

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



SİKLOFOSFAMİD UYGULANAN RATLARDA
NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE PROPOLİSİN
ETKİLERİ
FIRAT ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
(FÜBAP) KOORDİNASYON BİRİMİ FÜBAPVF.14.13NOLU
PROJE YÜKSEK LİSANS TEZİ PROJESİ SON RAPORU

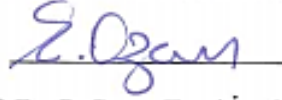
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZÜLAL ALTAY
ELAZIĞ-2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. P. Sema Temizer OZAN

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

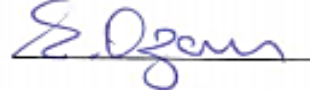
Prof. Dr. Seval YILMAZ



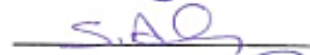
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. P. Sema TEMİZER OZAN



Prof. Dr. Seval YILMAZ



Prof. Dr. Fulya BENZER



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Seval YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN'a ve Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR'e, Prof. Dr. Mine ERİŞİR'e, Yrd. Doç. Dr. Gonca OZAN'a, Arş. Gör. Emre KAYA'ya, Arş. Gör. Mehmet Ali KISAÇAM'a teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her an yanımda olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışması için maddi destek aldığımız Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimine (Proje No: VF. 14.13) teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

KAPAK SAYFASI.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Kemoterapötik Ajanlar.....	5
3.1.1. Alkilleyici Ajanlar	5
3.1.2. Antimetabolitler.....	5
3.1.3. Bitki Alkoloidleri	5
3.1.4. Antitümör Antibiyotikler.....	5
3.1.5. Kortikosteroidler	6
3.2. Siklofosfamid (CYP).....	6
3.2.1. CYP'in Fizyopatolojisi.....	8
3.2.2. CYP'in Vücuda Alımı	9
3.2.3. CYP'in Kullanım Alanları.....	10
3.2.4 CYP'in Yan Etkileri	10
3.2.5. CYP'in Böbrek Üzerine Etkisi	13
3.3. Serbest Oksijen Radikalleri.....	14

3.3.1 Serbest Radikallerin Etkileri	16
3.3.1.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	18
3.3.1.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	18
3.3.1.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	18
3.3.1.4. Serbest Radikallerin Membran Lipitleri Üzerine Etkileri	19
3.3.1.5. Serbest Radikallerin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri.....	19
3.3.1.6. Serbest Radikallerin Böbrek Dokusu Üzerine Etkileri.....	21
3.3.2. Oksidatif Stres	22
3.3.3. Kemoterapi ve Oksidatif Stres	23
3.4. Antioksidanlar	23
3.4.1. Enzimatik Antioksidanlar	24
3.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	28
3.5. Propolis	30
3.5.1. Propolisin Kaynakları.....	34
3.5.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri.....	36
3.5.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri	37
3.5.4. Propolisteki Bazı Bileşiklerin Bilinen Farmakolojik Aktiviteleri.....	39
3.5.5. Propolisin Tıbbi Amaçlarla Kullanımı	39
3.5.6. Propolisin Tedavi Edici Özellikleri	40
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri.....	44
4.2. Kullanılan Gereçler	45
4.3. Kimyasal Maddeler	45
4.4. Yöntemlerin Uygulanması	45

4.4.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	45
4.4.2. CYP ve Propolis Uygulaması.....	46
4.5. Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler.....	46
4.6. Kan Örneklerinin Hazırlanması	46
4.6.1. MDA Tayini için Hazırlanması	46
4.6.2. GSH Tayini için Hazırlanması	47
4.7. Doku Örneklerinin Hazırlanması	47
4.7.1. MDA, GSH, CAT ve GST Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması	47
4.8. Kullanılan Yöntemler.....	48
4.8.1. Plazma ve Dokuda MDA Düzeyinin Tayini	48
4.8.2. Eritrosit ve Dokuda GSH Düzeyinin Tayini	49
4.8.3. Eritrosit ve Dokuda CAT Aktivitesinin Tayini	50
4.8.4. Dokuda GST Aktivitesinin Tayini	51
4.8.5. Hb Düzey Tayini	53
4.8.6. Dokuda Protein Tayini	54
4.8.7. Plazma Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Üre, Ürik Asit, Kreatinin Düzey Tayini..	55
4.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	55
5. BULGULAR	57
5.1. Plazma MDA Düzeyi	57
5.2. Eritrosit GSH Düzeyi	59
5.3. Eritrosit CAT Aktivitesi.....	60
5.4. Eritrosit GST Aktivitesi	61
5.5. Böbrek Dokusunda MDA Düzeyi.....	61

