

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**RATLARDA GENTAMİSİN İLE OLUŞTURULAN BÖBREK
HASARI ÜZERİNE BENFOTİAMİN VE KOENZİM Q10’NUN
ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Alperen ÜSTÜNER

Danışman

Doç. Dr. Dilara KAMAN

2015

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez yüksek lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Neyin İLHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak

kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Dilara KAMAN

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Doç. Dr. Dilara KAMAN

Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tezimin hazırlanması sürecinde bilgisinden, tecrübelerinden faydalandığım ve bu aşamalar boyunca hep desteğini gördüğüm değerli Danışman hocam Doç. Dr. Dilara KAMAN'a

Anabilim dalı başkanımız saygıdeğer Prof. Dr. Nevin İLHAN hocama

Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyeleri olan, Prof. Dr. Necip İLHAN, Prof. Dr. Ferit GÜRSU, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU hocalarıma

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve çalışmama yardımcı olarak katkıda bulunan saygıdeğer Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU hocama ve Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU hocama

Arş. Gör. Nalan KAYA'ya, Arş. Gör. Solmaz SUSAM'a, Arş. Gör. Musa YILMAZ'a, Arş. Gör. Fatih GÜL'e ve Arş. Gör. Füsun ERHAN'a

Arkadaşlarım Yusuf DÖĞÜŞ, Yasemin KAYAOĞLU, Songül AY ve Osman Fatih YILMAZ'a

Çalışmama sağladığı kaynak sebebiyle Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi(FÜBAP)'ne

Ve sevgili aileme

Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFAS	I
ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİL LİSTESİ	VI
TABLO LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	IX
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Genel Bilgiler	8
3.1.1. Böbrek Histolojisi ve anatomisi	8
3.1.2. Böbrek Fonksiyonları	12
3.1.1.1. İdrar Oluşumu	12
3.1.1.2. Vücuttaki Sıvı ve Elektrolit Dengesinin Korunması ve Sürdürülmesi	14
3.1.1.3. Metabolik Atık Ürünlerinin Atılımı	15
3.1.2. Böbrek Yetmezliği	16
3.1.2.1. Kronik Böbrek Yetmezliği	16
3.1.2.2. Akut Böbrek yetmezliği	17
3.1.2.3. İlaça bağlı akut böbrek yetmezliği	17
3.1.2.4. Aminoglikozitler	18
3.1.2.5. Aminoglikozitlerin Sebep Olduğu Nefrotoksisite ve Akut Böbrek Yetmezliği	19
3.1.3. Gentamisin	20
3.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stress	22
3.2.1 Serbest Radikaller	22
3.2.2. Oksidatif Stress	23
3.3. Glutasyon	27
3.4. Lipid peroksidasyonu	28
3.5.Koenzim Q10	30

3.6. Benfotiamin	31
3.7. Böbrek hasarı molekülü	33
3.8. Tümör Nekroz Faktör- α	35
4. GEREÇ ve YÖNTEM	37
4.1. Deney Hayvanları	37
4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel İşlemler	38
4.3. Biyokimyasal Analiz	39
4.3.1. Malondialdehit Tayini	39
4.3.2. Glutasyon tayini	40
4.3.3. KİM-1 molekülü tayini	42
4.3.4. TNF- α Molekülü Tayini	43
4.3.5. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	44
4.4. Böbrek histopatolojisi	44
4.4.1. TUNEL Metodu	45
4.5. İstatiksel Analizler	47
5. SONUÇLAR	48
5. 1. Gruplara ait vücut ağırlık değerleri	48
5. 2. Biyokimyasal Parametreler	48
5. 2.1. Na, K, Üre ve Kreatinin değerleri	48
5. 2.2. Serum MDA ve Glutasyon düzeyleri	50
5.2.4. Histokimyasal Bulgular	55
5.2.4.1. TUNEL Bulguları	55
6. TARTIŞMA	62
7. KAYNAKLAR	72
8. ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Böbreğin yapısı	8
Şekil 2.	Nefron yapısı ve kan damarları ile bağlantısı	10
Şekil 3.	İdrar oluşumu aşamaları	13
Şekil 4.	Gentamisin kimyasal yapısının açık formülü	20
Şekil 5.	Glutasyon (GSH) kimyasal yapısı	28
Şekil 6.	(a) Benfotiaminin ve (b) Tiaminin Kimyasal Yapısı	32
Şekil 7.	Kreatinin düzeyi	49
Şekil 8.	MDA düzeyi	51
Şekil 9.	Redükte Glutasyon Düzeyi	51
Şekil 10.	Total Glutasyon Düzeyi	52
Şekil 11.	TNF- α düzeyleri	53
Şekil 12.	KIM-1 düzeyleri	53
Şekil 14.	Kontrol grubunda böbrek korteksinde yer alan glomerulus (siyah ok), proksimal (turuncu ok) ve distal (mavi ok) tübüller ve bu yapıların bazal membranları normal olarak ayırt edilmekte.	56
Şekil 15.	Sham grubunda böbrek korteksinde yer alan glomerulus (ok) ve tübüller normal yapıda gözlenmekte. Masson'nun Üçlü Boyaması x200	56
Şekil 16.	Gentamisin uygulanan grupta, kortikal tübüllerde belirgin nekroz, tübül lümenlerinde eozinofilik sitoplazmalı ve heterokromatik çekirdekli hücre dökülmeleri (ok).	57
Şekil 17.	Gentamisin uygulanan grupta, medullar bölgede yer alan tübüllerde hyalen benzeri madde birikimi (ok).	57
Şekil 18.	Gentamisin + Benfotiamin uygulanan grupta, medullar tübüllerde az miktardaki hyalen benzeri madde birikimi.	58
Şekil 19.	Gentamisin + CoQ10 uygulanan grupta kortekste yer alan nekroze tübüller	58
Şekil 20.	Kontrol grubunda +1 TUNEL pozitifliği ayırt edilmekte.	59
Şekil 21.	Gentamisin uygulanan grupta böbrek dokusundaki +3 TUNEL pozitifliği.	59

Şekil 22. Gentamisin uygulanan grupta böbrek korteksindeki +3 TUNEL pozitifliği.	60
Şekil 23. Gentamisin + Benfotiamin uygulanan grupta +1 TUNEL pozitifliği.	60
Şekil 24. Gentamisin + CoQ10 uygulanan grupta +2 TUNEL pozitifliği.	61

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Yaygın reaktif türler	22
Tablo 2.	Oksidan Kaynakları ve Antioksidan Savunma Sistemleri	24
Tablo 3.	Endojen ve Eksojen Antioksidanlar	26
Tablo 4.	Deney Hayvanlarına Verilen Yemin İçeriği	38
Tablo 5.	Histolojik takip serileri	44
Tablo 6.	TUNEL Boyama basamakları	46
Tablo 7.	TUNEL boyama yaygınlığının derecesi	46
Tablo 8.	Gruplara ait vücut ağırlığı ortalamaları	48
Tablo 9.	Serum Na, K, üre ve kreatinin değerleri	48
Tablo 10.	Serum MDA ve Glutasyon düzeyleri	50
Tablo 11.	Sıçanlardan alınan kandan ölçülen KİM-1 ve TNF- α düzeyleri	52
Tablo 12.	Tüm Gruplarda KİM-1 ile diğer biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon	54

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ABY	: Akut Böbrek Yetmezliği
ADH	: Antidiüretik Hormon
ATP	: Adenozin Trifosfat
BFT	: Benfotiamin
BUN	: Kan üre azotu
Ca⁺²	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
Cl⁻³	: Klor
CoQ10	: KoenzimQ10
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ETZ	: Elektron Tranport Zinciri
FÜBAP	: Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi
GFH	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GM	: Gentamisin
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
H⁺	: Hidrojen
H₂O₂⁻	: Hidrojen peroksit
HCO₃⁻	: Bikarbonat

HRP	: Horseradish peroxidase
İ.P	: İntraperitoneal
K⁺	: Potasyum
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
KIM-1	: Böbrek Hasar Molekülü
MDA	: Malondialdehit
Mg⁺	: Magnezyum
Na⁺	: Sodyum
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NH₃	: Amonyak
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
OH⁻	: Hidroksil Radikali
OS	: Oksidatif stres
PBS	: Fosfat tamponu
PO₄⁻³	: Fosfat
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SR	: Serbest Radikaller
TMB	: Tetramethylbenzidine
tmTNF	: Transmembran tip-2 polipeptid prekürsörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör

1. ÖZET

Gentamisin (GM), gram negatif enfeksiyonların tedavisinde günlük klinik uygulamalar içinde sık olarak kullanılan aminoglikozit antibiyotiklerin bir türüdür. KoenzimQ10 (CoQ10), endojen bir antioksidan olup serbest radikallere karşı koruyucu etkiye sahiptir. Benfotiamin (BFT) ise tiamin vitamininin yağda eriyen bir türü olarak bilinmektedir. Çalışmamızda gentamisine bağlı olarak oluşan nefrotoksisiteye karşı koenzim Q10 ve benfotiamin'in koruyucu etkinliklerini tespit etmek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 35 adet Wistar albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar beş gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu, ikinci grup sham grubu olarak belirlendi. Üçüncü grupta ki her bir sıçana 80 mg/kg/gün gentamisin intraperitoneal (i.p) yolla verildi. Dördüncü grupta her bir sıçana 80 mg/kg/gün gentamisin ile birlikte 10 mg/kg/gün CoQ10 i.p yolla verildi. Beşinci grupta ise her bir sıçana 80 mg/kg/gün gentamisin i.p yolla ve beraber 100 mg/kg/gün benfotiamin oral gavaj yoluyla verildi. Gentamisin, CoQ10 ve BFT'nin sekiz gün uygulanmasının ardından kan örnekleri alınıp, ötenazi sonrası böbrek dokuları çıkarıldı. Alınan kan örneklerinden Kidney Injury Molecule – Böbrek Hasar Molekülü (KIM-1) ve Tümör Nekroz Faktör- α düzeyleri (TNF- α) ELISA yöntemi ile, glutatyon ve malondialdehit (MDA) düzeyleri HPLC yöntemi ile, üre ve kreatinin değerlerinin analizi ise otoanalizörler ile yapıldı. Histopatolojik incelemeler için böbrek dokuları TUNEL boyama yapılarak histopatolojik olarak değerlendirildi.

Serum kreatinin, üre, KIM-1 ve MDA düzeyleri gentamisin verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yükselmiştir (sırasıyla; $P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.005$, $P<0.0001$). Gentamisin ile birlikte koenzim Q10

uygulanan ratlarda serum kreatinin ve KIM-1 düzeyleri azalsa da bu istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı, ancak serum MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($P<0.001$). Gentamisin ile birlikte benfotiamin uygulanan ratlarda ise serum kreatinin, üre, KIM-1, TNF- α ve MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalırken (sırasıyla; $P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.0001$, $P<0.0001$), total ve redükte glutatyon değerleri yükselmiştir ($P<0.0001$). Histopatolojik olarak değerlendirildiğinde sadece gentamisin uygulanan gruba ait böbrek dokusunda kortekste yer alan tübüllerde oldukça belirgin nekroz görüldü. Gentamisin ile birlikte benfotiamin uygulanan grupta kortekste tübüllerde nekrozun oldukça azaldığı tespit edildi. Gentamisin ile birlikte koenzim Q10 uygulanan deneklere ait böbrek dokularında kortikal tübüllerdeki nekroz sadece gentamisin uygulanan gruba göre azalmakla birlikte benfotiamin grubuna göre belirginliğini korumaktaydı.

Sonuç olarak bu çalışma benfotiamin ve koenzim Q10'nun gentamisin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruma sağladıklarını, bunu da muhtemelen gentamisine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunu azaltarak ve oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstererek gerçekleştirdiğini göstermektedir. Benfotiaminin, gentamisine bağlı gelişen nefrotoksisiteye karşı koenzim Q10'a göre daha iyi koruma sağladığı, bu çalışmada gerek biyokimyasal gerek histopatolojik olarak gösterilmiştir. Antibakteriyel ilaç olarak gentamisinin klinik kullanımında özellikle benfotiaminin de birlikte uygulanması nefrotoksik yan etkileri engellemek için bir alternatif olabilir.

Anahtar Kelimeler: Gentamisin, Nefrotoksisite, Oksidatif Stres, KoenzimQ10, Benfotiamin

2. ABSTRACT

Effects of Benfotiamine and Coenzyme Q10 on Kidney Damage Induced Gentamicin

Gentamicin is a type of aminoglycoside frequently used in daily clinical practices at treatment of gram negative infections. Coenzyme Q10 (CoQ10) is an endogenous antioxidant and has a protective effect against free radicals. Benfotiamine is a fat soluble type of thiamine vitamin. Our study aims at identifying protective effects of CoenzymeQ10 and benfotiamine against nephrotoxicity induced by gentamicin.

35 Wistar albino rats were used in our study. The rats were divided into five groups. The first group was the control group and the second group was the sham group. In the third group, each rat was administered 80mg/kg/day gentamicin intraperitoneally. In the fourth group, each rat was administered 80mg/kg/day gentamicin intraperitoneally and 10mg/kg/day CoQ10 intraperitoneally. In the fifth group, each rat was administered 80mg/kg/day gentamicin intraperitoneally and 100 mg/kg/day Benfotiamine by oral gavage. After gentamicin, CoQ10 and BFT was administered for eight days, blood samples were taken and renal tissues were extracted after euthanasia. KIM-1, TNF α , glutathione, malondialdehyde, BUN, creatinine were analyzed from blood samples. Tunel dye was rendered and histopathologic observations were evaluated.

Serum creatinine, urea, KIM-1 and MDA levels significantly increased in the group administered with gentamicin compared to the control group ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.005$, $P<0.0001$, respectively). Although creatinine and KIM-1 levels decreased in the rats administered with gentamicin and coenzymeQ10, this was not

statistically significant but serum MDA levels decreased significantly ($P<0,001$). While serum creatinine, urea, KIM-1, $\text{TNF}\alpha$ and MDA levels statistically significantly decreased in the rats administered with gentamicin and benfothiamine ($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.0001$, $P<0.0001$, respectively), total and reduced glutathione values increased ($P<0.0001$). Considering on histopathologic terms, a very distinctive necrosis was observed in the tubules in the cortex in the renal tissue in the group administered only with gentamicin. The necrosis highly decreased in the tubules in the cortex at the group administered with gentamicin and benfothiamine. While the necrosis in the cortical tubules in the renal tissues of the subjects administered with gentamicin and CoQ decreased compared to the group administered only with gentamicin, it maintained its distinctiveness compared to the benfothiamine group.

In conclusion, this study indicates that benfothiamine and coenzyme Q10 provide protection against gentamicin induced nephrotoxicity and provide it by probably reducing lipid peroxidation induced by gentamicin and exhibiting a protective effect against oxidative damage. Benfothiamine has been demonstrated both biochemically and histopathologically in this study to provide better protection against gentamicin induced nephrotoxicity compared to coenzyme Q10. Especially administering benfothiamine additionally in clinical use of gentamicin as an antibacterial can prove to be an alternative to prevent nephrotoxic side effects.

Key Words: Gentamicin, Nephrotoxicity, Oxidative Stress, CoenzymQ10, Benfotiamine

3. GİRİŞ

Gentamisin (GM), genellikle hayatı tehdit edici gram-negatif bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan aminoglikozid bir antibiyotiktir (1). Aminoglikozidler, gram (-) bakterilerinin enfeksiyonlarının önlenmesinde etkili olan antibiyotikler olarak uzun zamandır bilinmektedir (2). Özellikle gram negatif bakterilere karşı geniş bakterisit spektruma sahip olması, beta-laktamlara dirençli mikroorganizmalara karşı etkinliği ve maliyetinin düşük olması gibi avantajlarına rağmen yan etkileri ve yüksek nefrotoksisiteye sebep olması nedeniyle klinik kullanımları sınırlanmaktadır. Aminoglikozid antibiyotiklerin nefrotoksik yan etkileri birçok deneysel hayvan çalışmasında da rapor edilmiştir (1,3).

Gentamisin, plazma proteinlerine hemen hemen hiç bağlanmaz. Kanda yaklaşık %10 oranında alyuvarlara bağlanır. Vücutta biyotransformasyona uğramadan böbreklerden dışarı atılır ve idrarda serumdakinden 10-100 kez daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur (4). En önemli yan etkisi nefrotoksisitedir ve akut böbrek yetmezlikli olgularının %10-20'sinden sorumludur. Gentamisin ile 7 günden fazla bir süre tedavi edilen hastaların %30'unda nefrotoksisite belirtileri görülmeye başlamaktadır (5). Gentamisinin eliminasyonu çoğunlukla böbrekte glomerüler filtrasyon yolu ile olmaktadır (1). Gentamisin glomerülden filtre olduktan sonra proksimal tübül hücrelerindeki lizozomlarda birikir. Nefrotoksisite (renal konsantrasyon bozukluğu, akut tübüler nekroz veya renal yetmezlik) ilacın renal kortekste birikme özelliğinden kaynaklanmaktadır (1,6,7). Nefrotoksisite, ilacın dozu ve kullanım süresiyle doğru orantılıdır. Oluşan toksisite çoğunlukla reversibldir (8). Gentamisin tedavisi Hidrojen Peroksit ($H_2O_2^-$) ve Süperoksit anyonu (O_2^-) üretimini arttırmaktadır (9). Birçok çalışmada antioksidan özellik taşıyan maddelerin reaktif

oksijen metabolitlerinin oluşumunu engelleyerek gentamisin'in neden olduğu nefropatiyi düzelttiği rapor edilmiştir (10). Literatürde GM nefrotoksisitelerine ait çalışmalar mevcuttur. Gentamisine bağlı gelişen böbrek hasarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte deneysel çalışmalar serbest oksijen radikallerinin toksisitede rol oynadığını öne sürmektedir (11). Gentamisin nefrotoksisitesinin mekanizması hala kesinlik kazanmamış olup, multifaktöriyel nedenler ileri sürölmektedir.

Koenzim Q10 (CoQ10), yağda çözünebilir ubikinon olarak bilinen vitamin benzeri bir maddedir (12). Vücutta sentezlendiği için vitamin değildir. CoQ10 kardiyak, nörolojik, onkolojik ve immünolojik birçok bozukluğun tedavisinde kullanılmıştır (13,14). Esas kimyasal yapısı; 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-ecaprenyl-1,4-benzoquinone'dur. Bu haliyle trans konfigürasyonundadır (15). CoQ10, esas görevi adenosin trifosfat (ATP) üretmek olan mitokondriyal oksidatif respiratuar zincirde, elektron taşıyıcısı olarak görev görür. Ayrıca CoQ10 kardiyak hücrelerde adenosin difosfat (ADP) deposunun kaybını önleyerek de ATP oluşumunu artırmaktadır.

CoQ10'nun antioksidan bir madde olarak da lipid peroksidasyonunu önlediği gösterilmiştir. Yağda çözünen bir antioksidan olup O_2^- 'i temizleyerek endotelial disfonksiyonu azaltır. Hücre sinyal iletimi ve gen ekspresyonunda da görev görmektedir (13,14). Lipofilik bir madde olduğundan gastrointestinal sistemden (GİS) emilimi de lipidler gibi olmaktadır (14).

Tiamin suda çözülebilen bir vitamin olup hububatta, bakliyatda, kuru fasulyede, soyada, fındıkta, ekmekte, ette ve balıkta bulunur. Tiamin, hücresel enerji metabolizmasında karbonhidratların enerjiye dönüştürölme sürecine yardımcı olarak

önemli bir rol oynar. Tiamin; kalbin, kasların ve sinirlerin normal durumda çalışması için gereklidir ve farklı metabolik bozuklukların tedavisi için faydalıdır (15,16). Tiaminden türemiş bileşimler Allium familyasındaki soğan, taze soğan ve pırasa gibi bitkilerde bulunmuştur ve Allitiamin olarak isimlendirilmişlerdir (17). Bir enzimatik antioksidan olan glutatyonun okside halden redükte hale gelmesi için NADPH'lar kullanılır. Pentoz fosfat yolu NADPH'lar için önemli bir kaynaktır ve tiamin de bu yolu aktive edici olduğundan, dolaylı bir antioksidan kabul edilmiştir (18,19).

Benfotiamin (BFT), allitiamin olarak isimlendirilen, sarımsakta, soğan ve pırasa gibi sebzelerde eser miktarda bulunan, tiamin kökenli birleşimlerin eşsiz kaynaklarından biridir. Benfotiamin yağda çözülebilen bir tiamin türdeşidir. Başka bir tanıma göre BFT, B1 vitamininin yağda eriyen türüdür. Normal suda çözülebilen B1 vitaminine tiamin, yağda çözülebilen B1 vitaminine ise benfotiamin denilir (20). Benfotiamin yapısı nedeniyle hakiki tiamine göre çok daha yüksek bir biyoelverişliliğe sahiptir. Bu özelliğiyle benfotiaminin, suda çözülebilen tiamine göre vücutta daha kolay absorbe edildiği ve oral uygulamada eşdeğer bir tiamin dozuna göre en az beş kat daha yüksek plazma konsantrasyonuna (yani suda çözülebilen tiamine göre beş kat daha yüksek plazma düzeylerine) ulaşabilme etkinliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bundan ötürü benfotiamin allitiamin ailesindeki lipid tiamin türevlerine göre daha iyi olduğu ve lipitte çözülebilen türdeşleri içerisinde en güçlüsü olduğu belirtilmiştir (20-22). Benfotiaminin reaktif oksijen türleri üzerine de inhibe edici etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

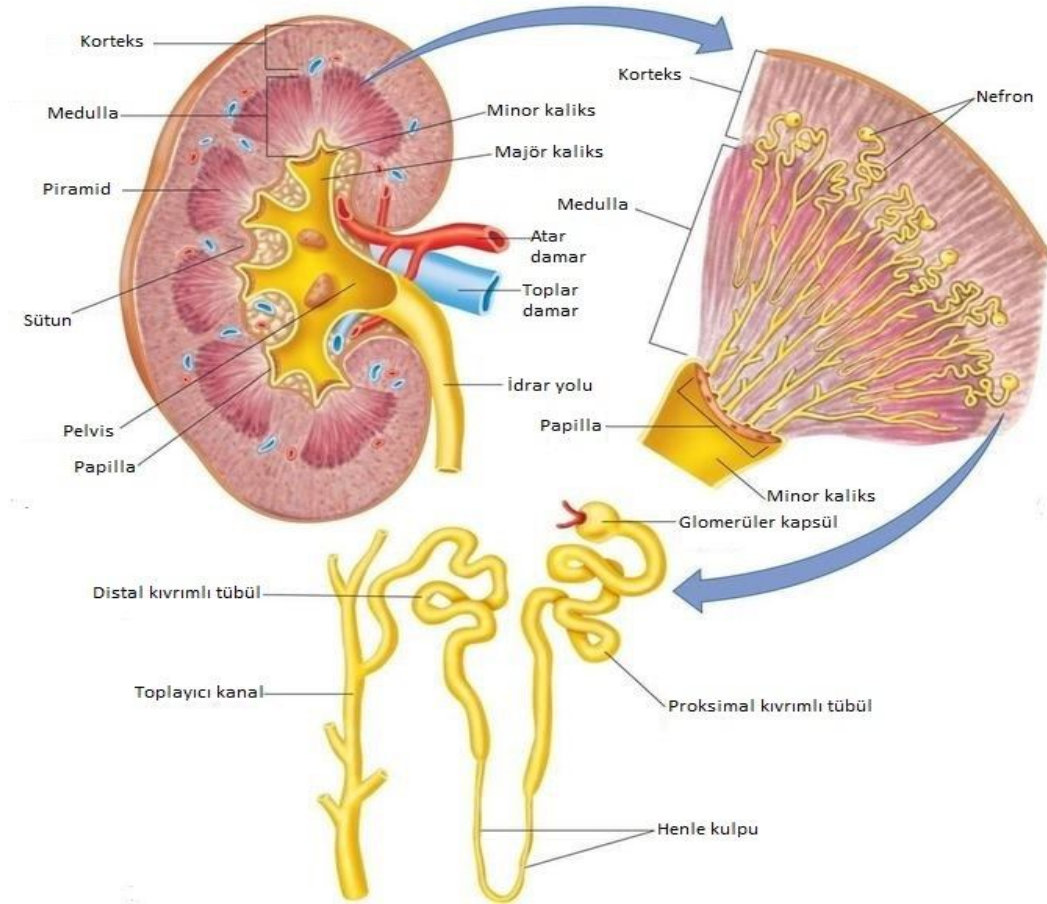
Bu çalışmada, ratlarda oluşturulan deneysel GM nefrotoksisitesinde koenzim Q10 ve benfotiamin kullanımının koruyucu etkilerini hem biyokimyasal hem de

histopatolojik olarak değerlendirdik. Ayrıca, bu etkilerin altında yatan olası mekanizmalar da yine bu çalışmada incelenmiştir.

