Janquera LC, Carneiro J, Kelley OR. Basic Histology. Aytekin Y Solakoğlu S , Ahışalı B (Çev),8.Basım, Barış Kitapçıl 1998 ;359-375.
39. Am J Physiol Renal Physiol 2005 Dec ;289 (6):F1346-66 15914776 (P,S,G,E,B) Cited:7.
40. Coe, F.L. ve Brenner, B.M. Disorders of the Kidney and Urinary Tract. Harrison's Principles of Internal Medicine. Editors: E.Braunwald, K.J. Isselbacher, R.G. Petersdorf, J.D. Wilson, J.B. Martin, A.S. Fauci. McGraw-Hill Book Company, Ljubljana :1987; 6:1139-1155.

41. Ives, H.E. ve Warnock, D.G. Diuretic agents. Basic and Clinical Pharmacology. Editor: B.G. Katzung, Prentice Hall Int. Inc 1995; 15:230-249
42. Preuss, H.G., Podlasek, S.J., Henry, J.B. Evaluation of Renal Function and Water, Electrolyte, and Acid-Base Balance. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Editor: J. B. Henry, W.B. Saunders Company, Philadelphia :1991;7:119-139
43. Robinson, D.C. ve Millares, M. Acute and Chronic Renal Diseases. Clinical Pharmacy and Therapeutics, editörler: E.F. Herfindal, D.R. Gourley, L.L.Hart. Williams and Wilkins USA ;1992
44. Sies H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. Am. J. Med 1991; 31-38.
45. Floyd RA. DNA Damage and Repair in "Oxidative Damage and Repair".editor: Davies K.J.A. Pergamon Press 1992; 175-180.
46. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. Redox Report 2004 ;9(3), 145- 152
47. Sies H. Oxidants and antioxidants. Exp Physiol 1997; 82: 291–295.
48. Ronco C, La Greca G.: Vitamin E bonded membrane, a further step in dialysis optimization. Contrib Nephrol 1999; 127: 1-31.
49. Jaques L, Goy J, Rozensztajn L. et al: Lipid peroxidation and protective enzymes during myocardial infarction. Chim Acta 1989;196:119-26 .
50. Rice-Evans CA, Diplock AT.Current status of antioxidant therapy. Free Radic Biol Med 1993; 15: 77-96.
51. Bellomo G, Orrenius S. Altered ion and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. Hepatol 1985;5: 876-82.
52. Cheeseman KH, Slater TF. An Introduction to Free Radical Biochemistry. Brit. Med. Bulletin1993; 14: 481-493.

53. Maher P , Schubert D. Signaling by Reactive Oxygen Species in the Nervous System. *Cell. Mol. Life Sci* 2000; 57: 1287-1305.
54. Gutteridge JM, Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford :1991; 1-276.
55. Gutteridge JM, Halliwell B. *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease*. Oxford University Press ;1994.
56. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Med* 1999; 26: 202–226.
57. Podrez EA., Abu-Soud HM., Hazen SL.: Myeloperoxidase generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Med*.2000; 28:1717–1725.
58. Yao T, Esposti SD, Huang L, Amon R, Spangenberg A, and Zern MA. Inhibition of carbon tetrachloride induced liver injury by liposomes containing Vitamin E. *Am J Physiol* 1994; 30: 476-84.
59. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, An overview. *Methods Enzymol* 1990; 186:1-85.
60. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radical in Biology and Medicine*. Third ed, Oxford University Press, Oxford 2000; 160-5.
61. Beckman K.B, Ames B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-81.
62. McCormick M, Denning G.M, Reszka GM, Bilski P, Buettner GR, Rasmussen GT, Rallsback MA, Britigan BE. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. *Biochem J* 2000; 350: 797-804.
63. Basaga HS, Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 989-98.
64. Sodergren E. *Lipid peroxidation in vivo*, Uppsala University, Uppsala; 2000.