5.6. Böbrek Dokusunda GSH Düzeyi	63
5.7. Böbrek Dokusunda CAT Aktivitesi	64
5.8. Böbrek Dokusunda GST Aktivitesi	65
5.9. Plazma Örneklerinde Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Üre, Ürik Asit, Kreatinin Düzeyleri	66
6. TARTIŞMA	76
7. KAYNAKLAR	91
8. ÖZGEÇMİŞ.....	99



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. CYP'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	7
Tablo 2. Serbest Oksijen Radikalleri.....	15
Tablo 3. Serbest Oksijen Radikallerinin Kaynakları	16
Tablo 4. Başlıca Enzimatik Endojen Antioksidanlar.	24
Tablo 5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	28
Tablo 6. Kavak, Kestane ve Okaliptus Propolislerinin Mum, Kül, Etanolik Propolis Ekstraktı (EEP) ve Toplam Fenolik Madde Miktarları	32
Tablo 7. Propolisin Yapısındaki Maddeler ve Miktarları.....	33
Tablo 8. Propoliste Belirlenen Bileşik Grupları ve Sayıları.....	35
Tablo 9. Propolis ve Ekstresinin Mikroorganizmalara Etkisi	41
Tablo 10. Rat Yeminin Bileşimi ve Kalori Değeri.....	44
Tablo 11. Plazma ve Doku MDA Düzey Ölçümü.....	48
Tablo 12. Eritrosit ve Doku GSH Düzey Ölçümü.....	50
Tablo 13. Eritrosit ve Doku CAT Aktivite Ölçümü	51
Tablo 14. Doku GST Aktivite Ölçümü	52
Tablo 15. Hb Düzey Ölçümü	53
Tablo 16. Protein Düzey Ölçümü.....	55
Tablo 17. CYP ve Propolis Uygulanan Ratlarda Kan MDA, GSH Düzeyleri ve CAT Aktiviteleri.....	57
Tablo 18. CYP ve Propolis Uygulanan Ratlarda Böbrek MDA, GSH Düzeyleri, CAT ve GST Aktiviteleri	61
Tablo 19. Plazma Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Üre, Ürik Asit, Kreatinin Düzeyleri.....	66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. CYP'in Kimyasal Yapısı; 2-bis (kloroetil) Amino Tetrahidro-2H-1,2,3-Oksazofosforin 2-Oksit.....	6
Şekil 2. CYP'in Moleküler Yapısı ve Metabolizması	9
Şekil 3. Serbest Radikallere Bağlı Hasarlar	17
Şekil 4. Lipid Peroksidasyonunun Kimyasal Yolu	20
Şekil 5. Antioksidanların Metabolizması	
Şekil 6. GSH Sentezi ve Siklusu.....	30
Şekil 7. Propolisin Şekli.....	31
Şekil 8. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Plazma MDA Düzeyleri.....	58
Şekil 9. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Eritrosit GSH Düzeyleri.....	59
Şekil 10. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Eritrosit CAT Aktiviteleri	60
Şekil 11. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarının Böbrek Dokusunda MDA Düzeyleri	62
Şekil 12. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarının Böbrek Dokusunda GSH Düzeyleri.....	63
Şekil 13. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarının Böbrek Dokusunda CAT Aktiviteleri	64
Şekil 14. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarının Böbrek Dokusunda GST Aktiviteleri.....	65
Şekil 15. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Na Düzeyleri ..	67

Şekil 16. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma K Düzeyleri....	68
Şekil 17. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Ca Düzeyleri ..	69
Şekil 18. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Cl Düzeyleri...	70
Şekil 19. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Mg Düzeyleri .	71
Şekil 20. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma P Düzeyleri	72
Şekil 21. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Üre Düzeyleri.	73
Şekil 22. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Ürik Asit Düzeyleri.....	74
Şekil 23. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Kreatinin Düzeyleri.....	75

KISALTMALAR LİSTESİ

ACR	: Akrolein
ADH	: Antidiüretik hormon
ALT	: Alanin transaminaz
AST	: Aspartat transaminaz
Ca	: Kalsiyum
CAPE	: Kafeik asit fenil etil ester
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
CDNB	: 1-Klor-2,4-dinitrobenzen
CK	: Kreatin kinaz
Cl	: Klor
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
CYP	: Siklofosfamid
dl	: Desilitre
EEP	: Ethanolik propolis ekstraktı
FAM	: Fosforamid mustard
Fe	: Demir
g	: Gram
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon

GST	: Glutatyon-S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Hb	: Hemoglobin
HOC1	: Hipoklorik asit
H₂O	: Su
k	: Katal
K	: Potasyum
L	: Litre
LO⁻	: Alkoksil radikali
LOO⁻	: Peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksit
M	: Mol
MDA	: Malondialdehid
Mesna	: Merkaptoetanol sülfonat
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimol
Mn	: Manganez
Na	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol

NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂	: Oksijen
¹O₂	: Singlet oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali
OD	: Optik dansite
·OH	: Hidroksil radikali
P	: Fosfor
Pb	: Kurşun
PMN	: Polimorfo nükleer lökosit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SH	: Sülfidril
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TAS	: Total antioksidan seviye
TBA	: Tiobarbitürik asit
TCA	: Triklor asetik asit
Ü	: Ünite
Zn	: Çinko
µl	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol

1. ÖZET

SİKLOFOSFAMİD UYGULANAN RATLARDA NEFROTOKSİSİTE

ÜZERİNE PROPOLİSİN ETKİLERİ

Çalışma siklofosfamid (CYP) uygulanan ratlarda propolisin nefrotoksosite üzerine etkilerinin araştırması amacıyla yapılmıştır.

34 adet Wistar-Albino ırkı erkek ratlar kullanılmıştır. Hayvanlar 4 gruba ayrılmıştır: 1. grup: Kontrol grubu (ratlara tedavi verilmemiştir), 2. grup: Propolis uygulanan grup (200 mg/kg/gün oral, 7 gün), 3. grup: CYP uygulanan grup (150 mg/kg/i.p. tek doz), 4. grup: CYP+propolis uygulanan gruptur. Propolis uygulamasına CYP uygulamasından 2 gün önce başlanmış ve 7 gün süre ile devam edilmiştir. Uygulamaların sonunda kan ve böbrek dokularında malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST) ve plazmada sodyum (Na), potasyum (K), kalsiyum (Ca), klor (Cl), magnezyum (Mg), fosfor (P), üre, ürik asit, kreatinin düzeyleri ölçülmüştür.

CYP uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan ve böbrek dokusunda MDA düzeyinde önemli bir artış, GSH düzeyi ve CAT aktivitesinde ise önemli bir azalış gözlenmiştir ($p<0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA, GSH düzeyleri ve CAT aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. CYP+propolis uygulanan grup CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeyinde önemli azalış, GSH düzeyi ve CAT aktivitesinde ise önemli bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Plazmada GST aktivitesi okunamayacak düzeyde olduğundan ölçülememiştir.

CYP uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma ürik asit düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmazken, Na, K, Ca, Cl, Mg, P düzeylerinde önemli azalış; üre, kreatinin, düzeylerinde ise önemli artış saptanmıştır ($p<0.05$). Propolis uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Na, K, Ca, Cl, Mg, P, üre, kreatinin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. CYP+propolis uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma K, Ca, Cl, üre, kreatin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamazken, Na ve P düzeylerinde önemli azalış saptanmıştır ($p<0.05$).

Çalışmamızda gözlenen MDA düzey artışı, GSH düzey, CAT aktivite azalışı CYP kaynaklı nefrotoksisitenin büyük oranda oksidatif strese bağlı olduğunu ve CYP nedenli doku oksidatif hasarından antioksidan özelliği olan propolis ile korunulabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, propolis, malondialdehid, glutatyon, katalaz, glutatyon-S-transferaz, biyokimyasal parametreler

2. ABSTRACT

THE EFFECTS OF PROPOLIS ON NEPHROTOXICITY IN CYCLOPHOSPHAMIDE TREATED RATS

The purpose of this study was to investigate the effects on the nephrotoxicity of propolis in cyclophosphamide (CYP) treated rats.

34 male Wistar- albino rats were used. The animals were divided into 4 groups: group 1 : control group (not treated rats), group 2: Propolis treated group (200 mg/kg/day orally for 7 days), group 3: CYP treated group (150 mg/kg i.p. a single), group 4: CYP+propolis treated group. Propolis application began before 2 days from CYP administration and continued for 7 days. At the end of the experiment, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and plasma sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca), chlorine (Cl), magnesium (Mg), phosphorus (P), urea, uric acid, creatinine levels were measured in blood and kidney tissues.

It was observed to a significant increase in MDA level, GST activity, decrease in GSH level and CAT activity in the blood and kidney tissues of CYP treated group when compared with the control group ($p<0.05$). MDA, GSH levels and CAT, GST activities weren't statistically significant difference in propolis and CYP+propolis treated groups when compared with the control group. It was observed to significantly decrease in MDA level, GST activity, significant increase in GSH level, CAT activity in CYP+propolis treated group when compared with CYP treated group ($p<0.05$). It could not be measured because GST activity in plasma can not be read.