3.1. Genel Bilgiler

3.1.1. Böbrek Histolojisi ve anatomisi

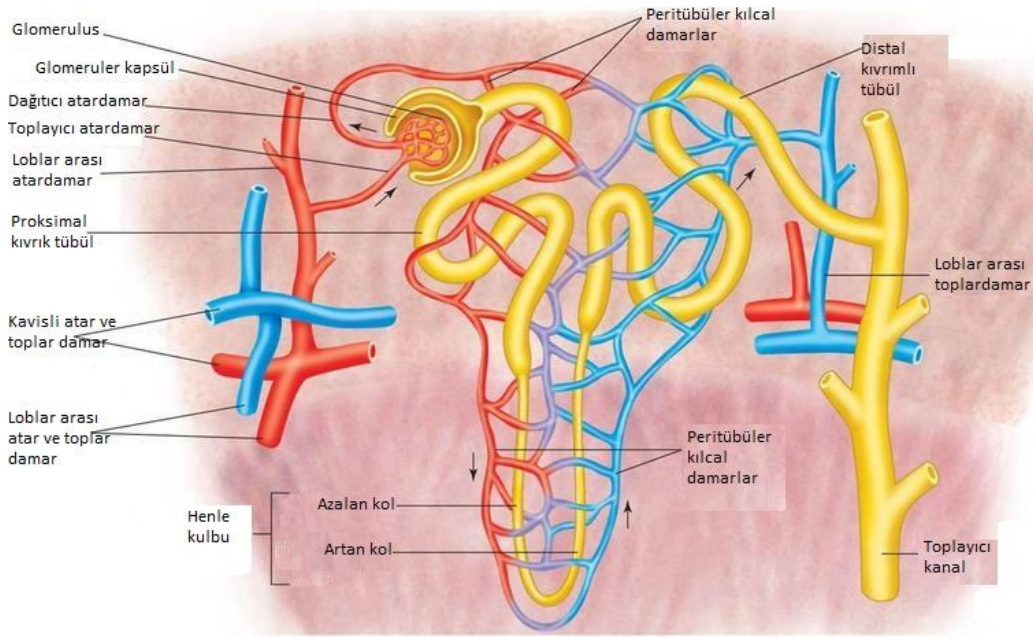
Böbrekler retroperitoneal yerleşimli organlar olup her böbreğin üstünde böbreğin yağ ve bağ dokusuna gömülü adrenal bez bulunur. Her böbrek düzensiz sıkı bağ dokusu kapsül ile kuşatılmıştır. Böbrekte tam orta hattan geçen bir kesitte dışta daha koyu renkli korteks ve ite çok sayıda koni biçimli böbrek piramitlerinden oluşan daha açık renkli medulla görülmektedir (23). İnsanda böbrek medüllası 10-18 adet piramidal ya da konik şekilli yapılar olan medüller piramitlerden oluşur.



şekil 1. Böbreğin yapısı (24)

Böbreğin fonksiyonel birimi nefrondur. Her böbrek 1- 4 milyon kadar nefron içerebilir. Her nefron genişlemiş bir bölüm olan renal cisimcik (böbrek cisimciği), proksimal kıvrımlı tübül, henle kulbunun ince ve kalın uzantıları, distal kıvrımlı tübül ve toplayıcı kanallardan oluşmaktadır (25). Böbrek cisimciği, çift tabakalı epitel hücrelerden oluşan bowman kapsülü ile çevrili glomerül olarak adlandırılan kapiller yumağından oluşur. Kapsülün iç tabakası özgün ve çok dallanmış epitel hücreleri olan podositlerden oluşur. Podositler kapillere komşudur ve uzun sitoplazmik uzantıları tamamen pencereci glomerular kapillerleri çevreler. Bu uzantılardan çıkan çok sayıda küçük ayakçıklar yani pediseller komşu podositlerin pediselleri ile iç içe geçerek sıkı-yapılı süzme yarıklarını oluştururlar. Glomerüller kapsülün dış tabakası ise tek katlı yassı epitelden oluşur (23). Glomerül kapillerdeki endotel hücreleriyle bunların dış yüzeyini örten podositler arasında kalın bir bazal membran bulunur. Bu tabakanın kapillerdeki kanla idrar boşluğunu birbirinden ayıran bir süzülme engeli oluşturduğu düşünülmektedir. Bu bazal membran, kapillerin ve podositin oluşturduğu bazal laminaların kaynaşmasından meydana gelmiştir. Elektron mikroskop ile incelendiğinde; ortada elektron yoğun bir tabaka (lamina densa) ve her iki yanda daha elektron geçirgen bir tabaka (lamina rara) fark edilmektedir. Elektron geçirgen olan her iki lamina rara, hücrelerin tutunmasına yarayabilecek olan fibronektin bulundurur. Lamina densa ise negatif yüklü bir proteoglikan olan ve katyonik moleküllerin geçişini engelleyen heparan sülfat içeren bir matriks içinde tip IV kollajen ve laminanın oluşturduğu ağ şeklinde bir yapıdır. Yani glomerül bazal laminası, lamina densanın fiziksel bir filtre olarak iş gördüğü, lamina raradaki anyonik bölgelerin ise elektriksel bir engel oluşturduğu seçici bir makromoleküler filtredir. 10 nm'den daha büyük partiküler bazal laminadan

geçemez; molekül ağırlığı albümin molekül ağırlığından (69 kDa) fazla olan negatif yüklü proteinler ise membrandan eser miktarda geçmektedir. Erişkin bir kişide her iki böbreğe gelen kan dakikada 1.2-1.3 litre kadardır. Bu durum vücutta dolaşan bütün kanın her 45 dakikada bir böbrekten geçmesi anlamını taşır. Glomerüllerde bulunan arteriyel kapiller içindeki hidrostatik basınç (yaklaşık 45mm Hg) başka kapillerdeki hidrostatik basınçta daha yüksektir (25).



Şekil 2. Nefron yapısı ve kan damarları ile bağlantısı (24)

Böbrekler içinden akan kan, böbrek cisimciğinde glomerüler kapillerden geçerken süzülür. Üretilen filtrat ardından böbrek cisimciğinin glomerüler kapsülünün pariyetal ve visseral hücre tabakaları arasında yerleşik kapsül (üriner) boşluğuna girer. Süzüntü, böbrek cisimciğini proksimal kıvrıntılı tübülün başladığı idrar kutbundan terk eder. Böbrek cisimciğini terk eden glomerular filtrat önce glomerüler kapsülden toplayıcı tüplere uzanan böbrek tübülüne girer. Böbrek cisimciğinden başlayan böbrek tübül bölümü çok kıvrıntılı veya bükülmüş olduğundan proksimal kıvrıntılı tübül olarak adlandırılır. Başlangıçta bu tübül

kortekste yerleşiktir, ardından diğer tübül olan henle kulbu ile devam etmek üzere medullaya iner. Henle kulbu birkaç kısımdan oluşur: Proksimal kıvrıntılı tübülün inen kalın parçası, ince inen parça ve distal kıvrıntılı tübül olarak adlandırılan çıkan kalın parça henle kulbunun kısımlarıdır. Distal kıvrımlı tübül proksimal tübüle göre daha kısa ve daha az kıvrıntılıdır ve tekrar böbrek korteksine geri döner. Glomerüler filtrat distal kıvrıntılı tübülden toplayıcı tübüle doğru akar. Birkaç kısa toplayıcı tübüller daha geniş toplayıcı kanalları oluşturmak üzere birleşirler. Toplayıcı kanallar genişlediğinde ve medullanın papillalarına doğru indiği zaman papillar kanal olarak adlandırılırlar. Medullanın derinlerinde bu kanalların epiteli prizmatığe dönüşür. Her papillanın tepesinde, papillar kanallar içeriklerini kalikse boşaltır (23).

Böbrek cisimciğindeki kan için süzme bariyeri üç farklı bileşenden oluşur: Glomerüler kapiller endoteli; altında uzanan bazal membran ve bowman kapsülünün visseral tabakası olan podositler ve onların ayakçıkları olan pediseler. Kanın süzülmesi ince, porlu, kanın şekilli elemanları ve büyük plazma proteinleri hariç kandaki çoğu maddeye yüksek geçirgen glomerüler kapiller endoteli ile kolaylaştırılır. Böbreğin fonksiyonel ilişkisini anlamak için organın kan kaynağını anlamak önemlidir. Her böbrek hilumda birkaç segmental dala ayrılan, bu dalların da yine birkaç loplar arası arterlere dallandığı geniş renal arterlerden kanlanır. Loplar arası arterler piramitlerin arasından kortekse devam eder. Korteksin medulla ile birleştiği bölgede, loplar arası arterler arkuat arterlere dallanır. Bu arterler piramitlerin tabanında kavis yapar ve lopçuklar arası arterleri oluşturur. Bu arterler daha sonra böbrek cisimciğinin glomerüllerindeki kapilleri oluşturacak olan afferent arterlere dallanır. Efferent arteriyoller, böbrek cisimciğini terk eder ve korteksteki tübüler etrafında karmaşık bir peritübüler kapiller ağ oluşturur. Ayrıca da medullada

korteks-medulla bileşimine geri dönen uzun, düz kapiller damarlar olan vasa rectaları oluşur. Vasa recta üriner filtratı içeren henle kulpu uzunluğuna paralel kangallar oluşturur. Bu tübüllerin ve kan damarlarının arasındaki interstisyum, arkuat venlere doğru devam eden lopçuklar arası venlere boşalır (23).

3.1.2. Böbrek Fonksiyonları

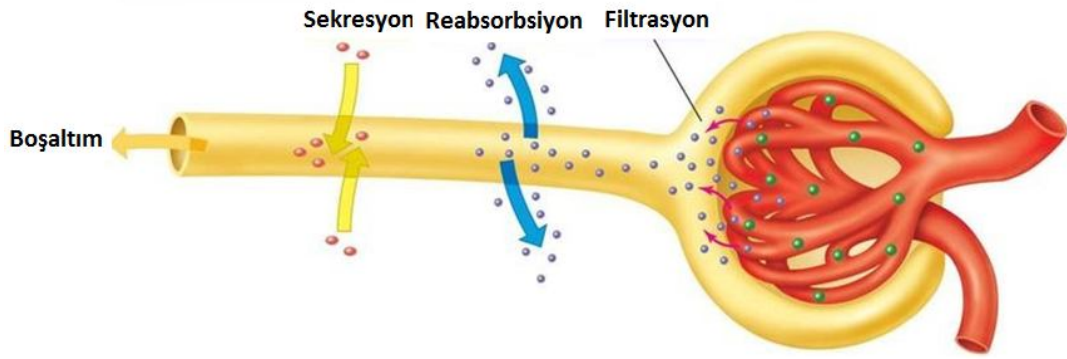
Böbreğin temel görevleri;

- 1- Metabolik atık ürünlerinin (ürik asit, kreatinin, üre) boşaltımı
- 2- Vücut sıvı ve elektrolit dengesinin korunması ve sürdürülmesi
- 3- Hücreler arası sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi
- 4- Toksinler, ilaçlar ve metabolitlerinin detoksifikasyonu ve atılımı
- 5- Hormon sentezine ve metabolizmasına katkıda bulunma
- 6- Küçük molekül ağırlıklı proteinlerin yıkımı
- 7- Metabolik etki: Glukoneenez, lipid metabolizması
- 8- İnsülin ve glukagon hormonlarının yıkımı (26)

3.1.1.1. İdrar Oluşumu

Böbreklerin temel fonksiyonları içerisinde en önemlisi toksik atık ürünlerin vücuttan uzaklaştırılması ve metabolik atıkların konsantre bir çözeltisi olan idrarın oluşumudur. Böbreklerin atılım fonksiyonu; glomerüllerden plazmanın filtrasyonunu, tübüler lümeninden kana doğru suda çözülen maddelerin taşınmasını ve tübüler hücrelerden lümene madde taşınmasını içermektedir. İdrar; böbrekler tarafından salgılanan, üreterlerden geçen, mesanede toplanan ve üratta yoluyla dışarı atılan bir sıvıdır. Sağlıklı bir bireyde berraktır, açık sarı renkte hafif asidik pH'ı ve

karakteristik bir kokusu vardır. İdrar, çözülmüş bileşiklere ek olarak hücresel parçalar, tam hücreler, proteinöz atıklar ve kristaller içerir (27). İdrar oluşumunda üç aşama vardır. Birincisi, glomerüllerdeki plazmanın önemli bir bölümünün glomerüler membrandan tübüler sistem içine filtre edilmesidir. İkincisi, filtre edilen sıvı tübülerde ilerlerken su ve gerekli diğer maddeler peritübüller kapiller ağdaki plazma içine reabsorbe edilir. Üçüncü olarak da diyetle sindirilen inorganik maddelerin ve metabolizmanın son ürünlerinin idrarla atılmasını sağlamaktadır (tübüler sekresyon) (28).



Şekil 3. İdrar oluşumu aşamaları (24)

Metabolik olayların aerobik olması sebebiyle böbrekte oksijen tüketimi oldukça fazladır. Böbrekteki bu yüksek metabolik aktivite tübülerdeki geri emilimin meydana gelmesi için gereklidir. Aminoasitler, glikoz, ürik asit, düşük molekül ağırlıklı proteinler, PO_4^{-3} , Na^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+ , Cl_3^- ve HCO_3^- 'ün aktif geri emilimi, vücudun ihtiyaçlarına ve bu maddelerin kan düzeylerine göre böbrekler vasıtasıyla ayarlanır. Su, üre ve Cl^- 'un pasif yolla geri emilimi sağlanmaktadır.

İdrar oluşumunda ilk basamak, glomerüllerde bulunan plazma suyunun filtre edilmesidir. Filtre edilmiş sıvı ultrafiltrat olarak isimlendirilir ve içeriği temelde plazma ile aynı yapıdadır. Glomerüllerden 24 saat içinde yaklaşık 170-200 L

ultrafiltrat geçer. Suyun ve çözünmüş maddelerin tübüllerin değişik bölgelerinden geri Emilimi total hacmi azaltır. Oluşan filtratın yaklaşık %1 kadarı günlük normal idrar miktarını (2000mL) meydana getirir. Filtratın %99 u geri emilir. Glomerüllerden filtre edilen glukozun tümü ve aminoasitlerin çoğu tübülden geri emilmektedir. Normal koşullarda filtre edilen glukozun tümü geri emildiği için idrarla glukoz atılmamaktadır. Distal tübüler ve toplayıcı kanallarda su geri Emilimi antidiüretik hormon (ADH) tarafından düzenlenmektedir. ADH yokluğunda su geri Emilimi olmamakta ve idrar seyreltik hale gelmektedir. ADH varlığında ise distal tüplerin suya geçirgenliği artmaktadır (26,27,29).

3.1.1.2. Vücuttaki Sıvı ve Elektrolit Dengesinin Korunması ve Sürdürülmesi

Vücut sıvıları ve içerdikleri elektrolitler yaşamın devam etmesinde gerekli olan iyonik ortamı oluşturmaktadır. Böbrekler vücut sıvılarının miktarında ve elektrolit içeriklerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Vücut sıvısı ve iyon içeriğindeki sapmalar genel olarak idrar atılımındaki uygun değişikliklerle düzeltilmektedir. Elektrolit fazlalığında böbrek yolu ile idrarla atılımı sağlanırken, azlığında ise bu elektrolitler böbrekler tarafından tutulmaktadır. Böbreklerde elektrolit dengesi tübüler geri Emilim ile düzenlenmektedir. Geri Emilim işlemi genellikle proksimal kıvrımlı tübülde gerçekleşir. Bikarbonatın (HCO_3^-) geri Emilim miktarı GFH ve Hidrojen (H^+) salgılanma hızına bağlıdır. Glukoz ve aminoasitler hücre içi aktif taşıma sistemleri aracılığıyla proksimal kıvrımlı tübülde geri emilirler (27).

Distal tübül, plazma asit-baz düzeyleri ve plazma elektrolitlerin düzenlenmesinde nefronun işlevsel olarak en aktif bölgesidir. Bu bölgede salgılama ve geri emilim işlemleri Na^+ , K^+ ve H^+ arasındaki ilişkilerle gerçekleşir. Plazmadaki fazla H^+ iyonları bütün tübül boyunca salgılanır. Normal plazma pH'ını devam ettirmek için H^+ iyonunun tutulması gerektiği zaman, distal tübül hücreleri H^+ salgısını, amonyak (NH_3) oluşumunu ve Na-H değişimini azaltır ve HCO_3^- atılımını arttırmaları. Tüm bu işlemlerin amacı plazmadaki HCO_3^- azaltılması ve normal plazma pH'ını yeniden sağlamaktır. Tübüler sıvıdaki suyun yaklaşık olarak %70'i proksimal tübülde, %5'i Henle kulbunda, %10'u distal tübülde geriye kalanı toplayıcı kanallardan geri emilir (27,30).

Vücut sıvılarının pH'sının düzenlenmesi böbrekler ve akciğerler tarafından yapılmaktadır. Böbrekler ve akciğerler doku katabolizmasında yan ürün olan fazla miktardaki H^+ iyonunun atılımını gerçekleştirmektedirler. İnsanlarda hücre dışı ortamdaki en önemli tampon sistemi HCO_3^- tampon sistemidir. Akciğerler kandaki HCO_3^- 'ü düşürme ihtiyacından dolayı $[(\text{HCO}_3^-) / (\text{H}_2\text{CO}_3)]$ oranını artırır. Böbreklerden süzülen HCO_3^- ise vücutta normal pH düzeyini sağlamak için gerektiği zaman geri emilir (26,27).

3.1.1.3. Metabolik Atık Ürünlerinin Atılımı

Protein metabolizması sonucu oluşan kreatinin, ürik asit ve üre böbrekler aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılır. Aminoasit deaminasyonu sonucunda oluşan amonyağın kanda toksik seviyelere ulaşması karaciğerdeki üre oluşumu ile engellenmektedir. Karaciğerde fazla miktarda aminoasit katalizlendiğinde üre oluşumu ve kan üre azotu (BUN) düzeyleri artmaktadır. Kolay filtre olan ürenin %

40-50 kadarı proksimal tübüllerde geri emilmektedir. Kreatinin, iskelet kasında kreatinden enzimatik olmayan dehidrasyon ile oluşur. Glomerüllerden serbestçe filtre olan kreatininin, tübüllerden geri emilimi gerçekleşmemektedir (26).

Böbrekte kronik veya akut yetmezlik olduğu zaman vücutta nitrojen metabolizmasının son ürünleri birikir ve protein kaynaklı olmayan nitrojenlerin düzeyi yükselir. Bu durumda BUN ve serum kreatinin düzeylerinde yükselmeye neden olur. Nitrojen ürünlerin birikimi sonucunda azotemi gelişir. Bu durum ise böbreklerin metabolizma artıklarını atabilme yeteneğini kaybettiği üremi ile sonuçlanır (31).

3.1.2. Böbrek Yetmezliği

3.1.2.1. Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), glomerüler filtrasyon değerinde azalma sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesinin ayarlanmasında ve metabolik fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma halinin görüldüğü bir sağlık problemidir (32). Kronik böbrek hastalığı çok yüksek bir etki oranına sahip dünya çapında bir sağlık problemi olarak bilinmektedir (33). Kronik böbrek hastalığı ilerleyici bir şekilde son dönem böbrek yetmezliğine doğru gider. KBY, kardiovasküler hastalıkları da içeren oldukça çeşitlilik gösteren sorunların ortaya çıkmasına yol açar (34,35). KBY çok farklı nedenlerle gelişebilmekte ve bu nedenler cinsiyete, ırka ve ülkelere göre değişkenlik göstermektedir. Ülkemizde kronik böbrek yetmezliğine sebep olan nedenlerin ilk üçü diyabet, hipertansiyon ve kronik glomerulonefrit olarak sıralanmıştır (36).

3.1.2.2. Akut Böbrek yetmezliği

Akut böbrek yetmezliği (ABY), akut böbrek hasarı için fikir birliğine varılan yeni bir terimdir (37). Akut böbrek yetmezliği terimi, ölçülemeyen diğer klinik atıklar ve kreatinin, üre gibi nitrojen metabolizması ürünlerinin birikimi ile böbrek atılım fonksiyonunun hızlı bir şekilde azalması olarak karakterize edilen klinik bir sendromu ifade eder. Akut böbrek yetmezliği için yaygın olan diğer klinik ve laboratuvar bulguları; idrar ürünlerinin azalması, metabolik asitlerin birikimi ve potasyum-fosfat konsantrasyonlarının artmasıdır (38). ABY, sıklıkla nefrotoksik ve iskemik olaylar sonucunda meydana gelen bir hastalık olarak bilinmektedir. Akut böbrek yetmezliği hızlı ilerlemektedir ve bu sebeple kontrol edilmesi zor olan elektrolit, asit-baz ve sıvı dengesizliği ortaya çıkarmaktadır. Akut böbrek yetmezliğinde glomerüler filtrasyon hızındaki düşüş kronik böbrek yetmezliğine kıyaslandığında oldukça hızlı olduğu görülmektedir (39,40).

3.1.2.3. İlaça bağlı akut böbrek yetmezliği

Böbrekler, fazla miktarda kanlanmaları, endotelial yüzey genişliği ve metabolik faaliyetleri sebebiyle toksik hasarlara karşı çok duyarlıdır. Nefrotoksik etkiye sahip olan çeşitli ilaçların konsantre edilme durumları böbrek tübüllerinde sağlandığı için tübüllerin lümenleri ve peritübüller hücreler bu toksinlere daima maruz kalırlar. Böbrek papilları ve medullasında kan akımının düşük, çözünen madde konsantrasyonunun yüksek olmasından dolayı toksisiteye karşı daha hassastırlar (41).

Geçmişte akut böbrek yetmezliğine neden olan faktörler arasında organik çözücüler, ağır metaller ve glikoller ilk sıralarda yer alırken, günümüzde bu ajanlar

ile daha nadir karşılaşılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda aminoglikozit antibiyotiklerin, akut böbrek yetmezliğine yol açan maddeler içinde ön sırayı aldığı gösterilmiştir (42).

3.1.2.4. Aminoglikozitler

Aminoglikozidler 6 üyeli bir aminosiklitol halka yapısından meydana gelirler. Aminosiklitol halkasına glikozidik bağıyla bağlanmış şekerler bulunmaktadır. Fakat Spektinomisin türü aminoglikozid; amino şeker ve glikozid bağ bulundurmamasıyla diğerlerinden farklılık gösterir (43). Aminoglikozidler suda çok çözünürler, organik çözücülerde çözünmezler ve çok az lipofiliktirler. Bu sebeple yağ bulunduran zarlardan geçişleri sınırlı olmaktadır. Fizyolojik pH olan 7.4’de katyonik olup çok yüksek pozitif yükleri vardır. Buda aminoglikozidlerin antimikrobiyal etkinlikleri ve nefrotoksisite ile ilişki göstermektedir (43,44).

Aminoglikozidler kimyasal oluşumlarına göre 5 gruba ayrılırlar (45);

1. Streptomisin grubu
2. Kanamisin grubu
3. Gentamisin grubu
4. Neomisin grubu
5. Spektinomisin grubu

Aminoglikozidlerin etki mekanizması multifaktöriyel bir olaydır ve başlangıcında hücrenin dış yüzeyi ile etkileşim basamağı bulunmaktadır. Bu olay hızlı ve elektrostatik bir olay olarak pasif yolla gerçekleşmektedir (43).