65. Nishiyama Y, Ikeda, H, Haramaki N. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998; 135:115.
66. Pieper GM, Siebeneich W, More-Hilton M, Roza AM. Reversal by L-Arginin of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic rat. *Diabetol* 1997; 40: 910-5.
67. Agarwal R, Chase SD. Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of malonaldehyde in biological samples. *J Chromatogr B* 2002; 775:121-6.
68. Evans P, Halliwell B, Micronutrients: Oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 85:67.
69. Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 259-74.
70. Davies MJ. Singlet oxygen mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. and Biophy. Res. Com* 2003; 305: 761-770.
71. Kiryu C, Makiuchi M, Miyazaki J, Fujinaga T, Kakinuma K. Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase H₂O₂ chloride system. *FEBS Lett* 1999; 443: 154-158.
72. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-28.
73. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stres. *J Biol Chem* 1997; 272: 213-6.
74. Hausladen A, Stamler JS. Nitrosative Stress. *Methods in Enzymol* 1999; 300:389-395.
75. Haddad JJ. Oxygen Sensing and Oxidant/Redox-Related Pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 316:969–977.
76. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Second ed. Clarendon Press , Oxford: 1983; 19: 234

77. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 2000; 130:1447-54.
78. Uchida K, 4-Hydroxy-2-Nonenal. A product and mediator of oxidative stres. *Progr Lip Res* 2003; 569:1-26.
79. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology & Med*,2000; 28: 1685–1696.
80. Halliwell B, How to characterize a biological antioxidant, *Free radic. Res. Commun*,1990; 1: 1-32.
81. Splettstoesser WD, Werner SP. Oxidative stress in phagocytes 'The Enemy Within'. *Microscopy Research And Technique* 2002; 57:44-55.
82. Boyunağa H, Çelik C. Serbest radikaller ve hücresel denge. *Bilim Teknik Derg* 1996; 347: 98-100.
83. Matsuo M, Kaneko T.The Chemistry of Reactive Oxygen Species and Related Free Radicals. Edit.Zsolt Radak. (Free Radicals in Exercise and Aging). *Human Kinetics* 2000; 1-33.
84. Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffman D.Mossman TB, Kamp WD, Athar M. Glutathione Redox System in Oxidative Lung Injury. *Crit. Rev. in Toxicol* 1999; 29: 543-568.
85. Champe P.C, Harvey R.A, Glikozaminoglikanlar,Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E, Lippincott's illustrated reviews serisinden, *Biyokimya*, İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabev, İstanbul: 1997; 147-156.
86. Meister A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res Suppl* 1994; 954:1969-75.
87. Zimmerman HJ, The adverse effects of drugs and other chemicals in the liver hepatotoxicity, NewYork, Appleton Century Crofts; 1978.
88. Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S. Sontakke A, Ingole D, Reduced glutathione: Importance of specimen collection, *Indian Journal of Clinical Biochem* 2005; 20(1):150-152.
89. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 23-30.

90. Harris E.D, Regulation of antioxidant enzymes, *Faseb. J.* 1992; 6: 2675-2683.
91. McCotd JM, Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. *Annals of Internal Med* 1978; 89: 122- 128.
92. Powers SK, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: 987-97
93. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-48.
94. Frei B, Reactive Oxygen Species and Antioxidants Vitamins mechanisms of action, *The American Journal of Med* 1994; 97: 5-13.
95. Shidhu P. Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biol Interact* 2004; 150:199-209.
96. Canuto RA, Muzio G, Maggiora M, Biocca ME, Dianzani MU, Glutathione S Transpherase, alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities during diethylnitrosamine carcinogenesis in rat liver, *Cancer Lett* 1993; 68:177-183.
97. Lowry O. Rosenbraugh N, Farr L, Randall R, Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem* 1951; 182:265-275.
98. Onat T, Emerk K, Karbohidratlar Temel Biyokimya, Emerk K. Editör. 1. basım. İzmir: saray; 1996. 289-409.
99. Liebert J, Matlawska I, Bylka W, Murias M. Protective effect of aquilegia vulgaris on APAP induced oxidative stress in rats. *J Ethnopharm* 2005; 97:351-8.
100. Guemori L, Arthur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cunny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37:1932-7.

101. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species; antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31 (11): 1287-312
102. Felix K, Rockwood LD, Pretsch W, Nair J, Bartsch H, Bornkamm GV, Janz S. Moderate G6PD deficiency increases mutation rates in the brain on mice. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(7): 663-73.
103. Ichikawa et al. Renal antioxidant enzymes. *Kidney Int* 1994; 45:1-9.
104. Steinberg D. Antioxidants and atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84: 1420-25.
105. Repine J. Oxidant-Antioxidant balance: Some observations from studies of ischemiareperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am J Med* 1991; 91: 30-45
106. Hara T, Miyai H, Iida T et al. Aggravation of Puromycin aminonucleoside nephrosis by the inhibition of endogenous superoxide dismutase. *Proc XIth Int Congr Nephrol* 1990; 442.
107. Voest E, Vreugdenhil G, Marx M. Iron-chelating agents in non-iron overload conditions. *Ann Intern Med* 1994; 120: 490-99.
108. Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, et al. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomerul from oxidant injuries. *Kidney Int* 1991; 40: 229-301.
109. Oberley TD, Oberley LW, Slattery AF, et al. Immunohistochemical localization of antioxidant enzymes in adult syrian hamster tissue and during kidney development. *Am J Pathol* 1990; 137: 199-214.
110. Stolic S, Horakova L, Effect of stobadine on postischemic lipid peroxidation in the rat brain. In *New Trends in Clinical Pharmacol* 1988;59-63.
111. Kagan VE, Tsuchiya M, Serbinova E, Packer L, Sies H. Interaction of the pyridoindole stobadine with peroxy, superoxide and chromanoxyl radicals. *Biochem. Pharmacol* 1993; 45(2): 393-400.

112. Stasko A, Ondrias K, Misik V, Szöchova H. and Gergel D, Stobadine: a novel scavenger of free radicals. *Chem* 1990; 44: 493-500.
113. Steenken S, Sundwist A. R, Jovanovic S. V, Crockett R. and Sies H, Antioxidant activity of the pyridoindole stobadine: pulse radiolytic characterization of one electron oxidized stobadine and quenching of singlet molecular oxygen, *Chem. Res. Toxicol* 1992; 5:355-360.
114. Horakova L, Ondrejickova O, Uraz V, Lukovic L, Juranek I, Short cerebral ischemia and subsequent reperfusion and treatment with stobadine. *Experientia* 1992 Sep 15 ; 48(9):872-874.
115. Synder R, Rews L, Casaratt and Doull's Toxicology, Pergamon Press 1992; 681-772.
116. Mirossay L, Kohut A, Antiulcerogenic effect of pentacaine, chlorpromazine and stobadine on ethanol and indomethacin induced stomach lesions in rats. *Physiol. Res* 1991;40(4): 441-444.
117. Mirossay L, Kohut A, Effect of stobadine on indomethacin and ethanol induced stomach lesions and gastric secretion. *Physiol. Res* 1991; 40:437-440.
118. Chorvatovicova and Bauer V, Stobadine: Inhibitor of cyclophosphamide-induced micronuclei in mice. *mutagenesis* 1994; 9:241-244.
119. Drabikova K., Pecivova J., Nosal R., Effect of stobadine on stimulated isolated mast cells. *Agent Actions* 1998; 23(3-4): 188-190.
120. Horakova L, Stolc S, Antioxidant and pharmacodynamic effects of pyridoindole stobadine. *Gen Pharmacol* 1998 May; 30 (5): 627-38.
121. Kallay Z. Soltes L. Trnovec T, Pharmacokinetics of stobadine and of the sum of its metabolites in rats during repeated administration. *Biopharm. Drug. Dispos* 1991 Apr;12(3): 201-205.
122. Necas J, Bartosíková L, Benes L. Janostíková E, Bartosík T, Klusáková J, Florian T, Frydrych M, Jurica J, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub* 2005 Dec;149(2):385-388.