Aminoglikozidler polar yapıları nedeniyle çok az lipofilik özellik gösterirler. Bu yüzden sindirim kanallarında absorpsiyonu oldukça zor olmaktadır (45). Aminoglikozidlerin güvenli kullanılabileceği aralık çok sınırlıdır ve kullanımlarında en önemli kısıtlayıcı durum toksisite etki göstermeleridir. Aminoglikozid kullanımı sonucu en sık görülen toksisiteler arasında; nefrotoksisite, ototoksisite ve nöromusküler blokajdır. Nefrotoksisite tüm aminoglikozidlerin sebep olabildiği ve aminoglikozid uygulamalarında %5-10 oranında saptanabilen bir yan etki olarak görülmektedir (46).

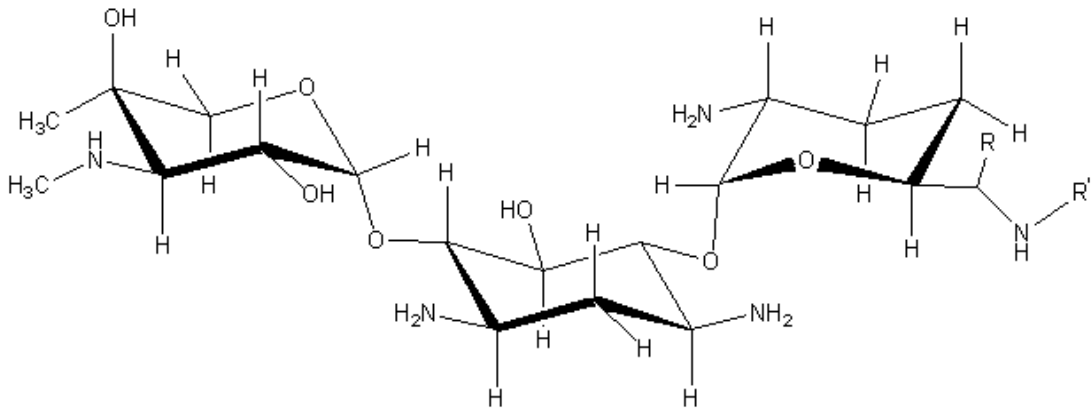
3.1.2.5. Aminoglikozitlerin Sebep Olduğu Nefrotoksisite ve Akut Böbrek Yetmezliği

Gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların aminoglikozidlerle tedavisi sürecinde nefrotoksisiteye çok sık rastlanmaktadır (47,48). Bu ilaçlarla meydana gelen nefrotoksisitenin tübüler nekrozla karakterize olduğu gösterilmiştir. Hücre hasarı aminoglikozitlerin direkt olarak tübüler etkisine bağlıdır ve proksimal tübüllerde görülür (49). Aminoglikozitler hücre içine girdikten sonra lizozomlara taşınır. Hücreye girişinin sürekli olması lizozomal disfonksiyonuna ve sonuçta dejenerasyona sebep olur. Bu durum da lizozomal enzimlerin açığa çıkmasına ve diğer hücre organellerini etkilemesine neden olur. Nefrotoksisitenin ilk bulguları fırçamsı kenarın ve lizozomal enzimlerin lümene salınması, glikozüri, aminoasidüri ve tübüler proteinürüdür (41). Aminoglikozitlerin tek bir yüksek dozu dahi membrana bağlı Na-K-ATPaz'da azalma ile sonuçlanabilir (50). Aminoglikozitlerin direkt olarak proksimal tübüllerdeki toksik etkisine bir diğer kanıt; K^+ ve Mg^{+} gibi katyonların proksimal tübüllerde kaybının görülmesidir (51).

Yapılan çalışmalarda aminoglikozit kullanılan hastaların %20'sinde ilaç düzeylerinin terapötik düzeylerde olmasına rağmen nefrotoksisite geliştiği gösterilmiştir (52).

3.1.3. Gentamisin

Gentamisin, beta laktam antibiyotikler ile birlikte ya da tek başına gram negatif enfeksiyonların tedavisi için günlük klinik uygulamaların içinde rutin olarak kullanılan organik polikasyon yapıda bir aminoglikozitik antibiyotiktir (53). *Micromonospora purpurea*'dan elde edilir. Yapıca birbirine benzeyen 3 gentamisin türünün karışımından ibarettir. GM, aminoglikozid ilaçlar içinde amikasinin sonra spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olan aminoglikoziddir. Plazma proteinlerine neredeyse hiç bağlanmamaktadır. Kanda yaklaşık %10 oranında alyuvarlara bağlanır. Vücutta bir değişikliğe uğramadan böbreklerden atılır ve idrarda serumdakinden 10-100 kez daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur (54).



Şekil 4. Gentamisinin kimyasal yapısının açık formülü (55)

Gentamisinin oluşturduğu nefrotoksisite; hücre organellerin bozulmasını ve nekroz oluşmasını içeren morfolojik değişiklikler olarak tanımlanır. Bu bulgulardan önce mitokondriyal vakuoleşme, lizozomal parçalanma, nekrozis ve hücre organellerin yok edilmesini içeren morfolojik değişikliklerle karakterizedir.

Gentamisinin nefrotoksik etkisinin görüldüğü yer böbrek korteksi olup özellikle proksimal tübüllere etki etmektedir (56). Gentamisin nefrotoksitesinin hücre içi mekanizmalara etkisi tam olarak net olmasada, hücre içi mekanizmalar üzerine etkisi gentamisinin miktarının lizozomlarda ve proksimal tübül hücrelerinde birikmesinden sonra meydana gelir. Gentamisinin normal kullanım dozajı ile ulaşılan serum seviyeleri ile hücresel alımının doyurabildiği görülmektedir. Gentamisinin artmış serum seviyeleri hücrelerin alım süresini uzatır ve dolayısıyla nefrotoksisite durumunu arttırır (56,57).

Çeşitli çalışmalar, gentamisine bağlı böbrek hasarında reaktif oksijen türlerinin ilişkisi olduğunu göstermektedir. Reaktif oksijen türleri (ROT) doğrudan lipit, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) içeren hücre bileşenlerini etkiler ve onların yapılarını bozar (58). Oksidatif stres sırasında membran lipitlerinin peroksidasyonu; çoklu doymamış yağ asitlerinin parçalanmasına ve çeşitli aldehid ve alkenlerin salınmasına neden olur (59). Bu salınım gentamisinin böbrek kortikal mitokondrisi tarafından serbest radikallerden oluşan oksijen salınımı ve oluşumunu şiddetlendirebilir, bu yüzden eş zamanlı olarak apoptozise ve poliferasyona neden olur (60). Üretilen serbest radikaller (SR), böbrek glomerüllerin temel membranlarına zarar verir, tübül fonksiyonunu bozar, kollajen ve diğer matriks bileşenlerini parçalar (61).

Gentamisin uygulamaları ile ilişkili böbrek hasarını iyileştirmek ya da korumak için GM ile birlikte eş zamanlı olarak çeşitli faktörler kullanılmasına rağmen (62,63,64), gentamisine bağlı nefrotoksisiteye karşı güvenilir bir tedavi bulunmamaktadır.

3.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stress

3.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller tek eşleşmemiş elektrona sahip, yeni bir serbest elektron ile eşleşme arayışında olan yüksek reaktiviteli kimyasallardır. Bu reaksiyonların sonucu olarak diğer SR'ler veya eşleşmiş elektronlar meydana gelir ve radikal özelliklerini kaybederler. Eğer yeni şekillenen bir SR oluşursa, bu serbest radikal aynı zamanda kararsız halde olup yeni şekillenen molekülün eşleşmiş elektronları yüzünden başka bir molekül ile diğer SR'leri üretmek ya da radikal olmayan molekül meydana getirmek için reaksiyona girebilir. Böylece, meydana gelen SR zincir reaksiyonları, biyolojik doku ve sistemlerde zarara yol açar. Bu SR'lerin büyük çoğunluğu başlıca oksijen radikalleri ve ROT'leridir (65). En iyi bilinen serbest radikaller; ROT'leri olan O_2^- , $H_2O_2^-$, hidroksil radikali (OH^-)' dir ve reaktif nitrojen türleri olan nitrik oksit ve peroksinitrit'dir. ROT'nin canlı organizmada esas üretildiği alanlar mitokondriyal elektron tranport zinciri (ETZ), peroksimal yağ asitleri, sitokrom P-450 ve fagositik döngülerdir (66,67).

Tablo 1. Yaygın reaktif türler

	Serbest Radikaller	Radikal olmayanlar
Reaktif Oksijen Türleri	Süperoksit (O_2^-) Hidroksil (OH^-)	Hidrojen peroksit ($H_2O_2^-$) Organik peroksit ($R-OOH$)
Reaktif nitrojen Türleri	Peroksil ($R-O^-$) Nitrik oksit (NO) Nitrojendioksit(NO_2)	Hipokloröz asit ($HOCl$) Peroksinitrit ($ONOO^-$)

Oksijen; bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisi sonucunda süperoksit grubuna indirgenir. Hücre hasarına yol açan ve son derece etkin olan süperoksit grubu, bakır içeren bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile $H_2O_2^-$ ve O_2^- dönüştürülür. Süperoksit grubuna göre daha zayıf etkiye sahip olan $H_2O_2^-$ grubu ise dokularda bulunan katalaz (CAT), peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler aracılığıyla daha zayıf etkiye sahip su ve oksijene dönüştürülerek etkisi ortadan kaldırılır. Serbest oksijen radikallerinin, aminoglikozit nefrotoksitesi, ağır metal nefrotoksitesi, iskemi, hiperoksi, E vitaminin eksikliği, displazi, aterosklerozis, ilaç ve toksinle oluşan pek çok hastalığın oluşum sürecinde etkili oldukları öne sürülmektedir (68).

3.2.2. Oksidatif Stress

Oksidatif stres (OS); reaktif türlerin üretimi ile hücrelerin doğal antioksidan yeteneği arasında bir dengesizlik sonucu hücresel ve moleküler işlevlerde bir rahatsızlık olarak tanımlanabilir. Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri, OS yaratmak için genellikle birlikte hareket eder. ROT muhtemelen biyolojik sistem içindeki en önemli serbest radikallerdir. Başlıca reaktif oksijen türleri; süperoksit (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-), hidrojen peroksittir ($H_2O_2^-$). Mitokondrideki tahmini ROT'lerinin seviyesi, diğer sitozolik ve çekirdeğe ait kısımlardan 5-10 kat daha yüksektir (69). ROT, oksijen metabolitleri tarafından üretilen yükseltgenlerdir. Reaktif oksijen türleri çoğunlukla radikaldır, çünkü dış orbitalinde eşlenmemiş ve tek bir elektrona sahiptir. Radikal olmayanlar $H_2O_2^-$ iken, radikal olan oksijen metabolitleri, O_2^- ve OH^- radikalini içerir (70). Reaktif oksijen türlerinin kaynaklarını; mitokondriyal elektron taşıma zinciri, endotelial hücreler (ksantinoksit reaksiyonu), inflamatuvar hücreler (myeloperoksidaz, NADPH oksidaz),

katekolamin oksidasyonu ve araşidonik asit metabolizmasından oluşturur (70,71). ROT üretimine yardım eden diğer alanlar endoplazmik retikulum, peroksizom ve lizozomdur. Solunan havadaki moleküler oksijenin % 1-3 arasında bir oranı hidrojen peroksitin prekürsörü olan süperoksit (O_2^-) radikaline dönüştürülür (72). Çok kararsız olan O_2^- radikali, SOD enziminin aktivitesi ile hemen H_2O_2 'e dönüştürülür. Hem O_2^- radikali hem de H_2O_2 diğer güçlü oksidanların öncü oluşumlarıdır. H_2O_2 , bir çok organik yapı ile etkileşim içinde olan güçlü bir oksidandır. Sağlıklı hücrelerde, potansiyel olarak zararlı etkiye sahip olan H_2O_2 mitokondriyal ya da sitozolik katalaz veya tiyol peroksidazlar tarafından H_2O ve O_2 'e dönüştürülmesi ile zararsızlaştırılır. H_2O_2 kararlı olmasına rağmen, bu molekül özellikle indirgenmiş metal iyonu Fe^{+2} 'nin varlığında çeşitli substratlar ile etkileşme potansiyeline sahiptir. H_2O_2 'nin yıkılması hidroksil radikalinin ($OH^\cdot$) oluşumuna yol açar. Hidroksil radikali çok yüksek reaktivliğe sahiptir, bu yüzden bulunduğu yerde hedefindeki moleküller ile hemen tepkimeye girerler (71,73,74).

Tablo 2. Oksidan Kaynakları ve Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksidan Kaynakları	Antioksidan Savunma
• Sigara Dumanı	○ Süperoksit Dismutaz
• Egzersiz	○ Katalaz
• Çevre Kirleticiler	○ Glutasyon Peroksidaz
• Ateşli Hastalıklar	○ Glutasyon
• Radyasyon	○ Ubikinon
• Çoklu Doymamış Yağ Asitleri	○ Selenyum
ile zengin bir diet	○ Ürik Asit
• İskemi	○ E vitamini
• Nefrotoksisite	○ C vitamini (askorbik asit)
• Karsinojenler	○ β -karoten ve diğer karotenoidler

ROS türleri zarar veren moleküllerdir. Hatta normal solunum sırasında üretildikleri zaman, hücre ve doku fonksiyon kaybına ve sonuçta hastalığa yol açacak zararlı etkilere neden olabilir. Oksidatif stres tarafından üretilen oksidanlar çok kısa bir yarılanma ömrüne sahip ve yüksek reaktifli bileşenlerdir. Bu yüzden ölçümleri oldukça zordur. Oksidanlar; lipit, protein, karbonhidrat gibi oldukça çeşitli bileşenleri yükseltgenme kapasitesine sahiptir. Bu yüzden oksidasyon ürünleri daha uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir ki bu sebeple oksidasyon tepkimelerinin ürünlerini oksidatif stresin belirtici olarak kullanılabilir. ROS üretimi, ilerleyici hastalık ve yaşlanma sırasında doğal antioksidan seviyelerini arttırdığı bilinmektedir (69,71). Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı engelleyecek yapılar antioksidanlar olarak bilinmektedir (76). Oksijen radikallerinin fizyolojik oluşumları, antioksidanlar tarafından zehirsizleştirilir. Antioksidanlar; endojen veya eksojen kaynaklı olabilirler. Endojen kaynaklı olan antioksidanların enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Enzim olan endojen antioksidanlara; SOD, katalaz, hidroperoksidaz ve glutatyon peroksidaz örnek verilebilir. Enzim olmayan endojen antioksidanlara melatonin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, transferrin örnek olarak verilebilir. Eksojen antioksidanlar; vitaminler (α -tokoferol, askorbik asit, folik asit), ilaçlar (sitokinler, ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri vs.) ve günlük yiyeceklerden alınan antioksidanlar olarak bilinmektedir (35,71).

Tablo 3. Endojen ve Eksojen Antioksidanlar

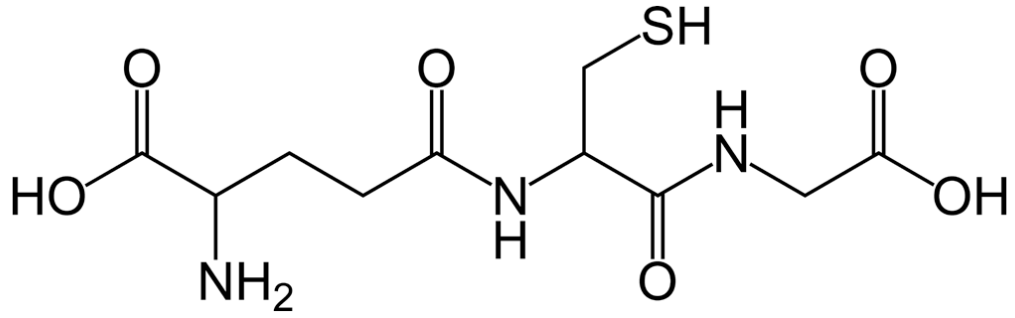
Endojen antioksidanlar	Eksojen antioksidan
❖ süperoksit dismutaz	❖ α -tokoferol
❖ katalaz	❖ askorbik asit
❖ hidroperoksidaz	❖ folik asit
❖ glutatyon peroksidaz	❖ sitokinler
❖ melatonin	❖ ksantin oksidaz inhibitörleri
❖ hemoglobin	❖ NADPH oksidaz inhibitörleri
❖ ferritin	❖ Yiyeceklerden alınan anti
❖ bilirubin	oksidanlar
❖ glutatyon	
❖ sistein	
❖ metiyonin	
❖ transferrin	

Böbrek, yüksek enerjili bir organdır ve bu nedenle böbrekte ATP üretimi ağırlıklı olarak aerobik metabolizmaya (oksidatif fosforilasyona) dayanır. Mitokondri bünyesinde ETZ boyunca moleküler O_2^- nin redüksiyonu böbrek hücresel fonksiyonları için kritiktir. ETZ'yi oluşturan 5 multi-enzim kompleksi ATP'nin üretimi ve mitokondriyal membran potansiyelinin sürdürülmesinden sorumludur. Bu komplekslerin her biri ROS üretiminin konumunu gösterir, ancak I ve III kompleksler süperoksit radikalının mevkisinin esas konumu olarak tanımlanmıştır (77). Kompleks I aynı zamanda, NADPH ve CoQ10 arasındaki elektron transferini kolaylaştıran NADH dehidrogenaz ya da NADH-CoQ redüktaz olarak da bilinir. Oksidatif fosforilasyondaki bozukluğa indirgenmiş NADH ile NADH oksidaz gibi substratların kullanımı neden olabilir. Böylece değişmiş solunum kompleksleri ve substratlar elektron taşımada bir yetersizliğe yol açması olasıdır ve bunun ardından mitokondriyal membran potansiyelinde bir hasar oluşur ve adenozin trifosfat (ATP) üretiminde azalma, ROT türlerinde artma meydana gelir (78).

ROT üretimi, genellikle glutatyon ve GPx, CAT, SOD ve antioksidan enzimlerin hücresel lokalizasyonu ve kullanılabilirliği ile dengelenmektedir. Glutatyon sentezi ATP'ye bağımlıdır ancak glutatyon savunmasının indirgenme kabiliyeti NADPH ve pentoz fosfat yoluna bağlıdır (79). İn vivo çalışmalarda, ROT artmasından ziyade bu endojen antioksidanların seviyelerindeki azalmadan kaynaklanan birikmiş oksidatif hasarların meydana geldiği gösterilmiştir (80). Bununla birlikte ROT ve antioksidanların uygun seviyeleri normal hücre fonksiyonları için kritik olması muhtemeldir. Mitokondri, ROS'lerin ürünlerini ortadan kaldırmak için Mn-SOD gibi antioksidanların kendi havuzuna sahiptir. Mn-SOD ya da Cu/Zn-SOD, $O_2^{\cdot -}$ ni H_2O_2 dönüştürür daha sonra CAT ve GPx tarafından H_2O ve O_2 'e ayrıştırılır (81).

3.3. Glutatyon

Bir çok hücrede glutatyon iki aşamalı bir reaksiyon ile de novo olarak sentezlenir. Birinci aşama ROT'lerinin oluşumu ile bağlantılıdır. İkinci aşama bir birleşme reaksiyonu olarak gerçekleşir. İlk olarak, glutamat-sistein sentaz enziminin, sistein ve glutamat'ın birleşmesini katalizlemesiyle γ -glutamilsistein oluşur. Daha sonra glisin, glutatyonun oluşturulması için glutatyonsentaz tarafından eklenir (82). Yani glutatyon bir tripeptid olup, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşmaktadır. Glutatyon, ROT'lerinin elektrofillerine karşı savunma rolünü yapmasını sağlayan sülfid kısmı ile dört tip fonksiyonel grup içermektedir. Glutatyon (GSH) indirgenmiş durumdadır ve peroksitlerin redüksiyonunda rol oynar. Bu reaksiyon selenyum içeren bir protein olan GPx'in katılımı ile ara okside bir duruma ve ardından da bir disülfid dimerin (GSSG) oluşumuna yol açar (83).



Şekil 5. Glutatyon (GSH) kimyasal yapısı (84)

Glutatyon reduktaz enzimi indirgenmiş hücresel ortamı devam ettirmek için okside GSSG'daki disülfid yapısını indirgemıştır. Daha sonra glutatyon reduktaz enzimi disülfidi tekrar GSH haline dönmek üzere indirger. Glutatyon, proteinlerin tiyol gruplarını indirgenmiş durumda tutmak, disülfid kalıntılarının karşılıklı olarak değiştiği tepkimelerde görev almak, aminoasitlerin hücre zarından geçişini kolaylaştırmak, bazı enzimlerin ko-enzimi olarak görev yapmak, endojen peroksitleri ve serbest radikalleri yıkmak ve yabancı madde detoksifikasyonunu sağlamak gibi önemli işlevlere sahiptir (85). Hücresel sistem tarafından redoks durumun değerlendirilip oksidatif stres olup olmadığını belirlemek için redükte glutatyonun (GSH) oksitlenmiş glutatyona (GSSG) oranına bakılır. Sisteinin kullanılabilirliği glutatyonun yeniden üretilmesinde sınırlayıcı faktördür (86).

3.4. Lipid peroksidasyonu

Son zamanlarda lipid peroksidasyonu, ölü hücrelerin yol açtığı toksik süreç ve hücre yapılarına yönelik oksidatif hasara neden olan moleküler mekanizmalar olarak düşünülmektedir. İlk olarak bazı araştırmacılar lipid peroksidasyonunu, besinsel yağları hasara uğratan bir mekanizma olarak düşünüp araştırmışlar, ancak diğer araştırmacılar lipid peroksidasyonunu; hücre membranı ve hücreler arası

membranı zarara uğratan, yüksek seviyede reaktif türler üreten toksik metabolizmasının sonucu olarak düşünmüşlerdir (87).

Lipid peroksidasyonu hem bitkilerde hem de hayvanlarda meydana geldiği bilinen kompleks bir süreçtir. Lipid peroksidasyonu, alkol, alken, keton, aldehid ve diğer çeşitli yıkım ürünlerinin üretimi ile doymamış yağların çift bağlarının yeniden düzenlenmesi ve sonunda da membran lipidlerinin yapısının bozulması sonucu lipid radikallerinin oluşumunu ve yayılmasını içerir. Biyolojik zarların hepsi amfipatik lipidlerin, zar proteinlerinin ve poliansatüre yağ asitlerinin birleşmesiyle meydana gelmiştir. Lipit peroksidasyonu; çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik tepkimeler şeklinde uzayan, lipit peroksitlerin hidrokarbon radikalleri, aldehit türevli ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi ile sonuçlanan bir olaydır (88,89). Lipid peroksidasyonu, serbest oksijen radikallerinin katalizlemesi ile lipidlerin hidrojen kaybederek aktive olup, hızla oksijen ile reaksiyona girerek serbest peroksitleri meydana getirmesi olarak bilinmektedir (90).

Malondialdehid (MDA), lipid peroksidasyonunun en önemli son ürünüdür. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonları sonucunda MDA oluşur. Meydana gelen MDA, hücre membranlarında iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açmaktadır. Enzim aktivitesinin ve iyon geçirgenliğinin değişmesi gibi olumsuz sonuçlara neden olmaktadır (68). Lipid peroksidasyonu artışı serbest oksijen radikali artışının dolaylı yoldan işaretidir. Malondialdehid gibi lipid peroksidasyonlarının artan konsantrasyondaki son ürünleri, serbest oksijen radikallerinin aktivasyonunun direk olarak göstergesidirler (89,90).

3.5. Koenzim Q10

Koenzim, bir enzimin düzgün çalışması için gerekli olan bir moleküldür. “Q” kinon kimyasal bir grubu belirtir ve “10” kinonun özel bir türüdür. İnsan vücudunda koenzim Q10 (CoQ10) hücrelerde enerji üretimi için zincir reaksiyonunun gerekli bir parçasıdır.

Koenzim Q10 aynı zamanda Q10, Ubiquinone, Ubidecararenone, Mitoquinone, Adelin, Heartcin, Neuquinone, Taidecanone ve 2,3 dimethoxy-5 methyl-6-decaoreny benzoquinone olarak bilinir.

CoQ10 vücut tarafından doğal olarak üretilir. Diyetle alımı açısından, et, tam yağlı tahıllı gevrekler, kahverengi pirinç, makarna, kepekli ekmek, yağlı balıklar, fındık ve sebzelerde bulunur. CoQ10 ticari olarak şeker kamışı ve şeker mayalanması ile yapılır.

CoQ10 gıda takviyesi olarak satılmakta ve genellikle ilaç olarak (tablet ya da kapsül) ağız yoluyla alınmaktadır, ancak damar içinden verilmesi de yaygındır (91). CoQ10 endojen bir antioksidandır ve serbest radikallere karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (92). Evrensel olarak insan hücrelerinde mevcut olan CoQ10, bütün hücre membranlarında yaygın olan bir bileşendir. Ancak, onun en iyi bilinen işlevi, bir elektron taşıma molekülü olarak mitokondriyal enerji üreten sistemin içerisinde yatıyor. CoQ10 yaşam için elzemdir. CoQ10, kinon grupları ile karakterize edilen bir bileşik sınıfına aittir ancak hidrofobik kuyrukların bileşimi ve uzunlukları farklılık gösterir. Karakteristik kinon grubu, çeşitli biyolojik kaynaklardan elektron alabilir ve kararsız yarı kinona 1 elektron transferi yoluyla ya da daha kararlı hidrokinona 2 elektron transfer ederek dönüştürülebilir. Bu özellik CoQ10’nu mitokondriyal solunum zinciri içinde gerçek bir hücresel elektron transferi molekülü yapar. Buna ek

olarak, CoQ10 aynı zamanda güçlü bir hücrel antioksidan olarak tarif edilmektedir. Yaşlanma ve bazı hastalıklar sırasında CoQ10'nun düşük seviyelerde olması, antioksidan aktivitesinden dolayı gıda takviyesi olarak yaygın şekilde kullanılmasının gerekçesini oluşturur (93).

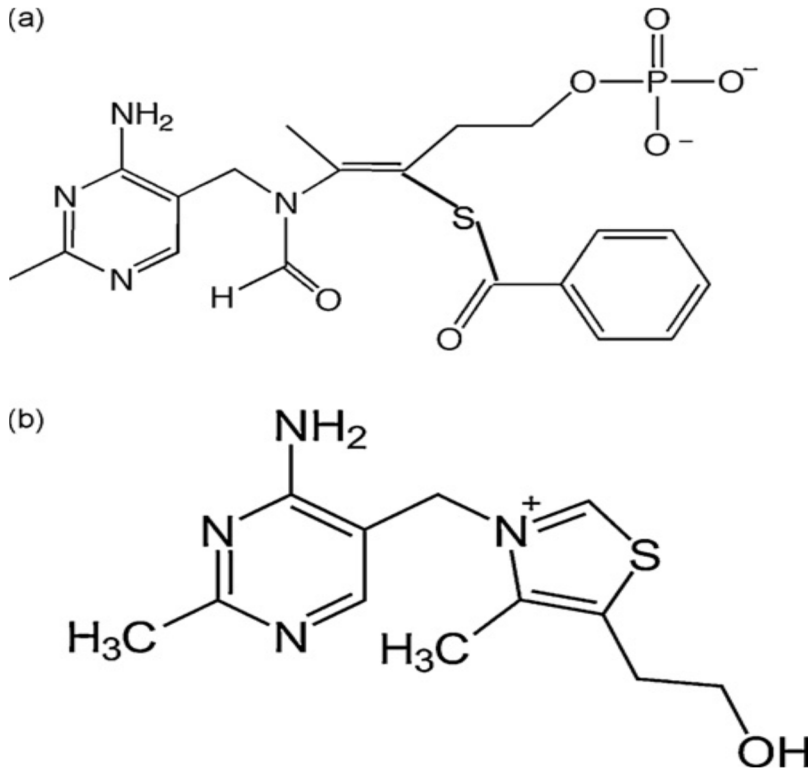
Doğal olarak oluşan CoQ10 güçlü fizyolojik antioksidan olarak çok sayıda çalışma tarafından tarif edilmektedir. Hücre içindeki CoQ10, radikallerin zararlı etkisini ortadan kaldırabilir ve lipid peroksidasyonuna karşı hücrel membranların korunması için önemlidir. Buna bağlı olarak CoQ10 oral takviyesi ya da terapötik bir bileşik olarak etkinliği hala tartışılmasına rağmen, oksidatif stresin yüksek seviyeleri ile ilişkilendirilen bulgulara geniş çapta kullanılmaktadır (94).

CoQ10 birçok dokuda bulunur; Ancak akciğerlerde en düşük, karaciğer, kalp, böbrek ve pankreasta en yüksek seviyede bulunur. CoQ10 seviyesinin yaş ile azaldığı bulunmuştur. Buna mitokondrial CoQ10 seviyesinin azalması neden olur. Araştırmalar aynı zamanda kalp rahatsızlıkları ve kanserli insanların dokularında düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir (95).

3.6. Benfotiamin

Tiamin, başlıca tahılların, baklagillerin, fındık, ekmek, yağsız et ve balıkların içerisinde bulunan suda çözünen bir vitamindir. Tiamin, karbonhidratların enerjiye dönüşüm süreçlerine yardım ettiğinden dolayı hücrel enerji metabolizmasında rol oynamaktadır. Tiamin kalbin, kasların ve sinirlerin normal fonksiyonları için gereklidir ve alımı belirli metabolik bozuklukların tedavisi için önemlidir (96,97). Benfotiamin (BFT), tiaminden çok daha yüksek biyoyararlanıma sahip, yağda çözünen bir tiamin türdeşidir (98, 99). Benfotiamin vücutta tiamine göre daha iyi absorbe edilir ve tiamine göre daha iyi biyoyararlanıma sahiptir (100). Benfotiaminin,

biyoyararlanımının artmasına neden olan, hücre membranına direkt olarak geçmesine olanak tanıyan açık tiazole halka yapısına sahip yağda çözünen tiamin türdeşi olmasıdır (101,102). Giderek artan kanıtlar, benfotiaminin, gelişmiş glikasyon ve ürünlerin oluşumunu inhibe ederek nöropati, nefropati, retinopati gibi diabetik komplikasyonların şiddetini azalttığını ortaya çıkarmaktadır (103,104).



Şekil 6. (a) Benfotiaminin ve (b) Tiaminin Kimyasal Yapısı (105)

Tiaminin aksine, BFT'nin kimyasal yapısı, bileşik emilir emilmez kapanan, biyolojik olarak aktif tiamine dönüşen açık tiazol halkasına sahiptir. Benfotiamin ağızdan alındıktan sonra ilk olarak bağırsak mukoza hücrelerinin fırçamsı kenarlarında var olan alkalin fosfataz ile S-benzoltiamin'e defosforile edilir. Lipofilik S-benzoltiamin absorbe edilir ve daha sonra endotelial hücreler ve bağırsak membranı içinden pasif difüzyon ile difuze olur ve ardından dolaşımda görülür. S-benzoltiaminin önemli bir kısmı eritrositler tarafından yakalanır ve serbest tiamine

dönüştürülür (106). Bu yağda çözünen tiamin analogunun ağızdan alınımından sonra emilimi ve biyoelverişliliği suda çözünen tiamine kıyaslandığında daha yüksektir (107,108). Benfotiamin vücutta daha kolay emilir ve ağızdan alınımı ile plazmada eşdeğer dozdaki tiaminden en az 5 kat daha yüksek konsantrasyonu bulunmasına neden olur (108,109). Benfotiaminin ağız yoluyla alınımı, tiamin, tiaminmonofosfat ve tiamindifosfatın kan ve akciğerdeki seviyesinin önemli oranda artmasına yol açar ama beyinde böyle bir artış oluşturmaz. Bu farklılık benfotiaminin farmolojik kimliği olarak bilinir. Benfotiaminin faydalı ilaç etkisi periferel dokular ile ilişkili olup merkezi sinir sistemi ile ilişkili değildir. Benfotiamin, oldukça iyi emilim kapasitesinden dolayı tiamin eksikliğindeki akut periferel sendromları tedavi etmek için kullanılabilir (110). İyi farmakolojik etkilerinden dolayı ilişkili olduğu bulgularda tedavi etmek için tercih edilebilir.

3.7. Böbrek hasarı molekülü

Böbrek hasarı molekülü (Kidney Injury Molecule-KIM-1), yirmi beş yıl önce keşfedilen böbrek proksimal tübüler hasarı için bir biyobelirteçtir (111). KIM-1; Tip 1 hücre membran glikoproteini olup ekstraselüler kısmında 6 sistein immünglobulin-benzeri bölge, 2 N-glikolizasyon bölgesi ve bir Thr/Ser-Pro'den zengin bölge içerir (112). KIM-1'in sitoplazmik bölgesi nispeten kısadır ve potansiyel bir fosforilasyon bölgesine sahip olup bu da KIM-1'in bir sinyal molekülü olduğunu belirtir; KIM-1 proteinin ekstraselüler bölgedeki kısmı ise metalloproteinazlar tarafından parçalanır. KIM-1 ayrıca T hücre immünglobulin müsin (TIM-1) olarak da bilinir çünkü aktive T hücrelerinin alt popülasyonları tarafından düşük düzeylerde ekspresse edilir (113). Uluslararası ilaç birliği, sisplatin, gentamisin vs. ilaçların oluşturduğu nefrotoksisite durumunda düzenli olarak artan genleri değerlendirmek için tarafsız bir genomik

yaklaşım kullanarak, KIM-1'in test edilen genlerden daha çok arttığını belirlemiştir (114). KIM-1, postiskemik böbreklerde yaygın olarak bulunan apoptotik hücreleri tanıyan ve fagosite eden, böbrek epitelyal hücrelerinin bir fosfotidilserin reseptörüdür. Bu görevi ile normal proksimal tübül hücrelerini fagosit bir hücreye dönüştürme özelliğine sahiptir (115). Sonuç olarak KIM-1 tübüler lümeninden apoptotik artıkların temizlenmesini sağlar ve buna bağlı olarak yaralanmalara karşı otoimmün yanıtın sınırlanmasında önemli bir rol oynayabilir (116).

Sağlıklı böbrekte m-RNA KIM-1 ve protein, düşük seviyede ekspresse edilir ancak hasar sonrası böbrekte önemli ölçüde artar. KIM-1'in hücre yüzeyindeki formu 104 kDa peptittir. Hasar meydana geldikten sonra KIM-1' in ekstraselüler bölgedeki 90 kDa'luk çözünebilir protein olan kısmı (solubl KIM-1) böbrek proksimal tübüllerdeki epitelyal hücrelerden idrara dökülür. Çözünebilir KIM-1 proksimal tübül hücreleri üzerinde koruyucu bir tabaka oluşturabilir (117,118).

Hayvan modelleri üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada epitelyumun diferansiyasyonu ile sonuçlanan toksik veya patofizyolojik durumda KIM-1'in proksimal tübülün etkilenen kısımlarında ekspresse olduğu gösterilmiştir (119). Diferansiyasyon, epitel hücrelerinin hasara karşı yanıtta erken bir göstergesidir (120). KIM-1 böbrek biyopsisindeki tübüler hasarı erken tanımlamak için kullanılan özel bir histopatolojik biyobelirteçdir. KIM-1 en az üç sebepten ötürü böbrek hasarı için öne çıkan bir biyobelirteç olarak düşünülebilir. Birincisi sağlıklı böbrekte saptanmayacak düzeylerde olmasıdır. İkincisi toksik veya iskemik durumlarda proksimal tübülün etkilenen segmenti tarafından ekspresse edilmesidir. Üçüncüsü KIM-1'in ekstraselüler bölgedeki kısmı 12 saat içinde hasarlı hücrelerden idrara

geçmesi ve epitelyumun rejenerasyonundan önce süregelen zaman boyunca idrarla atılmasıdır (121).

KIM-1, in vivo ve in vitro olarak hasarlı epitelyal hücreler üzerinde fagositik fenotipe sahip fosfotidilserin reseptörü olarak tespit edilmiştir. İdrardaki KIM-1'in, yaygın biyobelirteçler ve tübüler enzimler ile kıyaslandığında akut böbrek hasarının erken bir göstergesi olduğu bulunmuştur (118,122). KIM-1 aynı zamanda nefrotoksik hasarlı böbrek için de doku ve idrarda biyobelirteçdir. KIM-1'in doku ve idrarda bulunması sisplatin, gentamisin, cıva, folik asit, kadmiyum ve kromun farklı nefrotoksik dozları ile ölçülür (119,123).

3.8. Tümör Nekroz Faktör- α

Tümör nekroz faktör- α (TNF- α), kronik inflamatuvar hastalıklarda rol oynayan önemli bir sitokindir. Enfeksiyonlardaki önemli rollerinden biri, mikroorganizma enfeksiyonlarının kontrol edilmesinde hücreler arası iletişimin kolaylaştırılmasını sağlamaktadır. Tahmin edileceği gibi, TNF- α inhibe edildiği zaman ciddi enfeksiyonların gelişmesi kolaylaşır ve bir kez geliştikten sonra ortadan kaldırılması da zor olmaktadır. TNF- α aynı zamanda otoimmün hastalıklarda da rol oynamaktadır (124,125).

TNF- α , aktive makrofajlar, T- lenfositler, doğal öldürücü hücreler ve daha az ölçüde endotelyal hücreler, düz kas hücreleri gibi immün-olmayan hücreler üzerinde ekspresse edilen 26 kDa ağırlığında transmembran tip-2 polipeptid prekürsörü (tmTNF) olarak oluşturulur (126,127). tmTNF'nin TNF- α dönüştürücü enzimi tarafından bölünmesi, çözünebilir TNF- α 'yı (sTNF- α) serbest bırakır. TNF- α etkilerini hem bir transmembran proteini (tmTNF- α) olarak hem de çözülebilir homotrimeriksitokin (sTNF- α) olarak ortaya koyar. TNF- α hem transmembran

proteini olarak hem de çözülebilir reseptör olarak ifade edilen TNFR1 ve TNFR2 reseptörlerine bağlanır. TNF- α reseptörleri, farklı sitoplazmik sinyal yollarını indükler (128).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 29/01/2014 tarihli ve 35 no'lu kararı ile etik yönden onaylanarak, Fırat üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM), Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Laboratuvarı, Fırat Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Çalışma süresi 12 ay olarak belirlendi. Çalışmanın Bütçesi Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)' nin TF.14.25 Proje nolu kararı ile sağlandı.

4.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan Wistar-Albino cinsi sıçanlar Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinden (FÜDAM) sağlandı ve Araştırma FÜDAM'da gerçekleştirildi. Deney için 250-300 gr ağırlığında 8 haftalık 35 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Ratlar deney öncesi ve deney sırasında $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, bir günün yarısını (07: 00-19: 00) ışık ve diğer yarısını karanlık (19:⁰⁰- 07:⁰⁰) ortamda tutulan sıçanlar, özel yapılan kafeslerde beslenmeleri ile yaşamlarını sürdürdüler. Yemler; Yem Sanayi T.A.Ş. Elazığ Yem Fabrikasında hazırlandı ve çelik kaplarda su; cam biberon şişelerde çeşme suyu verildi.

Tablo 4. Deney Hayvanlarına Verilen Yemin İçeriği

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) [*]	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%) ^{**}	1,6

^{*} 1 gramında : 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotinamid, 3,2 mg Cal. D. Panth, 0,32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca bulunur.

^{**} % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve DeneySEL İşlemler

Çalışmamızda 8 haftalık 250-300 gr ağırlığında 35 adet Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlara ilk müdahalenin yapılacağı günü tartımları yapıldı ve her grupta 7 tane olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol): Gruptaki sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup II (Sham): Bu grup sıçanlara 8 gün boyunca oral gavaj yoluyla zeytin yağı uygulandı.

Grup III (GM): Bu gruptaki sıçanlara 8 gün boyunca 80 mg/kg/gün gentamisin sıvı (ampül) formu i.p. yolla uygulandı.

Grup IV (GM+CoQ10): Bu gruptaki sıçanlara 8 gün boyunca 80 mg/kg/gün gentamisin sıvı (ampül) formu i.p. yolla ve 10 mg/kg/gün CoQ10 zeytin yağında çözülerek i.p. yolla uygulandı.

Grup V (GM+BFT): Bu gruptaki sıçanlara 8 gün boyunca 80mg/kg/gün gentamisin sıvı (ampül) formu i.p. yolla ve 100 mg/kg/gün BFT zeytin yağında çözülerek oral gavaj yoluyla uygulandı.

Deney süreci başlangıcında ve 8. günün sonunda bütün hayvanların kilo değişimleri takip edildi. Deney sonunda tüm gruplardaki sıçanlara i.p. yolla ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) uygulanarak anestezi altında dekapitasyon yapılarak kan örnekleri, analizler için uygun olacak biçimde düz ve EDTA'lı biyokimya tüplerine alındı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) plazma ve serumları ayrıldı. Elde edilen plazma ve serumlar küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu ve analiz için -20°'de muhafaza edildi.

4.3. Biyokimyasal Analiz

Deney hayvanlarından alınan plazma ve serum örneklerinin analizleri Fırat Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı.

4.3.1. Malondialdehit Tayini

Lipid peroksidasyonunu belirlemek için lipid peroksidasyonun son ürünü olan Malondialdehit miktarları ölçülmüştür. MDA düzeyleri HPLC cihazında (Shimadzu 20A prominence) ImmuChrom kitleri aracılığı ile plazma örneklerinde tayin edilmiştir. Plazma MDA ölçüm yöntemlerinde aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

1. 1.5 ml reaksiyon tüplerine 20 mikrolitre örnek (plazma), kalibratör ve 1 ml türevlendirme solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı (vorteksde 15 saniye)

2. 95°C’de 60 dakika inkübe edildi; Örnekler 2-8°C’de soğutuldu ve 5 dakika 10.000g’de sentrifüj edildi.
3. 500 µl süpernatant 500 µl reaksiyon solisyonu ile karıştırıldı.
4. 20 µl süpernatant HPLC sistemine kromatografi için enjekte edildi.
5. Sonuçlar µmol/l cinsinden ifade edildi.

Plazma MDA ölçümü için kromatografik koşullar ise;

Kolon: ODS 2 C18 (5 µm partikül boyutu, 125 µX4 mm).

Akım hızı: 0.8-1.0 ml /dk

Floresan tespiti: Eksitasyon 515 nm, Emisyon 553 nm

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Çalışma süresi: 4 dk

Sıcaklık: 30 °C

Intra-Assay CV: % 9,0 (0,86 µmol/l) [n=6]

% 6,4 (2,55 µmol/l) [n=6]

Inter-Assay CV: % 10,9 (0,89 µmol/l) [n=6]

% 7,5 (2,50 µmol/l) [n=6]

Linearite: 50 µmol/l’ e kadar

Tespit limiti: 0,01 µmol/l

Geri kazanım: %95,7

4.3.2. Glutasyon tayini

Redükte ve total glutasyon düzeyleri, HPLC cihazında (Shimadzu 20A prominence) Immuchrom kitleri aracılığıyla EDTA’lı tüplerdeki tam kan örneklerinde tespit edilmiştir. Glutasyon ölçüm yöntemindeki takip edilen basamakların sırası aşağıdaki gibidir:

1. 1,5 ml reaksiyon tüpleri içine 100 mikrolitre numune, kalibratör ve 200 mikrolitre dilüsyon solisyonu eklendi ve vortekslendi.
2. Total glutatyon ölçümü için 50 mikrolitre seyreltilmiş örnek, 100 ml internal standart, 20 ml redüksiyon solisyonu, 100 ml türevlendirme solisyonu karıştırıldı.
3. Redükte glutatyon ölçümü için 50 mikrolitre seyreltilmiş örnek, 100 mikrolitre reaksiyon tamponu ve 100 mikrolitre türevlendirme solisyonu karıştırıldı.
4. İki karışım da 60°C de 20 dakika inkübe edildi.
5. İki karışımada 100 ml presipitasyon solusyonu eklendi.
6. 2-8 °C de 10 dakika inkübe edildi ve 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. 200 ml reaksiyon tamponuna 100 ml süpernatant ilave edildi.
8. HPLC sistemine reaksiyon için 20 mikrolitre enjekte edildi.

Glutatyon ölçümü için kromatografik koşullar;

Kolon: ODS 2 C18 (5 µm partikül boyutu, 125 µX4 mm).

Akım hızı: 0.75-1.0 ml /dk

Floresan tespiti: Eksitasyon 385 nm, Emisyon 515 nm

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Çalışma süresi: 4 dk

Sıcaklık: 30 °C

Analiz sonuçlarının hesaplanması

Total Glutatyon

$$\text{Örnek konsantrasyonu} = \frac{\text{Hasta Pik Alanı} \times \text{Kalibratör Konsantrasyonu}}{\text{Hasta Pik Alan Internal Standartı (IS)}} \times F$$

$$F = \frac{\text{Kalibratörün Pik Alan Internal Standartı}}{\text{Kalibratörün Pik Alanı}}$$

Redükte Glutasyon

$$\text{Örnek Konsantrasyon} = \frac{\text{Hasta Pik Alanı} \times \text{Kalibratörün Konsantrasyonu}}{\text{Kalibratör Pik Alanı}}$$

Intra-Assay CV: Total GSH: %1,2 (551 mikromol/l) [n=6]

Redükte GSH: %1,2 (286 mikromol/l) [n=6]

İnter-Assay CV: Total GSH: %2,8 (554 mikromol/l) [n=6]

Redükte GSH: %3,5 (271 mikromol/l) [n=6]

Linearite: Total GSH: 15mikromol/l' e kadar

Redükte GSH: 15 mikromol/l' e kadar

Tespit limiti: Total GSH: 2 mikromol/l

Redükte GSH: 0.4mikromol/l

4.3.3. KİM-1 molekülü tayini

Serum örnekleri -20°C'den çıkarılıp çözüldükten sonra ticari rat KİM-1 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kiti (Boster Immunoleader, katalog no: EK0882) ile kit çalışma prosedürüne uygun bir şekilde çalışıldı. Rat KİM-1 ELISA kiti çalışma prensibi sandviç ELISA teknolojisi prensibine dayanır. Bu yöntemde serum örnekleri ve standartlar KİM-1'e spesifik poliklonal antikor ile kaplı kuyucuklara pipetlendi. Üzerine KİM-1'e spesifik biyotinlenmiş ikinci poliklonal anti-human antikor eklendi ve PBS tamponu ile yıkandı. Takiben Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi eklendi ve bağlı olmayan konjugatlar PBS tamponu ile uzaklaştırıldı. Horseradish peroxidase (HRP)'ın substratı olan Tetramethyl benzidine (TMB), enzimatik reaksiyonunun görünür olması için kullanıldı. TMB, HRP aracılığı ile mavi renkli bir ürün oluşturmak üzere katalize oldu. Asidik stop

solüsyonunun eklenmesiyle sarı renge dönüştü. Oluşan rengin şiddeti 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak Bio-tek ELX800 (BioTek Instruments, USA) marka ELISA plate okuyucusunda okutuldu. Sarı rengin yoğunluğu rat KIM-1'in miktarı ile orantılıdır. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edilmiştir. KIM-1 için sensitivite < 2 pg/mL, ölçüm aralığı 31.2-2000 pg/mL, intra-assay CV $< 5,3$, inter-assay CV $< 6,8$ 'dir.

4.3.4. TNF- α Molekülü Tayini

TNF- α düzeyleri sandviç ELISA yöntemi ile ticari kit (YH Biosearch Laboratory, Katalog No: YHB1098Ra) kullanılarak tespit edildi. Bu yöntemde serum örnekleri ve standartlar TNF- α 'a spesifik poliklonal antikor ile kaplı kuyucuklara pipetlendi. İnkübasyondan sonra üzerine biyotin ile işaretlenmiş ikinci anti-TNF antikorları immün kompleks oluşturmak üzere eklendi. İnkübasyondan sonra bağlanmamış antikor yıkanarak uzaklaştırıldı. Bunu takiben kuyucuklara streptavidin-peroxidaz enzim konjugatı eklenerek biyotinlenmiş antikorlarla bağlanması sağlandı. İkinci inkübasyondan sonra kuyucuklardaki bağlı olmayan antikor-enzim konjugatı yıkanarak uzaklaştırıldı. Kuyucuklara kromojen bir substrat eklenerek üçüncü inkübasyondan sonra enzimatik aktivite sonucu oluşan rengin şiddeti 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak Bio-tek ELX800 (BioTek Instruments, USA) marka ELISA plate okuyucusunda okutuldu. Oluşan rengin şiddeti örnekte mevcut TNF- α konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Sonuçlar ng/L olarak ifade edilmiştir. TNF α için sensitivite 2.51 nL/L, ölçüm aralığı 5-1000 ng/L, intra-assay CV < 10 , inter-assay CV < 12 'dir.