123. Zhao L. Glutathione a ubiquitous thiol. Free radical and radiation biology graduate program. Iowa; 2001.
124. Synder R, Rews L. Casarattand Doull's Toxicology. Pergaman Press1992; 681-772.
125. Durak I, Canbolat O, Kavutcu M, Öztürk HS, Yurtarlanı Z. Activities of total, cytoplasmic and mihochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patient with lung cancer. J Clin Lab Anal 1996; 10: 17-20.
126. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70: 158-169.
127. Aebi H. Catalase. In: H.U. Bergmeyer Ed: Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York and London 1974; 673-677
128. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 1974;249:7130– 9.
129. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent J Biol Chem 1951; 182: 265-275.
130. Rozga J. Animal models of liver regeneration, İn W.W. and D.G.Souba (Eds.), Surgical Research, Wilmore California, Academic Press 2001;703-707.
131. Abraham P, Wilfred G, Cathrine SP. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. Clin Chim Acta 1999; 289: 177-179.
132. Tirkey N, Pilkhwal S, Kuhad A, Chopra K. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbontetrachloride in rat liver and kidney. BMC Pharmacol 2005; 5: 2.
133. Ogeturk M, Kus I, Colakoglu N, Zararsiz I, Ilhan N, Sarsilmaz M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. J Ethnopharmacol 2005; 97: 273-280.

134. Kim YC, Yim HK, Jung YS, Park JH, Kim SY. Hepatic injury induces contrasting response in liver and kidney to chemicals that are metabolically activated: Role of male sex hormone. *Toxicol Appl Pharma* 2007; 223: 56-65.
135. Doğukan A, Akpolat N, Çeliker H, İlhan N, Bahçecioglu HI, Günel AI. Protective effect of interferon on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity. *J Nephrol* 2003; 16: 81-84.
136. Song A, Ko HJ, Lai MN, Ng LT. Protective effects of Wu-Ling-Shen (*Xylaria nigripes*) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010 Nov 26. [Epub ahead of print].
137. Singab AN, Ayoub NA, Ali EN, Mostafa NM. Antioxidant and hepatoprotective activities of Egyptian moraceous plants against carbon tetrachloride-induced oxidative stress and liver damage in rats. *Pharm Biol* 2010 Nov;48(11):1255-64. Epub 2010 Sep 14.
138. Park CM, Cha YS, Youn HJ, Cho CW, Song YS. Amelioration of oxidative stress by dandelion extract through CYP2E1 suppression against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in Sprague-Dawley rats. *Phytother Res* 2010 Sep; 24(9):1347-53.
139. Khan RA, Khan MR, Sahreen S, Bokhari J. Prevention of CCl₄-induced nephrotoxicity with *Sonchus asper* in rat. *Food Chem Toxicol* 2010 Aug-Sep;48(8-9):2469-76. Epub 2010 Jun 13.
140. Aranda M, Albendea CD, Lostalé F, López-Pingarrón L, Fuentes-Broto L, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, Pérez-Castejón MC, García JJ. In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline. *J Pineal Res* 2010 Aug;49(1):78-85. Epub 2010 May 27.
141. Khan RA, Khan MR, Sahreen S. Evaluation of *Launaea procumbens* use in renal disorders: a rat model. *J Ethnopharmacol* 2010 Mar 24;128(2):452-61. Epub 2010 Jan 21.
142. Foulis PR., Sandford BH., Gottfried M., Drug induced morphologic changes in the liver. *Ann. Clin. Lab. Sci* 1998;18: 215-228.