4.3.5. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Diğer biyokimyasal analizler olan serumda üre, kreatinin, Na ve K düzeyleri Siemens 2400 (Siemens Healthcare Diagnostics, Germany) otoanalizöründe Siemens marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

4.4. Böbrek histopatolojisi

Çalışmanın devamında ratların böbrek dokuları hızla çıkarılarak çalışma histopatolojik incelemeler için hazırlandı. Dokular % 10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Fiksasyonu takiben 24 saat süreyle musluk suyunda yıkanarak fiksatif dokulardan uzaklaştırıldı.

Tablo 5. Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Ksilol	15 dakika
8	Ksilol I	10 dakika
9	Ksilol II	20 dakika
10	Yumuşak parafin + Ksilol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 Saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

Rutin etanol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler alınarak Hematoksilen&Eozin, Masson's Trichrome ve Periodic Acid Schiff (PAS) teknikleriyle histokimyasal boyama ve apoptozis belirteci olarak da TUNEL boyaması uygulandı.

4.4.1. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptozise giden hücreler gözlemlendi.

Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 6).

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopla incelenip fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı.

Tablo 6. TUNEL Boyama basamakları

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3x15dakika
3	% 100, % 96, % 80, % 70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1: 500 dilüsyondakiProteinaz K solüsyonu	7 dakika
7	PBS	3x5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı	5 dakika
9	PBS	3x5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	6 dakika
11	Çalışma solüsyonu (% 77 µl ReactionBuffer + % 33 TdTEnzyme) 37oc'de	60 dakika
12	Stop/WashBuffer (1 ml) +Distile su (34 ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3x5 dakika
15	DAB DilutionBuffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3x5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	% 80, % 96 ve % 100 etil alkol	1'er dakika
21	Ksilol	2x5 dakika
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

TUNEL boyanmasının anlamlılığı boyanmanın yaygınlığına göre 0 (yok), +1 (az), +2 (orta) ve +3 (yaygın) şeklinde semi-kantitatif olarak değerlendirildi (Tablo 7).

Tablo 7. TUNEL boyama yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Yaygın

4.5. İstatiksel Analizler

Gruplar arasında parametrelerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Parametreler arasındaki korelasyonun tespit edilmesinde Pearson's korelasyon analizinden yararlanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma ($\pm$ SD) olarak ifade edildi ve $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

5. SONUÇLAR

5. 1. Gruplara ait vücut ağırlık değerleri

Çalışma sonunda ölçülen vücut ağırlığı ortalamaları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Gruplara ait vücut ağırlıkları Tablo 8’de gösterilmektedir.

Tablo 8. Gruplara ait vücut ağırlığı ortalamaları

Gruplar	1. gün ağırlık (g)	8. Gün ağırlık (g)	P
KONTROL (n: 7)	431,85±27,17	433,85±42,07	AD
SHAM (n: 7)	353,42±25,87	361,00±27,17	AD
GENTA (n: 7)	310,14±9,68	307,71±10,98	AD
GENTA+COQ (n: 7)	278,28±11,85	279,42±12,72	AD
GENTA+BENFO (n: 7)	256,14±12,82	254,00±32,21	AD

5. 2. Biyokimyasal Parametreler

5. 2.1. Na, K, Üre ve Kreatinin değerleri

Biyokimyasal parametrelerden serum üre, kreatin, Na ve K değerleri Tablo 9’de verilmiştir.

Tablo 9. Serum Na, K, üre ve kreatinin değerleri

	Kontrol (n: 7)	SHAM (n: 7)	GM (n: 7)	GM+CoQ10 (n: 7)	GM+BFT (n: 7)
Üre (mg/dL)	62.57±14.93 ^{a,b}	54.57±8.61 ^{c,d}	198.71±132.03 ^e	199.14±50.72 ^e	109.28±54.91
Kreatinin (mg/dL)	0.25±0.05 ^{a,f}	0.23±0.03 ^{c,f}	2.80±2.20 ^g	2.10±1.10 ^e	0.65±0.53
Na (mEq/L)	141,00±4,28	139,85±4,14	138,85±2,79	138,28±,95	139,00±1,41
K (mEq/L)	6,01±,43	6,04±,30	5,82±,42	5,64±,41	5,97±,70

^aP<0.001, grup 3 ile karşılaştırıldığında

^bP<0.001, grup 4 ile karşılaştırıldığında

^cP<0.05, grup 5 ile karşılaştırıldığında

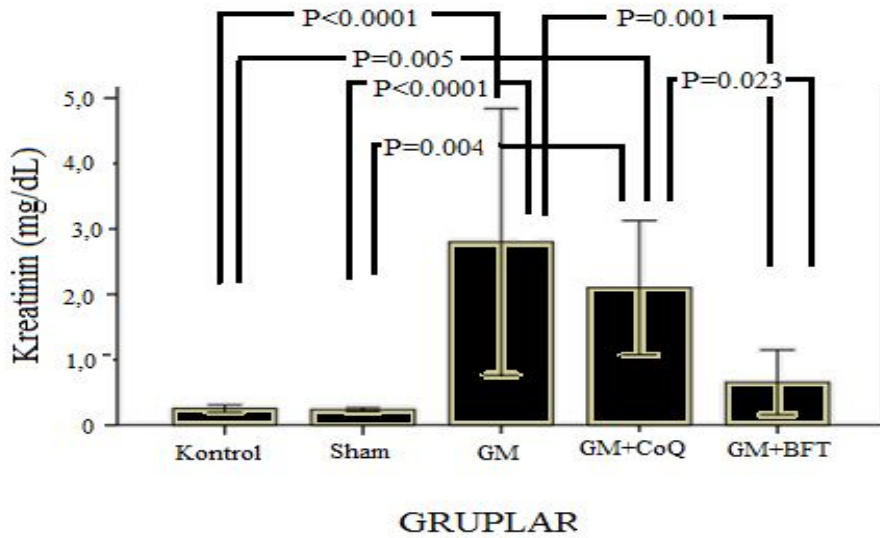
^gP<0.001, grup 5 ile karşılaştırıldığında

^eP<0.0001, grup 3 ile karşılaştırıldığında

^dP<0.0001, grup 4 ile karşılaştırıldığında

^fP<0.005, grup 4 ile karşılaştırıldığında

Çalışma grupları arasında Na ve K düzeyleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Üre düzeyleri, GM grubunda, kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı (sırayla $p<0.001$, $p<0.0001$). GM ile birlikte BFT uygulana grupta (GM+BFT grubu) üre düzeyleri sadece GM uygulanan gruba göre (GM grubu) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı ($p<0.05$). Ancak GM ile birlikte CoQ10 uygulanan grupta (GM+CoQ10 grubu) üre düzeyleri GM uygulanan grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Kreatinin düzeyleri de üre düzeylerine benzer değişim göstermiştir. GM grubunda kreatinin düzeyleri kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulundu (sırasıyla, $p<0.001$, $p<0.0001$). GM+BFT grubunda ise kreatinin düzeyleri GM grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($P<0.05$). GM+CoQ10 grubunda ise kreatinin düzeyleri GM grubuna göre azalma görülse de bu istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 7. Kreatinin düzeyi

5. 2.2. Serum MDA ve Glutasyon düzeyleri

Tablo 10’da MDA ve Glutasyon değerleri verilmiştir.

Tablo 10. Serum MDA ve Glutasyon düzeyleri

	Kontrol (n: 7)	SHAM (n: 7)	GM (n: 7)	GM+CoQ10 (n: 7)	GM+BFT (n: 7)
T.Glutasyon ($\mu\text{mol/l}$)	985.28 $\pm$ 129.27 ^a	977.57 $\pm$ 117.01 ^a	1127.14 $\pm$ 131.20 ^a	1008.00 $\pm$ 146.91 ^a	1599.14 $\pm$ 248.34
R.Glutasyon ($\mu\text{mol/l}$)	674.00 $\pm$ 101.36 ^{b,a}	715.42 $\pm$ 141.09 ^a	862.57 $\pm$ 163.35 ^a	829.71 $\pm$ 163.87 ^a	1396.57 $\pm$ 173.43
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	0.66 $\pm$ 0.09 ^{c,d,a}	0.68 $\pm$ 0.03 ^{c,e,a}	1.29 $\pm$ 0.07 ^{d,a}	0.80 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.09

^aP<0.0001, grup 5 ile karşılaştırıldığında

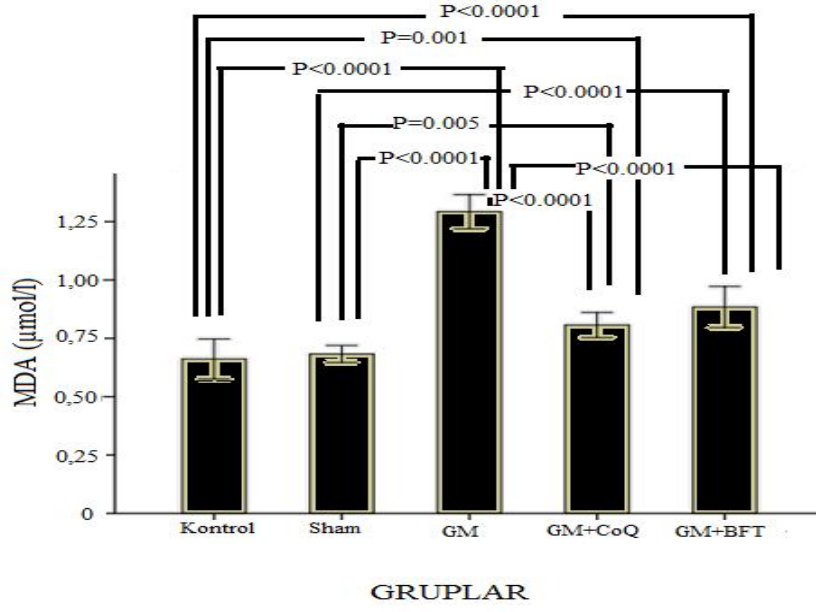
^cP<0.0001, grup 3 ile karşılaştırıldığında

^bP<0.05, grup 3 ile karşılaştırıldığında

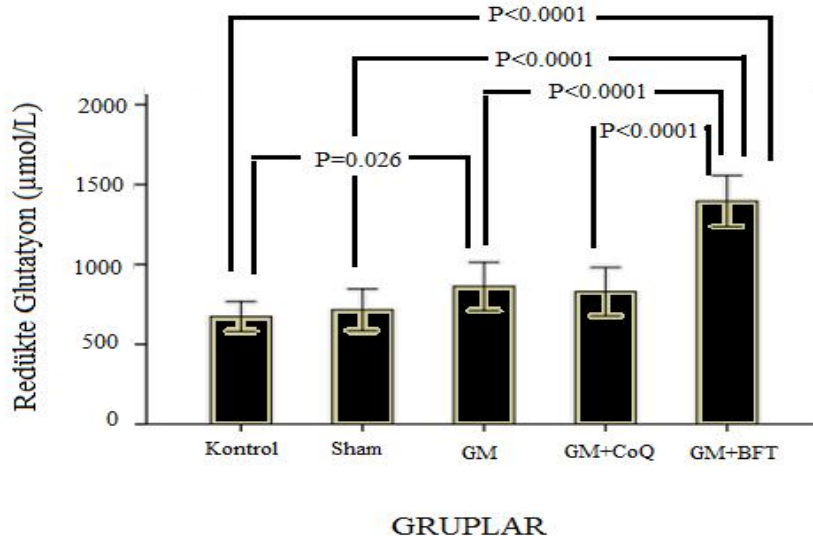
^dP<0.001, grup 4 ile karşılaştırıldığında

^eP<0.005, grup 4 ile karşılaştırıldığında

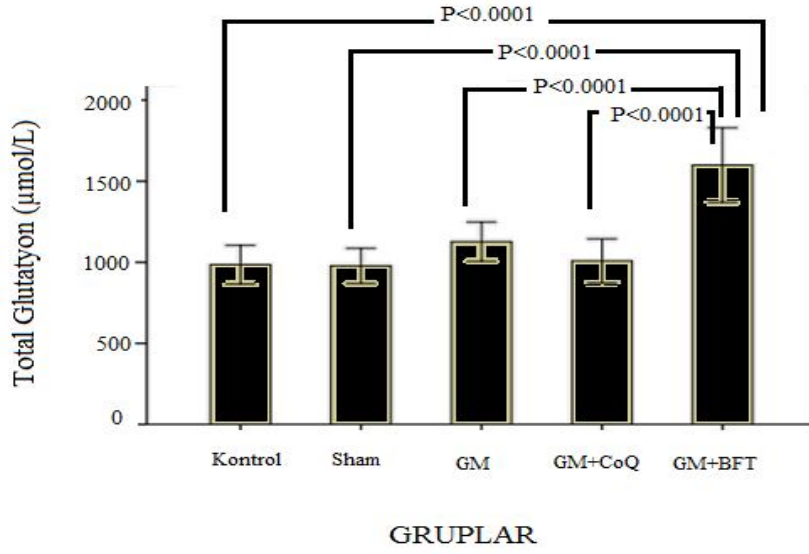
Total ve redükte glutasyonun en düşük düzeyleri kontrol ve sham gruplarında görülmüştür. GM grubunda total glutasyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Redükte glutasyon düzeylerinde ise bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0.05). GM+BFT grubunda total ve redükte glutasyon düzeylerindeki artış diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (P<0.0001). MDA düzeylerinin en yüksek değerleri GM grubunda görülmektedir. GM grubunda MDA düzeyleri kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (P<0.0001). GM+CoQ10 grubu ve GM+BFT grubunda MDA düzeyleri GM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır (sırasıyla; P<0.001, P<0.0001).



Şekil 8. MDA düzeyi



Şekil 9. Redükte Glutasyon Düzeyi



Şekil 10. Total Glutatyon Düzeyi

5.2.3. Serum KİM-1 ve TNF- α düzeyleri

Tablo 11’de KİM-1 ve TNF- α değerleri verilmiştir.

Tablo 11. Sıçanlardan alınan kandan ölçülen KİM-1 ve TNF- α düzeyleri

	Kontrol (n: 7)	SHAM (n: 7)	GM (n: 7)	GM+CoQ10 (n: 7)	GENTA+BFT (n: 7)
TNF (ng/L)	148.25±14.57 ^a	151.34±6.80 ^{b,a}	156.33±4.36 ^{b,c}	139.42±12.56	134.91±9.15
KIM1 (pg/ml)	127.56±38.52 ^d	147.86±28.48	183.40±15.83 ^e	152.40±30.41 ^a	111.94±50.47

^ap<0.05, grup 5 ile karşılaştırıldığında

^bp<0.05, grup 4 ile karşılaştırıldığında

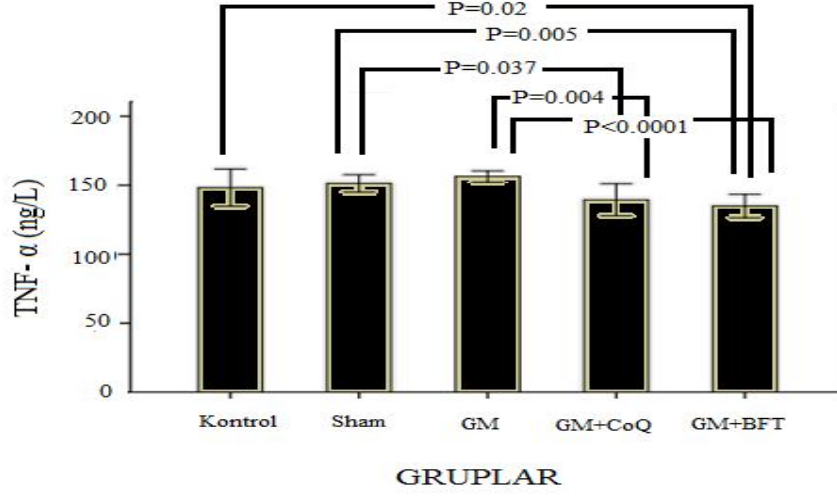
^cp<0.001, grup 5 ile karşılaştırıldığında

^ep<0.0001, grup 5 ile karşılaştırıldığında

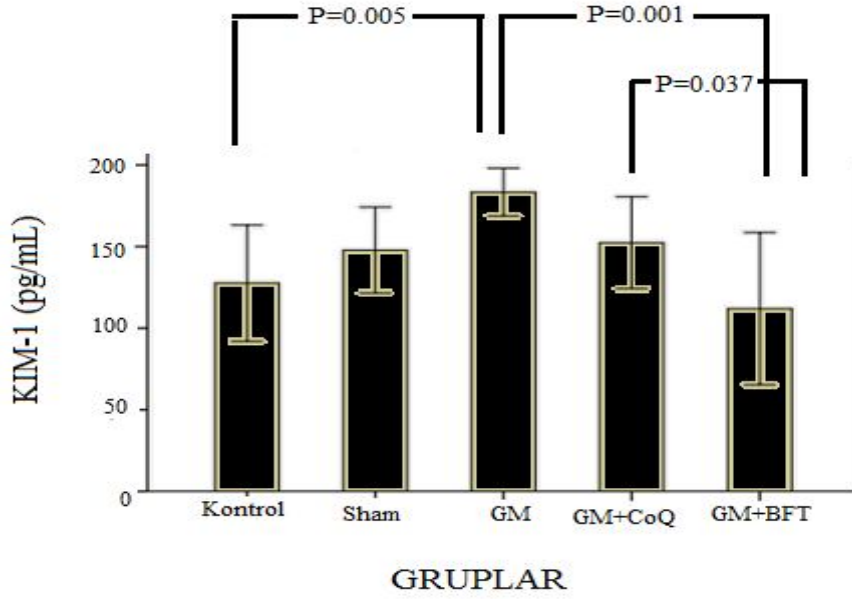
^dp<0.005, grup 3 ile karşılaştırıldığında

GM grubunda TNF- α düzeyleri kontrol ve sham grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak TNF- α düzeyleri hem GM+CoQ10 hem de GM+BFT grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (sırayla p<0.05, p<0.0001). KİM düzeyleri GM grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (P<0.005). GM+CoQ10 grubunda KİM düzeyleri GM grubuna göre azalmış olsa da

bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ancak GM+BFT grubundaki düşüş GM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.001$).



Şekil 11. TNF- α düzeyleri

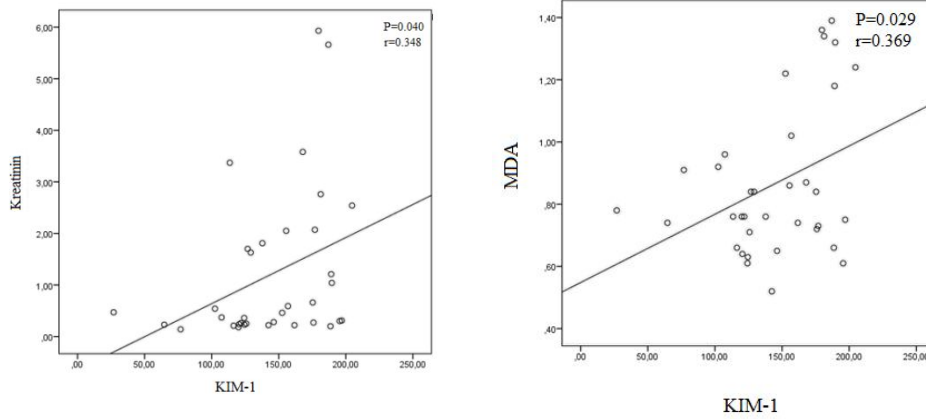


Şekil 12. KIM-1 düzeyleri

Tablo 12. Tüm Gruplarda KIM-1 ile diğer biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon

	Korelasyon Katsayısı	
	(<i>r</i>)	<i>P</i>
TNF (ng/L)	0.23	0.169
Kreatinin (mg/dL)	0,348	0,040
Total Glutasyon (μmol/l)	-0,144	0,408
Redükte Glutasyon (μmol/l)	-0,199	0,252
MDA (μmol/l)	0,369	0,029

Tablo 12’de serum KIM-1 düzeyi ile diğer biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon görülmektedir. Serum KIM-1 düzeyi ile serum kreatinin ve MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde pozitif bir korelasyon saptandı (sırası ile; $r=0,348$ $p=0,040$; $r=0,369$, $p=0,029$), ancak total glutasyon, redükte glutasyon ve TNF- α arasında korelasyon saptanamadı.



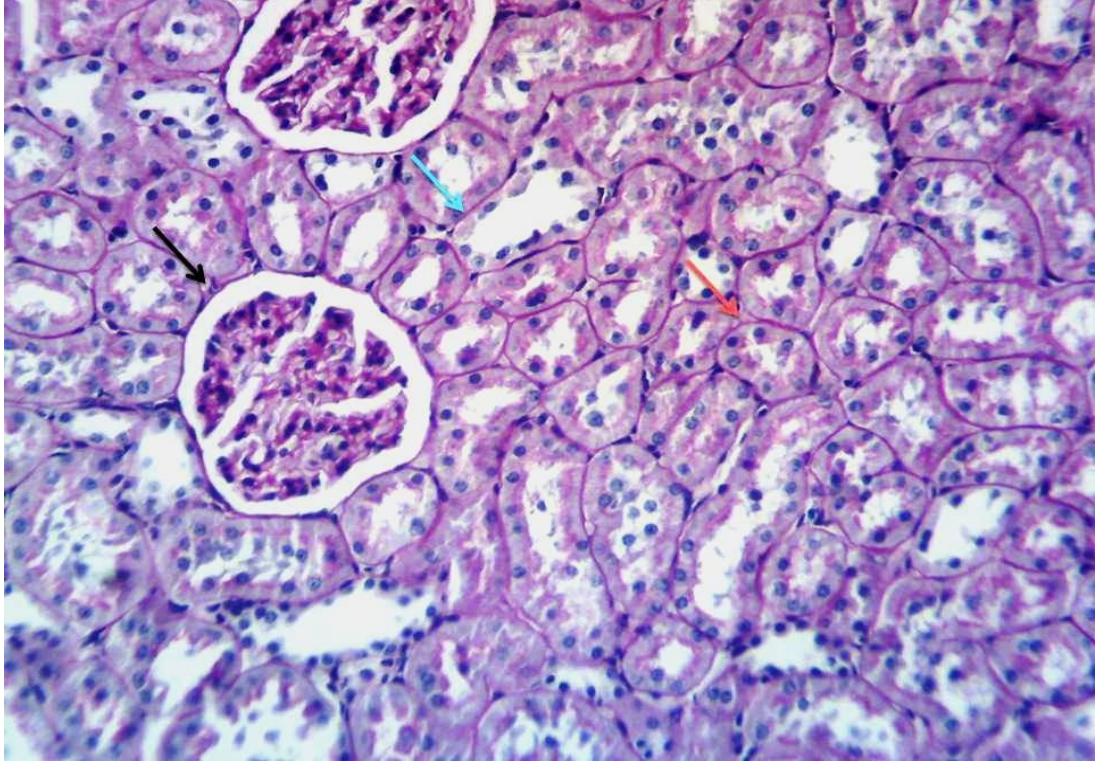
Şekil 13. KIM-1 düzeyinin MDA ve kreatinin düzeyleri ile korelasyonu

5.2.4. Histokimyasal Bulgular

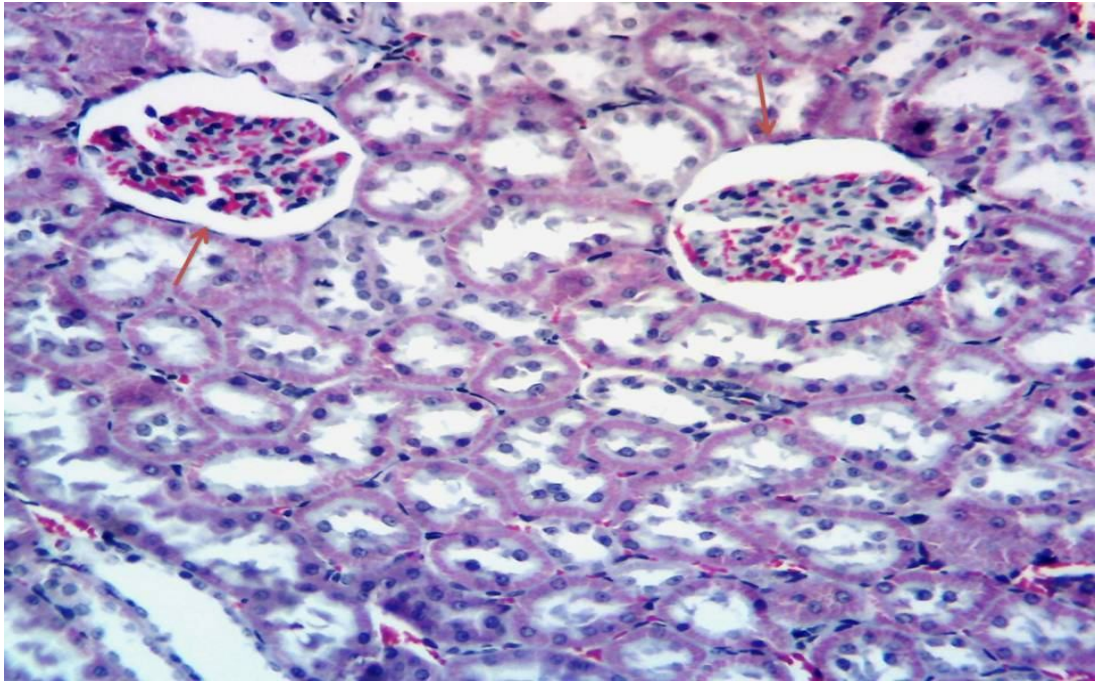
Kontrol ve zeytinyağı verilen grupta, böbrek glomerulleri, kortikal ve medullar bölgede yer alan tübüller ve peritübüler bölge normal yapıda ayırt edildi (Şekil 14,15). Sadece gentamisin uygulanan gruba ait böbrek dokusunda kortekste yer alan tübüllerde oldukça belirgin nekroz, medular tübüllerde hyalen benzeri madde birikimi dikkat çekiciydi (Şekil 16,17). Gentamisin ile birlikte benfotiamin uygulanan grupta kortekste tübüllerde nekrozun ve medullar tübüllerde hyalen benzeri madde birikiminin oldukça azaldığı tespit edildi (Şekil 18). Gentamisin ile birlikte CoQ10 uygulanan deneklere ait böbrek dokularında kortikal tübüllerdeki nekroz sadece gentamisin uygulanan gruba göre azalmakla birlikte benfotiamin grubuna göre belirginliğini korumaktaydı (Şekil 19). Medullar tübüllerdeki hyalen benzeri madde birikimi CoQ10 uygulaması ile de azalma göstermekteydi.