143. Recknagel R., Glende EA., Dolak JA., Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharma Ther* 1989; 43: 139-154.
144. Slater TF., Free radicals as reactive intermediates in injury., Snyder IR., Parke DV., Kocsis JJ., Jollow DJ., Gebson GG., Witmer CM (Eds), *Biological Reactive Intermediates II, Chemical Mechanisms and Biological Effects*. New York, Plenum Pres 1982;575-589.
145. Poli G., Liver damage due to free radicals, *Free Radicals in Medicine*, Cheeseman K H, Slater T F (Editorler), *British Medical Bulletin*, London;1993.

7. ÖZET

KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) VERİLEN RAT BÖBREK DOKULARINDA OKSİDAN /ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada CCl₄' ün rat böbrek dokularında serbest radikal metabolizmasında rol alan antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-s-transferaz (GST) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu indeksi olarak bilinen tiyobarbutirik asitle reaksiyon veren aldehit türevleri (TBARS) seviyeleri araştırıldı. Ayrıca indol türevi olan ve antioksidan özelliğe sahip olduğu belirtilen Stobadine'nin koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

Çalışmada 250-300 gr ağırlığında, wistar albino cinsi toplam 40 adet erkek rat, rastgele kontrol (K), Stobadin(S), CCl₄ (C) ve Stobadin + CCl₄ (SC) olmak üzere 4 eşit gruba bölündü.

CCl₄ 8 hafta boyunca 03 (1. hafta), 0.7 (2. hafta) ve 6 hafta boyunca da 1 mL/kg şeklinde artan dozlarda intraperitoneal olarak; stobadin ise 8 hafta boyunca 3 doz/hafta oral olarak 24.7mg/kg/gün verilerek gerçekleştirildi. Sekiz hafta sonunda ratlar anestezi altında feda edilerek böbrek dokuları çıkartıldı. Böbrek dokusu üzerine CCl₄'ün muhtemel oksidan etkisi ile stobadin'in muhtemel antioksidan etkisi enzimatik ve histopatolojik olarak incelendi.

CCl₄ grubunda SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken (p<0.001, p<0.01 ve p<0.01) GST aktivitesi ve TBARS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir (p<0.025 ve p<0.05). Bu

verilere paralel olarak CCl₄ grubunda kontrol grubuna göre histopatolojik olarak önemli değişiklikler gözlenmiştir.

Stobadine grubunda ise SOD aktivitesi dışında CAT, GSH-Px ve GST enzim aktiviteleri ile TBARS seviyesi kontrol grubuna göre yüksek olarak bulunmuştur, (istatistiksel olarak GST ve TBARS seviyelerindeki değişiklik anlamlıdır $p<0.01$ ve $p<0.05$), SOD aktivitesi ise anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur ($p<0.025$).

Stobadine + CCl₄ verilen grupta ise, SOD ve CAT enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük seyretmesine karşılık ($p<0.001$), GST aktiviteleri ile TBARS seviyeleri yüksek olarak bulunmuştur ($p<0.001$ ve $p<0.05$). GSH-Px aktivitesinde ise anlamlı derecede düşme gözlenmiştir ($p<0.005$).

Antioksidan potansiyele sahip olduğu belirtilen stobadine'nin yaptığımız deneyde SOD enzimi aktivitesinde azalmaya, buna karşılık GST aktivitesinde artışa yol açtığı; GSH-Px ve CAT aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca Stobadine sanki oksidan bir ajan gibi TBARS seviyesinde de artışa sebep olmuştur. Enzimatik etkinin tersine, histopatolojik incelemelerde CCl₄'ün etkisi stobadine uygulaması ile hücresel boyutta kontrol seviyesine yakın düzelmelere sebep olmuştur. Bu sonuç bizlere stobadine'nin başka mekanizmalarla etki gösterebileceğini öngörmektedir.

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF OXIDAN/ANTIOXIDANT STATUS TREATED WITH CCl₄ IN RAT KIDNEY TISSUES

To investigate the free radical metabolising enzyme activities such as SOD, CAT, GSH-Px and GST and as known index of lipid peroxidation, thiobarbituric acid rective substances (TBARS) and free radical scavenger properties of stobadine were studied treated by CCl₄ in rat kidney tissues.