5. 2.4.1. TUNEL Bulguları

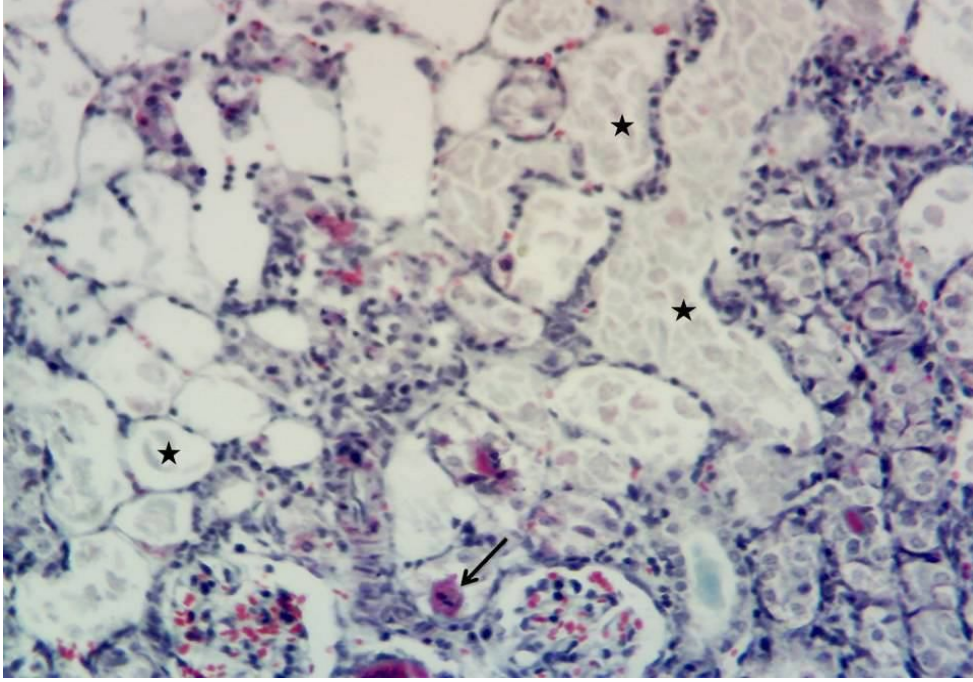
Kontrol ve zeytinyağı uygulanan gruplarda kortekste yer alan tübüllerin TUNEL pozitifliği +1 olarak tespit edildi (Şekil 20). Sadece gentamisin uygulanan deneklerde ise TUNEL pozitifliği oldukça yaygındı ve +3 olarak ayırt edildi (Şekil 21,22). Gentamisin ile birlikte benfotiamin uygulanan grupta ise TUNEL pozitiflik +1 olarak değerlendirilirken, Gentamisin ile birlikte CoQ10 uygulanan grupta +2 yaygınlığında saptandı (Şekil 23, 24).



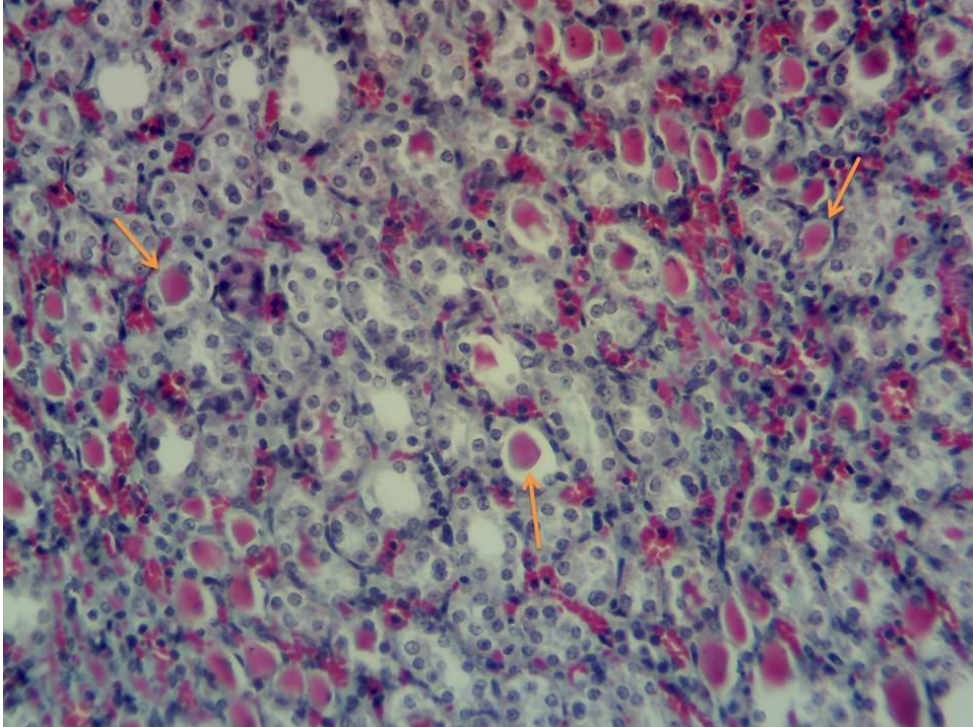
Şekil 14. Kontrol grubunda böbrek korteksinde yer alan glomerulus (siyah ok), proksimal (turuncu ok) ve distal (mavi ok) tübüller ve bu yapıların bazal membranları normal olarak ayırt edilmekte. PAS x200



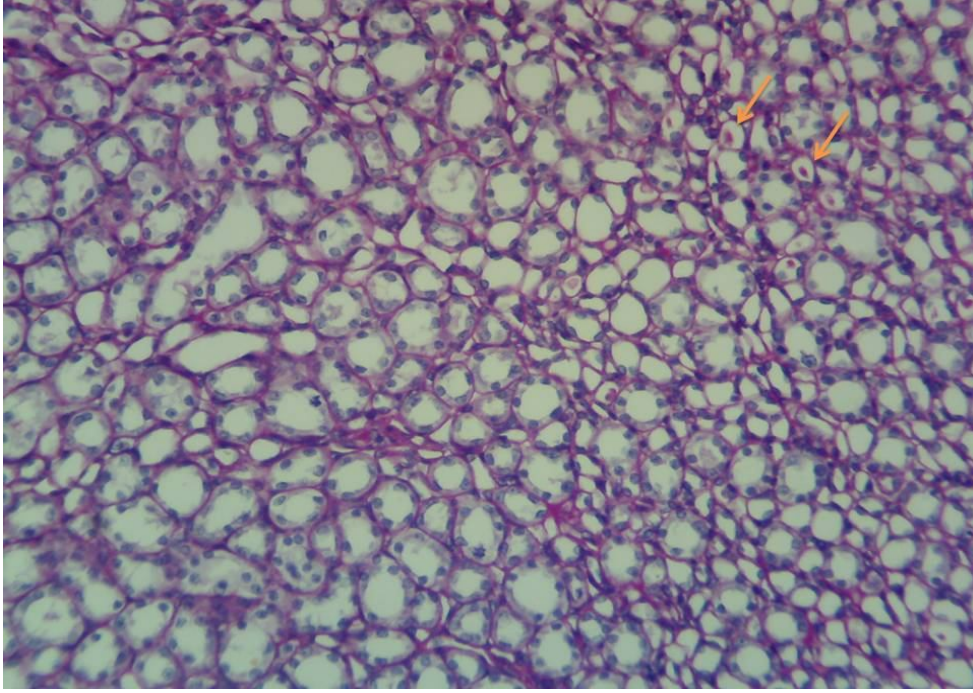
Şekil 15. Sham grubunda böbrek korteksinde yer alan glomerulus (ok) ve tübüller normal yapıda gözlenmekte. Masson'nun Üçlü Boyaması x200



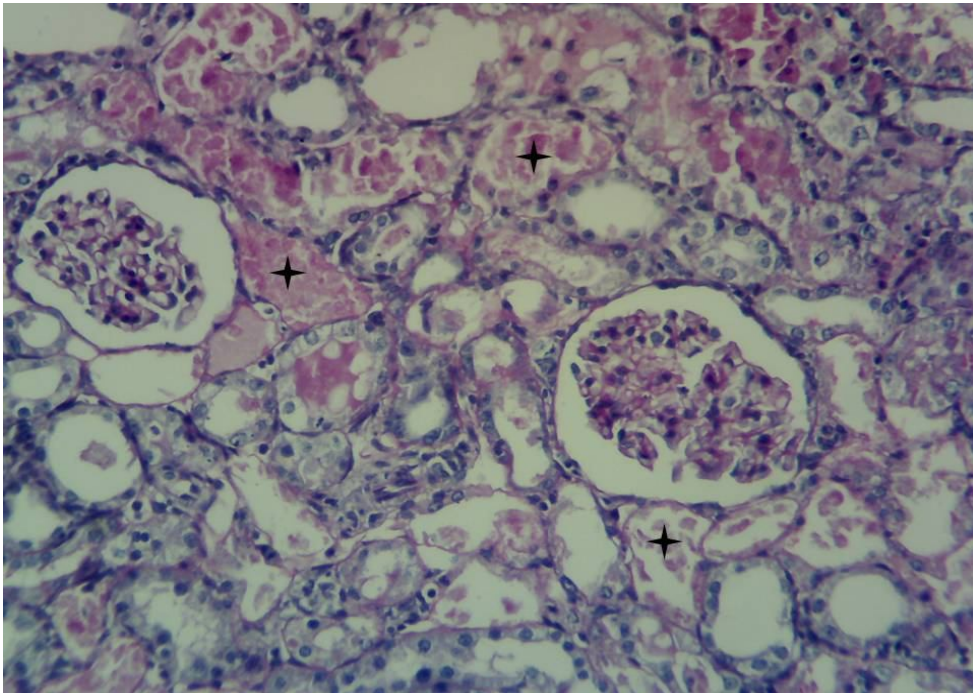
Şekil 16. Gentamisin uygulanan grupta, kortikal tübüllerde belirgin nekroz (*), tübül lümenlerinde eozinofilik sitoplazmalı ve heterokromatik çekirdekli hücre dökülmeleri (ok). Masson'nun Üçlü Boyaması



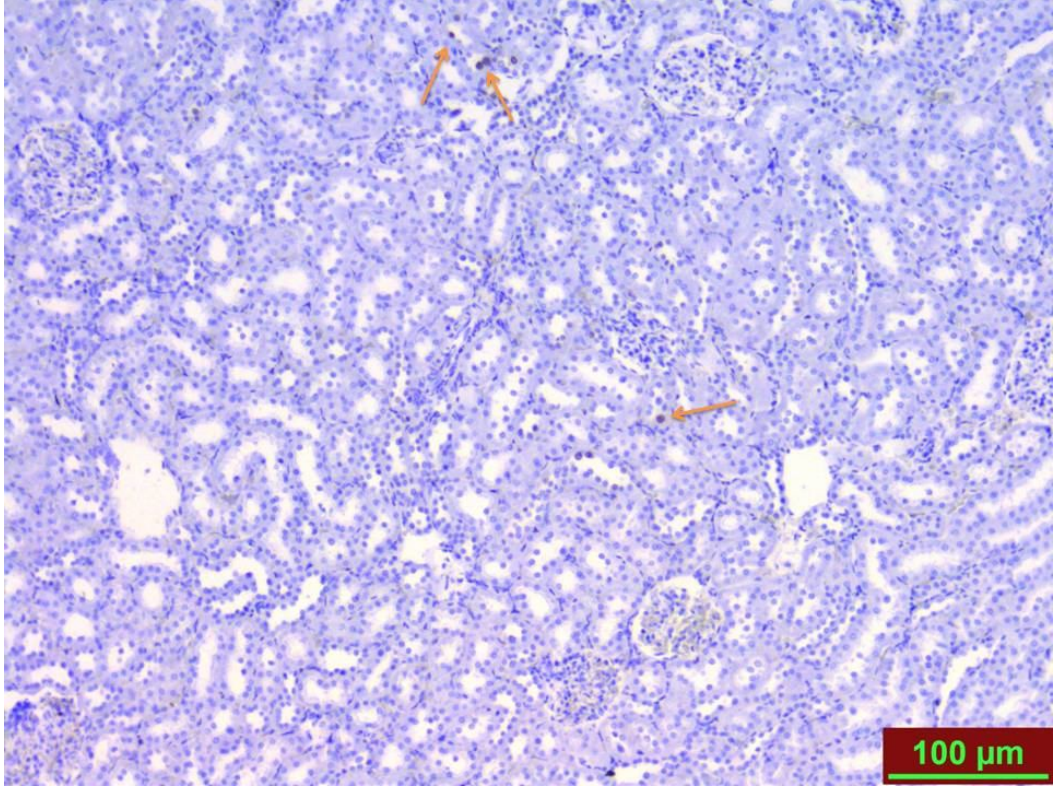
Şekil 17. Gentamisin uygulanan grupta, medullar bölgede yer alan tübüllerde hyalen benzeri madde birikimi (ok). PAS x200



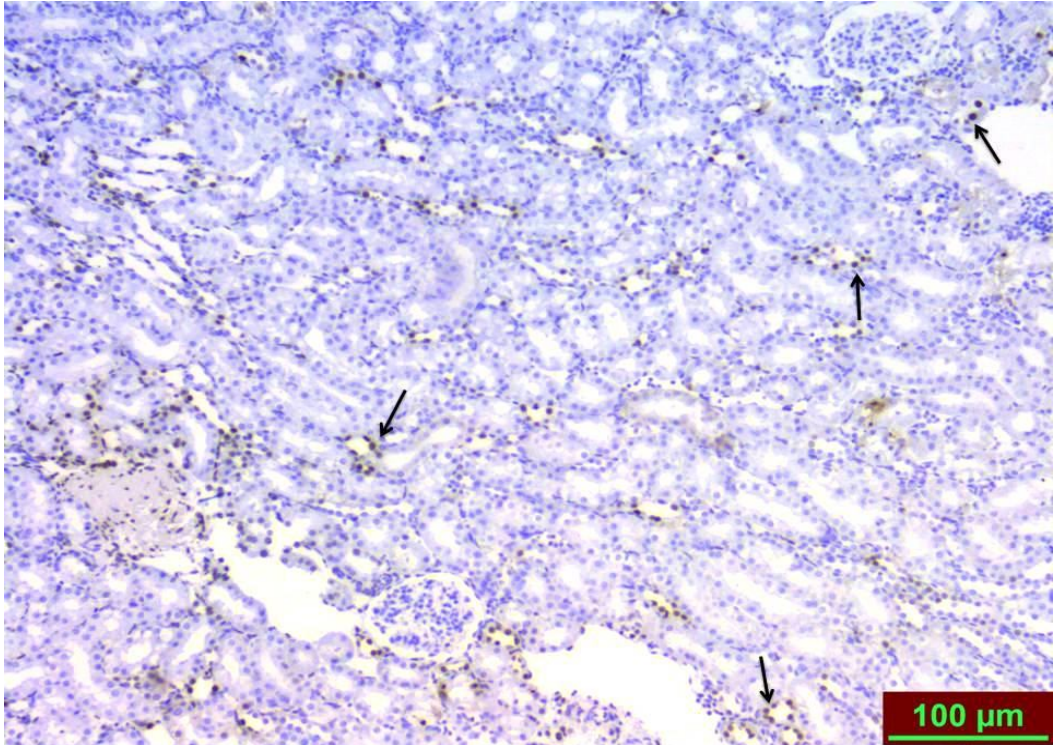
Şekil 18. Gentamisin + Benfotiamin uygulanan grupta, meddullar tübüllerde az miktardaki hyalen benzeri madde birikimi. PAS x200



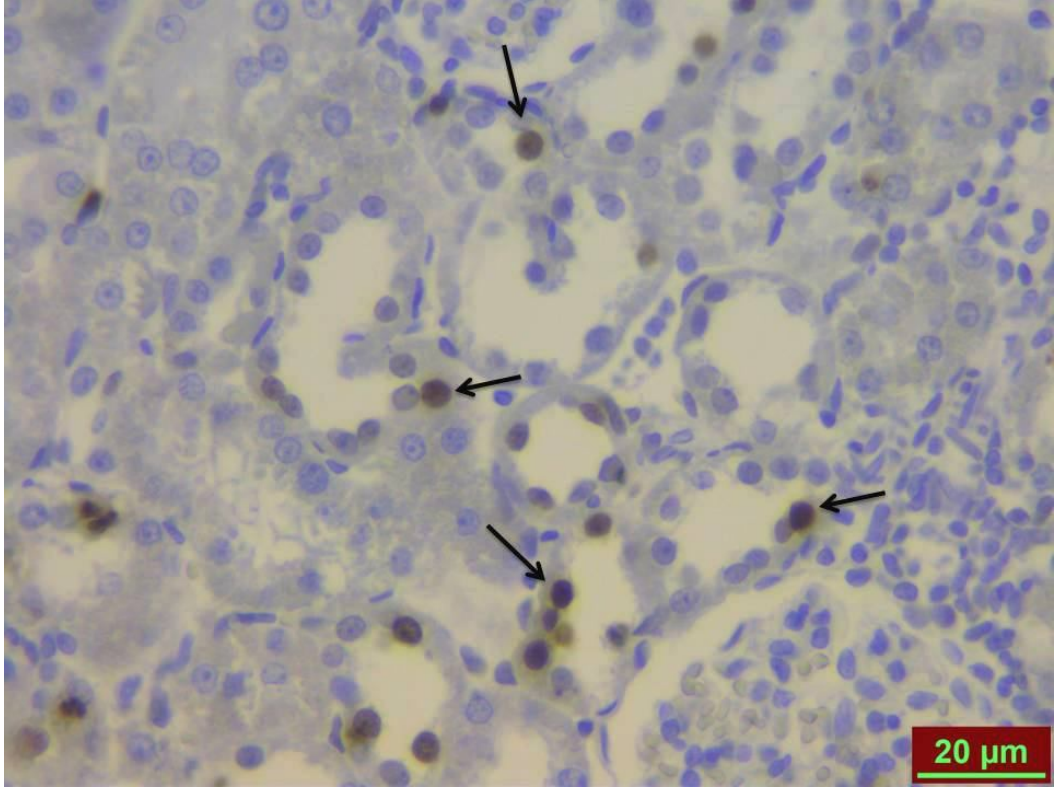
Şekil 19. Gentamisin + CoQ10 uygulanan grupta kortekste yer alan nekroze tübüller (*). PAS x200



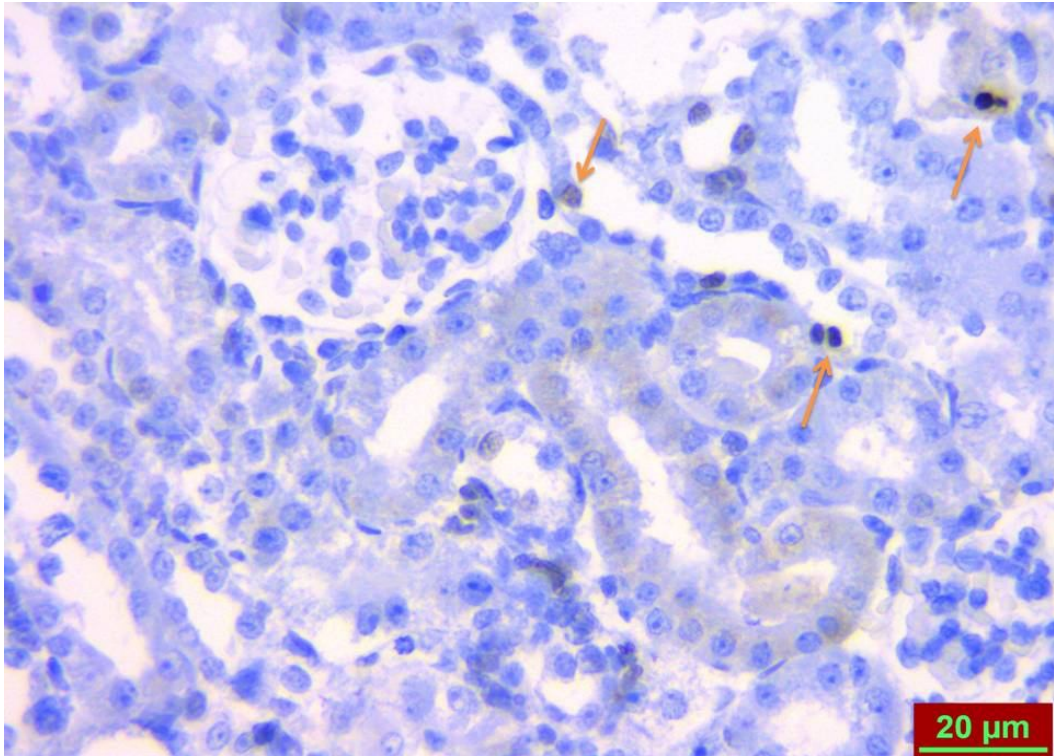
Şekil 20. Kontrol grubunda +1 TUNEL pozitifliği ayırt edilmekte.



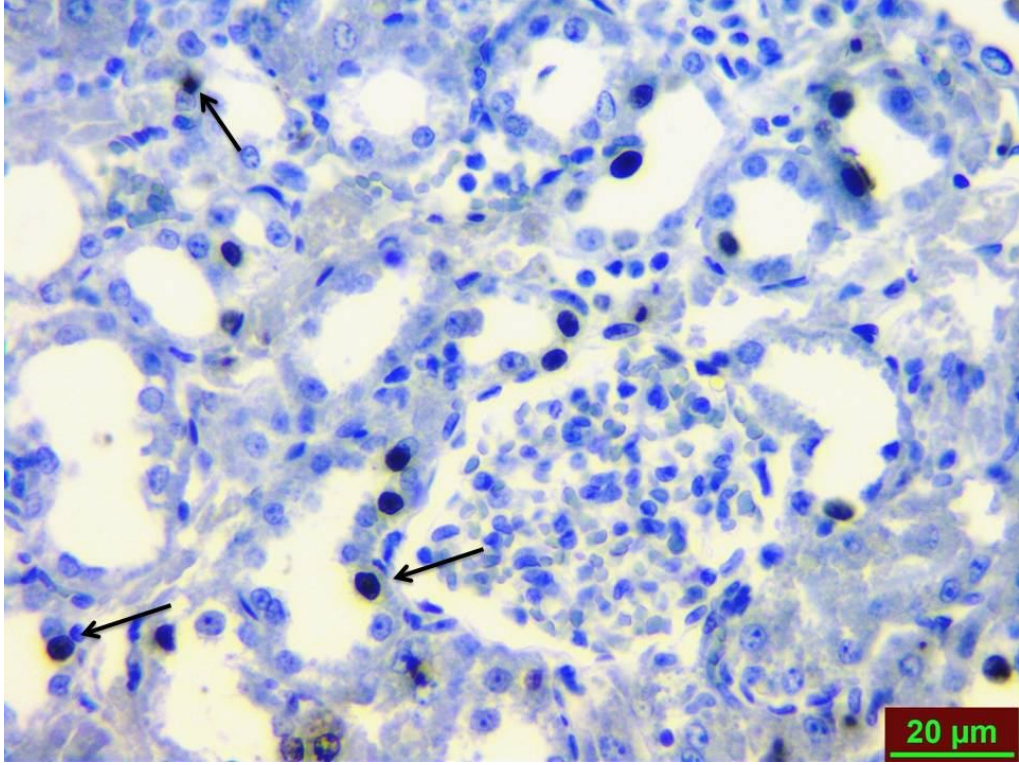
Şekil 21. Gentamisin uygulanan grupta böbrek dokusundaki +3 TUNEL pozitifliği.



Şekil 22. Gentamisin uygulanan grupta böbrek korteksindeki +3 TUNEL pozitifliği.



Şekil 23. Gentamisin + Benfotiamin uygulanan grupta +1 TUNEL pozitifliği.



Şekil 24. Gentamisin + CoQ10 uygulanan grupta +2 TUNEL pozitifliği.

6. TARTIŞMA

Aminoglikozidler, hızlı ve yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip, düşük maliyetli, gram (-) bakterilerin enfeksiyonlarında sık kullanılan antibiyotiklerdir. Yan etkileri ve özellikle nefrotoksisiteleri sebebiyle kullanımları büyük oranda sınırlanmaktadır. Biz de bu deneysel çalışmada gentamisine bağımlı olarak meydana gelen nefrotoksisitede, tübüler hasar gelişiminde oksidatif hasarın oluşturduğu etkiye CoQ10 ve benfotiamin kullanımının biyokimyasal ve histopatolojik düzeylerdeki iyileştirici etkilerini belirlemeyi amaçladık. Bu süreçte de oksidatif hasardaki biyokimyasal parametrelerden glutatyon ve MDA, serum üre ve kreatinin, böbrek proksimal tübüler hasar için KIM-1 ve inflamatuvar hastalıklarda önemli bir rol oynayan TNF- α sitokininin düzeyleri çalışıldı. Histopatolojik değişiklikleri göstermek için TUNEL boyama yapıp ışık mikroskobu altında böbrek morfolojisi değerlendirildi.

Aminoglikozidler suda çok çözünürler, organik çözücülerde çözünmezler ve çok az lipofiliktirler. Bu sebeple yağ bulunduran zarlardan geçişleri sınırlı olmaktadır. Fizyolojik pH olan 7.4'de katyonik olup çok yüksek pozitif yükleri vardır. Bu da aminoglikozidlerin antimikrobiyal etkinlikleri ve nefrotoksisiteleri ile ilişki göstermektedir. Aminoglikozidlerin nefrotoksisiteye sebep olan etkenleri arasında tedavi süresi, genetik yatkınlık, ilacın dozu, yaş gibi faktörler bulunmaktadır (129,130). Literatürlerde aminoglikozidlerin nefrotoksisiteye sebep olup olmadığını araştırmış çok sayıda çalışma mevcuttur (131, 132, 133).

Gentamisin polikatyonik yapıda olan bir aminoglikozid antibiyotiktir. Çok az lipofilik olduklarından yağ içeren zarlardan geçişi sınırlı miktarda olmaktadır. Gentamisin vücutta metabolize olmadan böbrekten glomerüler filtrasyon ile atılır ve

kısmen proksimal tübül hücrelerinde reabsorbe edilir (134). Gentamisin'in sadece proksimal tübül hücrelerindeki lizozomlarda birikimine rastlanır (135). Gentamisin'in en önemli yan etkisinin nefrotoksisite olduğu bilinmektedir. Glomerüler filtrasyonun azalması, serum kreatinin ve üre değerlerinde artış gibi bulgular nefrotoksisite olarak yorumlanmaktadır (136). Gentamisine bağlı nefrotoksisite akut tübüler nekroz, renal yetmezlik ve renal konsantrasyon bozukluğu gibi patolojileri içermekte ve bu da böbrek korteksinde birikiminden kaynaklanmaktadır (136,137).

Böbreklerde kronik veya akut yetmezlik meydana geldiğinde vücutta nitrojen metabolizmasının son ürünleri birikir ve protein olmayan azotlu maddelerin düzeyleri artar. Bu da serumda üre ve kreatinin düzeylerinin artmasına yol açar (138). Gentamisin'in alımından sonra oluşan böbrek hasarının bir göstergesi, glomerüler hasar belirteçleri olan serum üre ve kreatinin değerlerinin artmasıdır (139, 140). Gentamisin'in uygulandığı deneysel çalışmalarda idrarda protein atılımı ile birlikte serumda kreatinin ve ürenin belirgin bir şekilde artmasıyla ortaya çıkan tipik nefrotoksisite bulgularının geliştiği rapor edilmiştir. Sudhakar ve Lakshmi tarafından yapılan bir çalışmada (2010) GM'in tübüler nekroza neden olduğu ve böbrek atropisinin geliştiği rapor edilmiştir (141). Bu çalışmaların hepsinde üre ve kreatinin düzeylerindeki artış, GM'nin neden olduğu nefrotoksisite ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da daha önceki çalışmalar ile uyumlu olacak şekilde GM verdiğimiz grupta nefrotoksisite bulguları olarak serum üre ve kreatinin düzeylerinde anlamlı bir artış tespit edildi. Ayrıca histopatolojik değerlendirilmesinde tübül epitelinde ileri derecede dejeneratif değişiklikler saptandı, özellikle tübüllerde belirgin nekroz, medular tübüllerde hyalen benzeri madde birikimi dikkat çekiydi. Apoptozisi göstermek üzere yaptığımız TUNEL çalışmasında gentamisin uygulanan

grupta TUNEL pozitifliğinin oldukça yaygın olduğu görüldü ve +3 olarak değerlendirildi.

Aminoglikozidler; tromboksan B2 ile renal vazokonstrüksiyona neden olurlar ve özellikle ilaçları absorbe edip lizozomda depolayan proksimal tübülde direkt hücresel toksisite yaparlar. Böylelikle tübüler nekroz, tübüler atrofi, intertübüler myoloid cisimler ve interstisyel nefrit gelişebilir (131,139,142). Reaktif oksijen türleri gentamisin'in neden olduğu proksimal tübüler nekrozis ve akut böbrek yetmezliğinden muhtemelen sorumludur (144). Reaktif oksijen türleri, oksidatif stres sırasında membran lipidlerinin peroksidasyonuna, çoklu doymamış yağ asitlerinin parçalanmasına ve çeşitli aldehid ve alkenlerin salınmasına neden olur (144,145). Bu salınım, gentamisine bağlı olarak serbest radikallerden oluşan moleküler oksijen salınımı (O_2^-) ve oluşumunu şiddetlendirebilir (146). Serbest radikaller vasıtasıyla membranlar, dokular ve biyomoleküllerde oluşan oksidasyonun birçok patolojik vakada önemli rol oynadığı bilinmektedir. Çok fazla miktarda üretilen serbest oksijen radikallerinin biyomoleküller (nükleik asitler, lipidler, polisakkaritler ve çeşitli proteinler) ile etkileşmesi hücre ve doku hasarına neden olmaktadır. Üretilen serbest radikaller, böbrek glomerüllerinin temel membranlarına zarar verir, tübül fonksiyonunu bozar, kollajen ve diğer matriks bileşenlerini parçalar (147). Ayrıca, serbest oksijen radikalleri ortamda olduğu zaman lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre zarının geçirgenliğini ve akışkanlığını değiştirir. Lipid peroksidasyonu sırasında oksidatif hasarın belirteci olarak MDA kullanılabilir (148). Gentamisin uygulanan deneysel çalışmalarda serbest radikal oluşumunu yüzünden lipid peroksidasyonun arttığı ve MDA düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Walker ve ark.'larının yaptığı çalışmada gentamisin'in böbrek kortikal mitokondrisinden

demir salınmasına ve reaktif oksijen türleri üretilmesine neden olduğu, bu sebeple de oksidatif stres gelişimine yol açtığı bildirilmiştir (132, 149). Önceki çalışmalar ile uyumlu olacak şekilde bizim çalışmamızda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GM uygulanan grupta MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artmıştır.

Glutasyon serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan peroksidazların ve transferazların substratı olarak görev yapmaktadır. Glutasyon lipid peroksidasyonuna karşı biyolojik membranları korumaktadır. Bu koruma enzimatik olarak gerçekleşir (150). Glutasyon'un aktivitesi için glutasyon peroksidaz (GSH-Px), indirgenmiş formu (GSH) redükte hale (GSSG) döndürmektedir. Glutasyon, hidroksil radikali ve süperoksit anyonu gibi birçok zararlı oksidanla da enzim katalizi olmadan tepkimeye girebilir (151). Gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisite patogenezisinde serbest radikal hasarının önemli bir mekanizma olarak rol oynadığı görülmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar olmasına rağmen genellikle oksidatif hasarda enzimatik antioksidan (glutasyon, SOD, CAT vb.) düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir.

Vardı ve ark, Upaganlawar ve ark, Parlakpınar ve ark.'ları, tarafından yapılan çalışmalarda gentamisin uygulanan ratlarda glutasyon düzeyinin azaldığını tespit etmişlerdir (132,152,153). Yaptığımız çalışmada da GM grubunda nefrotoksisite ve oksidatif hasar yüzünden total ve redükte glutasyon düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptandı. Birçok çalışmada antioksidan özellik taşıyan birçok maddenin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek veya temizleyerek gentamisinin neden olduğu nefrotoksisiteyi düzelttiği gösterilmiştir (131,154,155,156,157,158,159).

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1); normal böbrek dokusunda ya da idrarda belirlenemeyen, fakat hasar sırasında proksimal tübüllerin luminal yüzeyinin üzerinde eksprese olan tip 1 transmembran proteindir (160,161). Sağlıklı böbreklerde KİM-1'in varlığına rastlanmamış, ancak iskemi ve nefrotoksisite meydana geldikten sonra proksimal tübülün apikal membranında düzeyleri yüksek seviyelerde saptanmıştır (162). Başka organlarda ekspresyonu görülmediğinden, KIM-1'in böbreklerden atılım oranının etkilenmeyeceği ve böbrek hasarı için üre ve kreatininden daha hassas bir belirteç olabileceği vurgulanmaktadır (163). Ichimura ve ark.larının yaptığı çalışmada, KİM-1'in, toksik veya iskemik akut böbrek hasarına cevap olarak proksimal tübül epiteliyal hücrelerinde belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır (111). Zhou ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada (2008), gentamisin enjeksiyonu uyguladıklarında KIM-1 düzeylerinin 24 saat içinde artmış olduğunu ve bu artışın 72 saat boyunca da yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (119). Han ve ark.'larının çalışmasında (2002), biyopsi ile kanıtlanmış akut tübüler nekroz saptanan altı hastanın idrar örnekleri, kronik böbrek hastalığı veya diğer sebeplere bağlı akut böbrek hastalığı olanlarla ve sağlıklı bireylerle karşılaştırmışlar. Proksimal tübülde KIM-1 yoğun bir şekilde boyanmış ve idrar KIM-1 düzeyleri de iskemik akut tübüler nekrozlu hastalarda diğerlerine oranla yüksek olduğunu tespit etmişler (118). Qi-hui Luo ve ark.'larının çalışmalarında (2014), gentamisinin neden olduğu böbrek hasarının belirtilmesinde serum ya da idrar KİM-1 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiğini tespit etmişler ve KİM-1'in gentamisinin neden olduğu böbrek hasarına karşı çok hassas bir parametre olduğunu saptamışlar (164). Bizim çalışmamızda GM uygulanan grupta KIM-1 düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığını ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik.

Tümör nekroz faktörü (TNF- α) pek çok inflamatuvar hastalıkların patogeneziinde önemli rol oynayan bir sitokindir (165). TNF- α , aktive makrofajlar, T- lenfositleri sayesinde ifade edilen 26 kDa ağırlığında transmembran tip-2 polipeptid prekürsörü olarak oluşturulur (166). TNF α inhibe edildiği zaman ciddi enfeksiyonların gelişmesi kolaylaşır ve bir kez geliştikten sonra ortadan kaldırılması da zor olmaktadır (165). Yano ve ark.'ları, (2007), Kang ve ark.'ları (2009) tarafından yapılan çalışmalarda bir aminoglikozid türü olan cisplatinin, proinflamatuvar sitokinleri, özellikle böbrek doku hasarının ilerlemesinden sorumlu olan TNF- α 'nın artması sağlayarak artarda oluşan inflamatuvar reaksiyonlara neden olduğunu gözlemlemişler (167,168). Fouad ve ark.'larının çalışmalarında (2010) kontrol grubunda TNF- α sitokinine rastlanmazken, cisplatin verilen grupta TNF- α 'nın varlığını tespit etmişlerdir (169). Bizim çalışmamızda GM uygulaması ile TNF- α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da belirgin bir artış tespit ettik.

CoQ10, sadece mitokondri solunum zincirinde önemli bir bileşen değil aynı zamanda güçlü bir antioksidan özellik gösteren doğal olarak oluşan hidrofobik bir bileşendir. CoQ10, oksidatif hasarın ve hücrel enerji metabolizmasının yetersizliği ile oluşan bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır (170,171). Sohet ve ark.'larının (2009), CoQ10'un NADPH oksidaz'ın ekspresyonu ile reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılayarak ortadan kaldırdığını gözlemlemişlerdir (172). Tsuneki ve ark.'larını (2007) CoQ10'nun serbest radikallerin tepkimeleri sırasındaki lipid peroksidasyonu ürünlerini temizlediğini saptamışlar (173). Jung ve ark.'ları (2009), CoQ10'nun aynı zamanda nitrat doku stresi ve nitrik oksit ürünlerini de baskıladığı sonuçlarını elde etmişler (174). Upaganlawar ve ark.'larının yaptığı çalışmada (2005), CoQ10'u GM ile verdikleri zaman nefrotoksisite sonucu artan serum üre ve

kreatinin düzeylerinin önemli oranda azaldığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada CoQ10'u GM ile verdikleri zaman nefrotoksisite ve serbest radikal oluşumu yüzünden artan MDA düzeyinin azaldığını ve azalan glutatyon düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir (132). Fouad ve ark.'larının yaptığı çalışmada da (2010) bir aminoglikozid olan sisplatinin nefrotoksisitesine karşı CoQ10 uygulamasının önemli ölçüde lipid peroksidasyonunu baskıladığını, antioksidan savunma mekanizmalarını onardığını gözlemlemişlerdir (164). Bizim çalışmamızda GM ile birlikte CoQ10 verdiğimiz grupta MDA düzeylerinin sadece gentamisin verilen grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Total ve redükte glutatyon düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Gentamisin ile birlikte CoQ10 verilen grupta serum üre ve kreatinin düzeylerinde bir azalma görülsede bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Histopatolojik değerlendirmede ise gentamisin ile birlikte CoQ uygulanan ratlara ait böbrek dokularında kortikal tübüllerdeki nekroz sadece genta uygulanan gruba göre azalmıştır. TUNEL bulgularında ise gentamisin uygulanan ratlarda TUNEL pozitifliği +3 olarak bulunmuşken gentamisin ile birlikte CoQ10 uygulanan grupta TUNEL pozitifliği +2 yaygınlığa sahipti.

GM ile birlikte CoQ10 uyguladığımız ratlarda TNF α düzeyleri sadece GM uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştı. KIM-1 düzeyleri ise GM ile birlikte CoQ10 uygulanan grupta GM'nin tek başına uygulandığı gruba göre belirgin olarak azalmıştı ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Benfotiamin, hücrede çok önemli rol oynayan hücresel antioksidanları (GSH gibi) yenilemek için önemli bir maddedir. Bu durum benfotiaminin direkt olarak

antioksidan özellik göstermesinin yanı sıra transketolaz aktivitesinin gelişmesindeki rolüne de bağlanmaktadır. Benfotiamin, NADPH üreten pentaz fosfat yolunu aktive ederek serbest radikal oluşumunu azaltmaktadır (175). Benfotiamin çok sayıda hayvan modeli deneylerinde GM nefrotoksisitesini engellemek için kullanıldı ancak insan odaklı klinik uygulamalarda tedavi etmek için kullanılanlar başarılı olamadığı saptanmıştır. Ayrıca BFT, GSH'ı yenileyen pentaz fosfat yolunu aktive ederek NADPH'ı da artırır. Benfotiamin transketolaz için bir koenzimdir (176). Katare ve ark.'ları (2010) çalışmalarında, benfotiaminin, nefrotoksisitenin neden olduğu oksidatif stresi tedavi etmede faydalı etkilere sahip olduğu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda, benfotiaminin sağlık açısından birçok faydasının yanı sıra kalp ve sinir dokusunu koruyucu ve antidiyabetik olduğu da bilinmektedir (177). Harisa ve Osama yaptığı çalışmada (2012), benfotiamin'i GM ile verdikleri zaman nefrotoksisite sonucu artan serum üre ve kreatinin düzeylerinde anlamlı bir düşüş tespit etmişler (178). Bu bulgular Mohamadin ve ark.larının çalışmasındaki (2005) BFT'nin GM'in neden olduğu böbrek hasarına karşı koruyucu etkisi olabileceğini vurgulayan kanıtlar ile benzerlik göstermiştir (179). Harisa ve Osama çalışmalarında BFT'nin antioksidan etkisini ya vücudun onarım süresini arttırarak ya da GM'in neden olduğu hasarı azaltarak gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışma aminoglikozitlerin neden olduğu toksisiteyi engelleyen tiamin olduğunu gösteren Ohtani ve ark.larının (1974) çalışmasını desteklemektedir (180).

Gentamisin'in oluşturduğu hasar için benfotiamin uygulanan sıçanlarda fosfolipid seviyesi artmıştır. Fosfolipidler membran bileşenleri için gereklidir ve BFT tarafından önemli oranda artmaları GM tedavisinden sonra çeşitli membranların düzenlenmesi ve onarılmasına olanak tanımaktadır. Benzer çalışmalarda fosfolipid

seviyelerinin iyileştirilmesi serbest radikallerin temizlenmesine yol açtığı gösterilmiştir (181).

Bizim çalışmamızda da BFT'nin, gentamisin nefrotoksisitesine karşı iyileştirici etkisi olduğunu hem biyokimyasal parametreler hem de histopatolojik olarak gösterdik. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece gentamisinin uygulandığı grupta serum üre, kreatinin düzeylerinde ve lipid peroksidasyonu belirteci olan MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artış ve glutatyon düzeyinde ise azalma tespit edilmişti. GM ile birlikte BFT uyguladığımız grupta ise serum üre, kreatinin ve MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, glutatyon seviyesinde ise artış görüldü. Yine BFT ile birlikte GM uygulanan grupta artmış olan TNF- α ve KIM-1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit ettik. Böbrek dokusunun histopatolojisinde gentamisin ile birlikte BFT uygulanan gruptaki tübüllerde nekrozun ve medullar tübüllerde hyalen benzeri madde birikiminin oldukça azaldığı tespit edildi. TUNEL bulgularında ise Sadece GM uygulanan ratlarda TUNEL pozitifliği +3 olarak ayırt edilmişken GM ile birlikte BFT uygulanan grupta TUNEL pozitifliği +1 olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada gentamisin ile birlikte CoQ10 ve BFT kullanımının, gentamisinin neden olduğu nefrotoksisiteye iyileştirici etkisi gösterildi. Yaptığımız çalışmada, 80 mg/kg/gün GM uygulanması üre ve kreatinin düzeylerinde artış ile kendini gösteren nefrotoksisiteye neden olduğu görüldü. Ayrıca GM uygulanması lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA'yı arttırarak hücre membranlarındaki hasarı arttırdı. Benfotiamin ve CoQ10 uygulaması ise böbrek dokusunda GM'in neden olduğu nefrotoksisite hasarına karşı antioksidan özellik gösterip böbrek dokusunu iyileştirdikleri tespit edildi. CoQ10 ve benfotiamin,

gentamisinin böbrek hücrelerinde neden olduğu apoptosis ve nekroza karşı koruyucu etkisi saptandı. Antioksidan ve anti-inflamatuar eylemler CoQ10 ve benfotiaminin nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkilerinde sorumlu olan esas faktörler olarak düşünülebilir. Sonuç olarak, CoQ10 ve benfotiamin, gentamisin uygulaması sırasında böbrek dokusundaki hasar ve bozulmayı engelleyecek güçlü bir aday olduğu söylenebiliriz.

Yaptığımız çalışma; CoQ10 ve benfotiamin kullanımının gentamisinin nefrotoksisite ve diğer zararlı yan etkilerini göstermeden antibakterial bir ilaç olarak uzun dönem kullanılabilmesi için seçenek olabileceklerini düşündürmektedir. Elde edilen bulgular aracılığıyla aminoglikozid antibiyotiklerin kullanımı sonucu akut böbrek hasarı oluşumu üzerine yapılacak olan biyokimyasal ve histopatolojik çalışmalara bilimsel birikime katkı oluşturması ve aynı zamanda referans veriler olarak kullanılabilir olması açısından önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol*, 1995; 26: 1477-87.
2. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med*, 2003; 35: 317-24.
3. Volpini RA, Balbi AP, Costa RS, Coimbra TM. Increased expression of p38 mitogen-activated protein kinase is related to the acute renal lesions induced by gentamicin. *Braz J Med Biol Res*, 2006; 39: 817-23.
4. Willke A. Aminoglikozidler. Willke AT, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 2. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002; 1: 214-223.
5. Mycek MJ, Howland RD, Lippincott illustrated review of Pharmacology, 3rd Ed, Philadelphia: Williams & Wilkins, 2004; 3: 130-171.
6. Zaske DE. Aminoglycosides. Ewans WE, Schentag JJ, Jusko WJ, Eds. *Applied Pharmacokinetics Principles of Therapeutic Drug Monitoring*, Applied Therapeutics, 1992; 4: 14-37.
7. Kayaalp OS. Aminoglikozidler. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11. Baskı, Ankara: Hacettepe-Tas.Kitapçılık Ltd. Sti, 2005: 38-54.
8. Polat A, Parlakpınar H, Tasdemir S, Colak C, Vardi N, Uscar M, et al. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta. Histochem.* 2006; 108: 365-71.
9. Yang CL, Du XH, Han YX, Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* 1995; 17: 21–26.
10. Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. Effects of cosupplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol*, 2005; 4: 571 -576.
11. Yanagida C, İto K, Komiya I, Horie T. Protective effect of fosfomycin on gentamicin induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chemico-Biological Interactions* 2004; 148: 139-141.
12. Montaldo PL, Fadda G, Salis S, Effects of the prolonged administration of coenzyme Q10 in borderline hypertensive patients: a hemodynamic study 1991; 53: 417-424.
13. Crane FL, Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr* 22001; 20: 591–598.
14. Bhagavan HN, Chopra RK. Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radical Research*, 2006; 40: 445-453.