Forty male Wistar-Albino rats weighing approximately 250-300 grams were used in the study. The rats were randomly divided into equal 4 groups such as Control (K), Stobadine (S), Carbon tetrachloride (C) and Stobodine+ CCl₄(C+S)

CCl₄ was given intraperitonealy in sequentially increasing doses 0.3, 0.7 and 1.0mL/kg body weight for 8 weeks period. Stobadine treatment was applied orally at 3 dose/week 24.7 mg/kg/day for 8 week priods. The animals were sacrificed after 8 week of treatment and kidney tissues were removed.

The level of TBARS as a lipid peroxidation index was measured in kidney homogenates. Also, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione-S-transferase (GST) in kidney tissues were determined.

In CCl₄-treated group, the level of TBARS was significantly increased ($p < 0.05$) compared to controls. The enzyme activities of SOD, CAT and GSH-Px in kidney were significantly decreased ($p < 0.001$, $p < 0.01$

and $p < 0.01$ respectively), but GST activities were significantly elevated ($p < 0.025$) in comparison with controls.

While SOD activities were significantly decreased ($p < 0.025$) GST activities and TBARS levels were significantly elevated ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively) in stobadine group versus controls. However no meaningful differences were found CAT and GSH-Px activities.

In CCl_4 +Stobadine -treated group, the changes in the levels of TBARS and GST activities were significantly increased ($p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively) compared to controls, but SOD and GSH-Px activities were significantly lowered ($p < 0.001$ and $p < 0.005$). No meaningful differences were found CAT activities.

Oxidative stress may be a major mechanism for the toxicity of CCl_4 . Stobadine served a protective effect against CCl_4 toxicity by histopathologically, in contrast increased the lipid peroxidation. These results suggest that the protective effects of stobadine against CCl_4 toxicity in kidneys is due at least partly to its antioxidant properties, scavenging CCl_4 associated free radicals. Additional kinetic research may be necessary to determine effects of the stobadine on the antioxidant enzymes activities via carbon tetrachloride exposure.

9. EKLER

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmam aşamasında; ihtiyacım olduğunda daima bana zaman ayırarak değerli bilgi ve görüşlerini benden esirgemeyen, karşılaştığım güçlükleri aşmamda bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İlgisini ve desteğini her zaman gördüğüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU'na ve tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde antioksidan olarak kullandığım Stobadin'i temin eden Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Çimen KARASU'ya; Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Neşe LORTLAR UÇANKUŞ'a; Tez çalışma aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana moral veren canım arkadaşlarım Dr.Tülay ŞAHİN, Dr. Canan YILMAZ DEMİRTAŞ ve Dr. Seda DUYGULU DEVAY'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Yaşamım boyunca emeklerini ve desteklerini hep hissettiğim ve benim için her şeyin en iyisini dileyen anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Yarına hep umutla bakmamı sağlayan, her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Mustafa KİTİZ, canım çocuklarım Ömer ve Zeynep Nihan iyi ki varsınız.

Dr. Bedriye KİTİZ



ETİK KURUL RAPORU
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Kararları

21/03/2007

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/12. 3378
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Orhan CANBOLAT
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-07.005 kod numaralı ve “Karbon tetra klorürle siroz oluşturulan ratlarda serbest radikal metabolizmasının değerlendirilmesi; Stobadinin antioksidan etkisi” başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-07.005 and entitled “Evaluation of free radicals metabolisms in carbon tetra chlorid induced cirrhosis in rat liver; and antioxidant effect of stobadine” is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

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

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU

Uzman Dr.Seyda DİKER

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Bedriye

Soyadı : KİTİZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya, 26.03.1973

Eğitimi:

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 1996

Malatya Lisesi, Malatya, 1990

Atatürk Ortaokulu, Malatya, 1987

Fırat İlkokulu, Malatya, 1984

Yabancı Dili : İngilizce (ÜDS:63.75)