15. Thornalley PJ. The potential role of thiamine (vitamin B(1)) in diabetic complications. *Curr. Diab Rev* 2005; 1: 287–298.
16. Malecka SA, Poprawski K, Bilski B. Prophylactic and therapeutic application of thiamine (vitamin B1)—a new point of view, 2006; 59: 383–387.
17. Fujiwara M, Watanabe H, Matsui K. Allithiamine, a newly found derivative of vitamin B1. *J.Biochem.* 1954; 41: 29–39.
18. Pomero F, Molinar Min A, La Selva M, Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38: 135-138.
19. Bakker SJ, Heine RJ, Gans RO, Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40: 741-742.
20. <http://www.mwt.net/~drbrewer/benfotiamine.htm/> 21.05.2010
21. Bitsch R, Wolf M, Moller J, Heuzeroth L, Gruneklee D. Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamine derivative. *Ann Nutr Metab* 1991; 35: 292–296.
22. Yadav UCS, Subramanyam S, Ramana KV, Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2276–2282
23. Junquera LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Çeviri Editörleri), İstanbul : Nobel Tıp Kitapevleri, 2009.
24. <https://humanphysiology2011.wikispaces.com/12.+Urology> Erişim tarihi: 20.05.2015
25. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R. (Çeviri Editörü), Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.
26. İşlekel H. Böbrek fonksiyonları ve bozuklukları. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Türkiye: Palme Yayıncılık, 2002: 37-42.
27. David J. Tietz basic principles in clinical chemistry. Aslan D, Eds. Klinik kimyada temel ilkeler. Türkiye: Palme Yayıncılık, 2005: 308-722.
28. Calbreath, D.F. Anatomy and physiology of the kidney. *Clinical Chemistry: A Fundamental Textbook*. Editör: D.F. Calbreath, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1992; 11: 240-248.
29. 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
30. Ricos C, Jimenes CV, Hernandez A. Biological variation in urine samples use for analyte measurements. *Clin Chem* 1994; 40: 472-477.

31. Preuss HG, Podlasek SJ, Henry JB. 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.
32. George A, Neilson E. Disorder of the kidney and urinary tract. In: Fauci A, eds. Harrison's principle of internal medicine. Birmingham: McGraw-Hill Professional; 2008: 1741-55
33. Balasubramanian S. Progression of chronic kidney disease: mechanisms and intervention in retardation. J Ap Med. 2013; 10: 19-28
34. Shah S, Baliga R, Rajapurkar M, Foncesa V. Oxidants in chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2007; 18: 16-28
35. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, et al. N Lameire and G Eknoyan Chronic kidney disease as a global public health problem: Approaches and initiatives – a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. Kidney International 2007; 72: 247–259
36. Süleymanlar G, Serdengeçti K, Altıparmak MR, Seyahi N. Türkiye’de Nefroloji – Diyaliz ve Transplantasyon Registry 2009. 1. Baskı, İstanbul: Metris Matbaacılık, 2010: 3-28
37. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, and the Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the second international consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative Group. Crit Care 2004; 8: 204–212.
38. The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Working Group. Definition and classification of acute kidney injury. Kidney Int 2012; suppl 2: 19–36
39. Albernethy, Liberthal W. Acute renal failure in the critically ill patient. Crit Care Clin 2002; 18: 203-212.
40. Humes HD. Acute renal failure prevailing challenges and prospects for the future. Kidney Int 1995; 48: 26-32.
41. Robinson DC, Millares M. Acute and Chronic Renal Diseases. Clinical Pharmacy and Therapeutics, editörler: E.F. Herfindal, DR. Gourley LL. Hart. Williams and Wilkins, Baltimore, 1992; 5: .347-371.
42. Foster JE, Harpur ES, Garland HO. An investigation of the acute effect of gentamicin on the renal handling of electrolytes in the rat. J Pharmacol Exp Ther 1992; 261: 38-43.
43. Gilbert DN, Mandell GL, Benet JE, Dolin R. Aminoglycosides. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5. baskı, Philadelphia: Churchill and Livingstone, 2000; 1: 307-336.
44. Arman D, Dizbay M. Yeni aminoglikozid antibiyotikler. Antimikrobiyal tedavide yenilikler. Modern Tıp Seminerleri 2000: 40-50.

45. Willke A. Aminoglikozidler. Willke AT, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojis, 2. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002; 1: 214-223.
46. Mıstık R. Aminoglikozid Antibiyotikler ve Günde Tek Doz Kullanımları. Klimik Dergisi 2000; 1: 43-45.
47. Barcklay M.L, Begg E.J, Hickling K.G. What is the evidence for once Daily aminoglycoside therapy? Clin. Pharmacokinet 1994; 27: 32-48.
48. Demamer R.L. and Dial L.K. The evolution of aminoglycoside therapy a single Daily döşe. Am. Fam. Physician 1996; 53: 1782-1786
49. Sastrasinh M, Knauss T.C, Weinberg J.M, Humes H.D. İdentification of the aminoglycoside binding site of renal brush border membranes. J. Pharmacol Exp. Ther. 1982; 222: 350-357.
50. Williams P.D, Holohan P.D, Ross, C.R. Gentamicin nephrotoxicity I. Acute bichemical correlates in the rat. Toxicol. Appl. Pharm. 1981; 61: 234-242.
51. Bennet W.M Aminoglycoside nephrotoxicity. Nephron 1983; 35: 73-77.
52. Matzke G.R, Lucarotti R.L, Shapiro H.S. Controlled comparision of gentamicin and tobramycin toxicity. Am. J.Nephrol 1983; 3: 11-17.
53. Ali BH. Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research. Food Chem Toxicol 2003; 41: 1447–52.
54. Mycek M.J, Howland R.D. Lippincott illustrated review of Pharmacology, 3rd Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2004; 130-171.
55. <http://www.umich.edu/~vlpecgrp/Gent/gent.html> Erişim Tarihi: 24.05.2015
56. Begg EJ, Barclay ML, Kirkpatrick CM. The therapeutic monitoring of antimicrobial agents. Br J Clin Pharmacol 2001; 52: 35–43
57. Selby NM, Shaw SM, Woodier N, Fluck RJ, Kohle NV. Gentamicin-associated acute kidney injury. Q J Med 2009; 102: 873–80
58. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. Am J Kidney Dis 1997; 29(3): 465–77
59. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57: 715–25
60. Moudden M, Laurent G, Leclercq M, Tulkens P. Gentamicin induced apoptosis in renal cell lines and embryonic rat fibroblasts. Toxicol Sci 2000; 56: 229–39
61. Johnson JR, Lovett D, Lehrer IR, Couser GW, Klebanoff JS. Role of oxidants and proteases in glomerular injury. Kidney Int 1994; 45: 352–9

62. Kopple JD, Ding H, Letoha A, Ivanyi B, Qing DP, Dux L, et al. l-Carnitine ameliorates gentamicin-induced renal injury in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 2122–31
63. Pedraza-Chaverrí J, Gonzalez-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R. Diallyl disulfide ameliorates gentamicin induced oxidative stress and nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 473: 71–8.
64. Parlakpınar H, Tasdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardi N, Ucar M, et al. Protective effect of chelerythrine on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Cell Biochem Funct* 2006; 24(1): 41–8.
65. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species,” *Physiological Reviews*, vol. 89, no. 1, pp. 27–71, 2009.
66. Balaban R.S, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120: 483–495, 2005.
67. Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nyström T. symmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis,” *Science*, 2003; 299: 1751– 1753.
68. Mercan U. : Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 2004; 15 (1-2): 91-96.
69. Cadenas E. Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 200; 29: 222-230
70. Roidrigo R. Gonzales J. Paoletto F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertension Research*. 2011; 34: 431-440.
71. Leiris J. Biochemistry of free radicals. *Heart Metab.* 2003; 19: 40-44.
72. Nohl H. Hegner D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur. J. Biochem.* 1978; 82: 563-567.
73. Linnane AW. Eastwood H. Cellular redox regulation and prooxidant signaling systems. A new perspective on the free radical theory of aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1067: 47-55.
74. Kuo K. Tarnag D. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Adaptive Medicine* 2010; 22: 87-94.
75. Locatelli F. Canaud B. Eckardt K. et.all. Oxidative stress in end-stage renal disease : an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 18: 1272-1280.
76. Elliot, J.G. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* 53(2); 46-48.
77. Liv Y. Fiskum G. Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 2002; 80: 780-787.

78. Choksi KB, Nuss JE, Boylston WH, Rabek JP, Papaconstantinou J. Age-related increases in oxidatively damaged proteins of Mouse kidney mitochondrial electron transport chain complexes *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43: 1423-1438.
79. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30: 42-59.
80. Meng Q, Wong YT, Chen J, Ruan R. Age-related changes in mitochondrial function and antioxidative enzyme activity in fischer 344 rats. *Mech. Ageing. Dev.* 2007; 128: 286-292.
81. Hanschmann EM, Lonn ME, Schutte LD. et. all. Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3. *J.Biol. Chem.* 2010; 285: 4699-4705.
82. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signalling* 2006; 8(9–10): 1865–79.
83. Eberhardt MK. Reactive oxygen metabolites. Chemistry and medical consequences. CRC. Boca Raton. 2001; 12 : 591-598.
84. Hellou J, Ross NW, Moon TW. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota, *Environ Sci. Pollut. Res.* 2012; 19: 2008.
85. Atasoy, S, Cengiz, M. Adli ve Biyokimyasal Toksikoloji, Ders notlari, Istanbul 1994.
86. Forman HJ, Zhang HQ, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 1–12.
87. Dianzani M, Barrera G. Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. Álvarez S, Evelson P. (ed.), *Free Radical Pathophysiology Transworld Research Network: Kerala, India* 2008: 1; 19-38.
88. İnan D Cu-ZnSOD, GSHPx ve TAS Düzeylerinin Diabetik Vakalara verilen Antioksidan Tedavi Sonrası Değişimi. T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara. 1998.
89. Kılıçoğlu BA. Aspirin ve Vitamin E (α -tokoferol) Verilmiş Ratlarda Karacigerde Yapılan iskemi/reperfüzyon sonrası Eritrosit Radikal Süpürücü Enzim Aktivitelerindeki Değişiklikler. On Dokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. 2002
90. Kılınç K. Oksijen Radikalleri Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik etkileri *Biyokimya Dergisi* 1985; 10: 2
91. Ernst E, Pittler MH, Wider B, Boddy K. *Oxford Handbook of Complementary Medicine*. Oxford University Press. 2008 ISBN 978-0-19-920677-3.
92. Frei B, Kim MC, Ames BN. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proceedings of the Natural Academy of Science* 1990; 12: 4879-83.

93. Miles MV. The uptake and distribution of coenzyme Q10, *Mitochondrion* 2007; 7: 72-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.012>
94. Littartu GP, Tiano L. Bioenergetic and antioksidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Molecular Biotechnology*. 2007; 37: 31-37
95. Ernster L, Forsmark-Andrée, P. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clinical Investigator*. 1993; 718: 60-5.
96. Thornalley PJ. The potential role of thiamine (vitamin B(1)) in diabetic complications. *Curr Diab Rev* 2005; 1: 287–98.
97. Malecka SA, Poprawski K, Bilski B. Prophylactic and therapeutic application of thiamine (vitamin B1)—a new point of view. *Wiad Lek* 2006; 59: 383–7.
98. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003; 9: 294–9.
99. Wu S, Ren J. Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF-alpha. *Neurosci Lett* 2006; 394: 158–62.
100. Pomero F, Molinar Min A, La Selva M, Allione A, Molinatti GM, Porta M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38: 135–8.
101. Bitsch R, Wolf M, Moller J, Heuzeroth L, Gruneklee D. Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamine derivative. *Ann Nutr Metab* 1991; 35: 292–6.
102. Yadav UCS, Subramanyam S, Ramana KV. Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2276–82.
103. Stracke H, Hammes HP, Werkmann D, Mavrakakis K, Bitsch I, Netzel M, et al. Efficacy of benfotiamine versus thiamin on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2001; 109: 330–6.
104. Stirban A, Negrean M, Stratmann B, Gotting C, Salomon J, Kleesiek K, et al. Adiponectin decreases postprandially following a heat-processed meal in individuals with type 2 diabetes: an effect prevented by benfotiamine and cooking method. *Diabetes Care* 2007; 30: 2514–6.
105. P. Balakumara, A. Rohilla, P. Krishan, P. Solairaj, A. Thangathirupathia, The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacological Research* 2010; 61: 482–488.

106. Shindo H, Okamoto K, Tohtsu J, Takahashi I. Studies on the absorption of Sbenzoylthiamine O-monophosphate. II. Permeability to red cell membranes. *Vitamins* 1968; 38: 21–9.
107. Greb A, Bitsch R. Comparative bioavailability of various thiamine derivatives after oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; 36: 216–21.
108. Loew D. Development and pharmacokinetics of benfotiamine. In: Gries FA, Federlin K, editors. *Benfotiamine in the Therapy of Polyneuropathy*. New York: Georg Thieme Verlag; 1998. p. 19–27.
109. Hilbig R, Rahmann H. Comparative autoradiographic investigations on the tissue distribution of Benfotiamine versus thiamin in mice. *Arzneimittelforschung* 1998; 48: 461–8.
110. Volvert ML, Seyen S, Piette M, Evrard B, Gangolf M, Plumier JC, et al. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol* 2008; 8: 10.
111. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V. Kidney Injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion Molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 7: 4135–4142.
112. Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M, Bonventre JV. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 42: 39739–39748.
113. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease” *Nature Reviews Immunology*. 2003; 3: 454–462.
114. Amin RP, Vickers AE, Sistare F. Identification of putative gene-based markers of renal toxicity. *Environmental Health Perspectives*. 2004; 112: 465–479.
115. Ichimura T, Asseldonk PV, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney Injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells,”*The Journal of Clinical Investigation*, 2008; 118: 1657–1668.
116. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000; 407: 784–788
117. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clinical and Translational Science*, vol. 1, no. 3, pp. 200–208, 2008.
118. Han WK, Bailly V, R. Abichandani, R. Thadhani, and J. V. Bonventre, “Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury,” *Kidney International*, 2002; 62: 237–244.

119. Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP. et al. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicological Sciences*, 2008; 101: 159– 170,
120. Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003; 14: 55–61.
121. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more,” *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 24, no. 11, pp. 3265–3268, 2009.
122. Vaidya V S, Ramirez V, Ichimura T, N. A. Bobadilla, and J. V. Bonventre, “Urinary kidney injury molecule-1: A sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury,” *American Journal of Physiology*, vol. 290, no. 2, pp. F517–F529, 2006.
123. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury,” *American Journal of Physiology*, 2004; 286: 552–563.
124. Botsios C. Safety of tumour necrosis factor and interleukin-1 blocking agents in rheumatic diseases. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4: 162-170.
125. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and Clinical management. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 148-155.
126. Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE. Cell-associated Tumor Necrosis Factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* 1987; 138: 957–62.
127. Caron G, Delneste Y, Aubry JP, et al. Human NK cells constitutively express membrane TNF- α (mTNF α) and present mTNF α -dependent cytotoxic activity. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3588–95.
128. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin N, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331–67.
129. Gilbert DN, Mandell GL, Benet JE, Dolin R. Aminoglycosides. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5. baskı, Philadelphia: Churchill and Livingstone, 2000; 1: 307-336
130. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. *J Appl Toxicol*. 1999; 19(1): 7-12.
131. Cuzzocrea SE, Mazzone L, Dugo I, Serrano R, Di Paola, D. Britti, A. De Sarro, S. Pierpaoli, A. Caputi, E. Masini and D. Salvemini, A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 450(1): 67–76.
132. Upaganlawar A, Farswan M, Rathod S, Balaraman R. Modification of biochemical parameters of gentamicin nephrotoxicity by Coenzyme Q10 and green tea in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 2006; 44: 416-418

133. El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper HS, Cumps J, Tulkens PM. Apoptosis in renal proximal tubes of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(3): 665-75
134. Karadeniz A, Yildirim A, Simsek N, Kalkan Y, Celebi F. *Spirulina platensis* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytother. Res.* (2008) 22 1506–1510.
135. De la Cruz Rodriguez LC, Araujo CR, Posleman SE, Rey MR. Attenuation of gentamicin-induced nephrotoxicity: trimetazidine versus N-acetyl cysteine. *J Appl Toxicol* 2010; 30: 343–353.
136. Lode H. Tobramycin: a review of therapeutic uses and dosing schedules. *Curr Ther Res* 1998; 59: 420-53.
137. Zaske DE. Aminoglycosides. In: Ewans WE, Schentag JJ, Jusko WJ, Eds. *Applied Pharmacokinetics. Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. 3rd Ed, Vancouver: Applied Therapeutics, 1992: 14-47.
138. Preuss HG, Podlasek SJ, Henry JB. 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.
139. Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra -Rubio ME, Pedraza -Chaverri J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci*. 2003; 73(20): 2543-56.
140. Ogeturk M, Kus I, Colakoglu N, Zararsiz I, Ilhan N, Sarsilmaz M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 97; 273-280.
141. Lakshmi BVS, Sudhakar M. Protective effect of *Zingiber officinale* on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Int J Pharmacol* 2010; 6: 58-62.
142. Sudina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993; 329: 21-24.
143. Sato M, Ray PS, Maulik G, Maulik N, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK. Myocardial protection with red wine extract. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35(2): 263-8.
144. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 29: 465–477.
145. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715–725.

146. Moudden M, Laurent G, Leclercq M, Tulkens P. Gentamicin induced apoptosis in renal cell lines and embryonic rat fibroblasts. *Toxicol Sci* 2000; 56: 229–39.
147. Johnson JR, Lovett D, Lehrer IR, Couser GW, Klebanoff JS. Role of oxidants and proteases in glomerular injury. *Kidney Int* 1994; 45: 352–9.
148. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21: 1086-90.
149. Walker PD, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest*, 1988; 81: 341-342.
150. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidan defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J Clin Nutr* 1991; 53: 194-200.
151. Larson, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 1988; 4: 969-978.
152. Vardı N, Parlakpınar H, Öztürk F, Acet A. Gentamisin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenetyl ester in rats. *Fundamental Clinical Pharmacology*. 2005; 19: 173-177.
153. Parlakpınar H, Tasdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardı N, Ucar M ve ark. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (cape) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology* 2005; 207: 169-177.
154. Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. . Effects of cosupplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol* 2005; 90: 571-576.
155. Ademuyiwa O, Ngaha EO, Ubah FO. Vitamin E and selenium in gentamicin nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 1990; 9(5): 281-8.
156. Al-Majed AA, Mostafa AM, Al-Rikabi AC, and Al-Shabanah OA. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research* 2002; 46: 445–451.
157. Erdem A, Gundogan NU, Usubutun A, Kilinc K, Erdem SR, Kara A, Bozkurt A. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrology Dialysis and Transplantation*. 2000; 15: 1175–1182.
158. Mazzon E, Britti D, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. Effect of N acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *European Journal of Pharmacology* 2001; 424: 75–83.
159. Naidu MU, Shifow AA, Kumar KV, Ratnakar KS, Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* 2000; 7: 191–197.
160. Tesch GH. Review: Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective. *Nephrology (Carlton)* 2010; 15: 609-616.

161. Bagshaw SM, Langenberg C, Haase M, Wan L, May CN, Bellomo R. Urinary biomarkers in septic acute kidney injury. *Intensive Care Med* 2007; 33: 1285-1296.
162. Luyang G, Takahisa T, Yoshio E, Takahiro D, Hiroshi S (2012) Shedding of kidney injury molecule-1 by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biochem* 152: 425–432.
163. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3265-3268.
164. Qi-hui Luo, Meng-lu Chen, Feng-jiao Sun, Zheng-li Chen, Ming-yang Li, Wen Zeng, et al. KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Mol Cell Biochem* 2014; 397: 53–60.
165. Botsios C. Safety of tumour necrosis factor and interleukin-1 blocking agents in rheumatic diseases. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4: 162-170.
166. Caron G, Delneste Y, Aubry JP, et al. Human NK cells constitutively express membrane TNF- α (mTNF α) and present mTNF α -dependent cytotoxic activity. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3588–95.
167. Yano, T, Itoh, Y, Matsuo, M, Kawashiri, T, Egashira, N, Oishi, R, Involvement of both tumor necrosis factor- α -induced necrosis and p53-mediated caspase-dependent apoptosis in nephrotoxicity of cisplatin. *Apoptosis* 12, 2007; 168: 1901–1909.
168. Kang KP, Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Lee SY, et al. Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24: 3012-3020 3012–3020.
169. Amr A. Fouad, Ali Ibrahim Al-Sultan, Shereen M. Refaie, Mohamed T. Yacoubi, Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. *Toxicology* 2010; 274: 49–56
170. Bonakdar RA, Guarneri E. Coenzyme Q10. *American Academy of Family Physicians.* 2005: 72; No 6.
171. Bhagavan HN, Chopra RK. Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radical Research*, May 2006; 40(5): 445-453
172. Sohet FM, Neyrinck AM, Pachikian BD, Backer FC, Bindels LB, Niklowitz P, et al. Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. *Biochem. Pharmacol.* 2009; 78: 1391–1400.
173. Tsuneki H, Sekizaki N, Suzuki T, Kobayashi S, Wada T, Okamoto T, et al. Coenzyme Q10 prevents high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol* 2007; 566: 1–10.

174. Jung HJ, Park EH, Lim CJ, Evaluation of anti-angiogenic, antiinflammatory and antinociceptive activity of coenzyme Q(10) in experimental animals. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009 ; 61: 1391–1395.
175. Marouf BH, Aziz TA, Zalzal MH, Hussain SA. Free radical scavenging activity of benfotiamine in nitrite-induced hemoglobin oxidation and membrane fragility models. *J. Pharm. Biomed. Sci*, 2007; 223: 86-98.
176. Khan S.A, Piriavada S, Farooq N, Khan S, Khan M.W, Yusufi A.N.K, Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacol. Res.* 2009; 59: 254-262.
177. Katare R.G, Caporali A, Oikawa A, Meloni M, Emanuelli C, Madeddu P, Vitamin B1 analogue benfotiamine prevents diabetes-induced diastolic dysfunction and heart failure through Akt/Pim-1 mediated survival pathway. *Circ. Heart Fail*, 2010; 3: 294-305.
178. Harisa I.Gamaleldin and Osama M. Abo-Salem, Benfotiamine Ameliorate Gentamicin-induced Nephrotoxicity: Effect on Renal Oxidative Stress Markers and Plasma Platelets Activating Factor Acylhydrolase Activity, *Int. J. Of Pharmacol.* 2012; 5: 364-372.
179. Mohamadin A.M, Beshbishy H.A.E, and Mahdy M.A.E, Green tea extract attenuates cyclosporine A-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol. Res.* 2005; 51: 51-57.
180. Othani I, Ishida H, Mizuno S. And Ouchi J, Experimental study on the effect of thiamine derivative upon the kanamycin ototoxicity. *ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec*, 1974; 36: 344-354.
181. Szachowicz-Petelska B, Dobrzynska I, Skrzydlewska and Figaszewski Z, Influence of green tea on surface charge density and phospholipids composition of erythrocytes membrane in ethanol intoxicated rats. *Cell Bio. And Toxicol*, 2005; 21: 61-70.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: M.Alperen ÜSTÜNER

Doğum Yeri/Yılı: ELAZIĞ, 25/03/1986

Adres: Fırat Üniversitesi Rektörlük Lojmanları R-6/ daire: 7 Merkez/ ELAZIĞ

Telefon: 05387830861

E-mail: alperenustuner@hotmail.com

Mezun Olduğu Lisans Fakültesi: Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi

Biyoloji ABD/2007-2011

Yüksek Lisans: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD/ 2012-
devam ediyor