It was found to significantly decrease in plasma Na, K, Ca, Cl, Mg, P levels, increase in urea, creatinine levels while there wasn't statistically significant difference in uric acid levels in the CYP treated group when compared with the control group ($p < 0.05$). It could not be determined a statistically significant difference in plasma Na, K, Ca, Cl, Mg, P, urea and creatinine levels in the propolis treated group when compared with the control group. It was observed plasma Na and P levels were found to be statistically significant decrease while K, Ca, Cl, urea, creatinine levels weren't statistically significant differences in CYP+propolis treated group when compared with the control group ($p < 0.05$).

In our study, increase in MDA level, decrease in GSH level, CAT activity are thought to be largely caused by oxidative stress of CYP induced nephrotoxicity. It shows can be prevented with the antioxidant property of propolis from CYP induced tissue oxidative damage.

Key Words: Cyclophosphamide, propolis, malondialdehyde, glutathione, catalase, glutathione-S-transferase, biochemical parameters

3. GİRİŞ

3.1. Kemoterapötik Ajanlar

Kemoterapötik ajanlar kimyasal yapıları ve hücre aktivitesine göre 5 sınıfa ayrılmaktadırlar:

3.1.1. Alkilleyici Ajanlar

Bu gruptaki ilaçlar arasında siklofosamid (CYP), busulfan, carboplatin, carmustine, clorambusil, dacarbazine, ifosfamide, lomustine, melphalan, nitrojen mustard, procarbazine, tiotepa yer almaktadır. Sitotoksik etkileri, bünyelerindeki elektrofilik alkil kökü ile hedef makromoleküllerin nükleofilik parçasının geri dönüşsüz bir kombinasyon yapması ile olmaktadır (1, 2).

3.1.2. Antimetabolitler

Bu grupta; cytrabine, methotexate, 6-mercaptopurine, 6-tioguanine yer almaktadır. Hücrenin normal metabolitleri ile benzerlik gösterdiklerinden onların yerine geçerek aktiviteyi bloke eder, azaltır ya da makromoleküllerin içine girerek, fonksiyonu olmayan bir makromolekül yaratırlar (1, 2).

3.1.3. Bitki Alkaloidleri

Podofilotoksinlerden ve vinca alkaloidlerinden semisentetik olarak elde edilen ilaçlardır. Bu grupta; vincristine, vinblastine, etoposide, teniposide yer almaktadır. Hücre bölünmesini mitoz safhasında durdururlar (1, 2).

3.1.4. Antitümör Antibiyotikler

Actinomycin-D, adriamycin, bleomycin, epirubicin, idarubicin bu gruptadırlar. Hücrede DNA ve RNA transkripsiyonunu durdurup, dokularda uzun

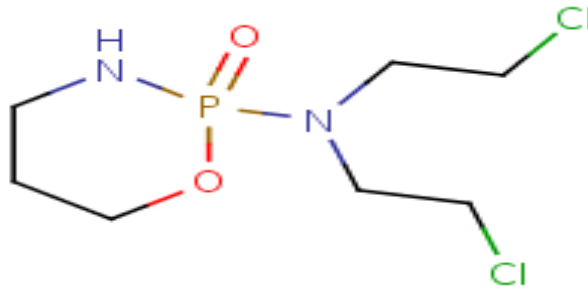
süre kaldıklarından DNA sentezi boyunca hücre ölümüne yol açarlar. Radyasyonla birlikte verildiklerinde toksisiteyi artırır (1, 2).

3.1.5. Kortikosteroidler

Kortikosteroidler pasif difüzyonla hücre içine girip, glukokortikoid reseptörleri ile bağlanarak çekirdeğe geçer, orada DNA ile bağlanıp transkripsiyon olayını bozarlar (1).

3.2. Siklofosfamid (CYP)

CYP nitrojen mustard grubundan alkilleyici antineoplastik bir ilaçtır. CYP yapılan klinik ve deneysel çalışmalarla terapötik toksik etki oranına sahip olduğu belirlenmiş bir immunosüpresör ajandır (4). CYP'nin kimyasal yapısı şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. CYP'in Kimyasal Yapısı; 2-bis (kloroetil) Amino Tetrahidro-2H-1,2,3-Oksazofosforin 2-Oksit (5).

Alkilleyici ilaçlar grubuna giren CYP kanser tedavisinde çok yaygın olarak kullanılan güçlü bir oxazaphospharindir. Tek başına veya diğer kemoterapötik ilaçlarla kombine edilerek birçok neoplastik ve non-neoplastik hastalığın tedavisinde kullanılır. Akut ve kronik lenfositik lösemi, Hodgkin dışı

lenfomalar, pediatrik solid tümörler, meme, over, baş-boyun kanserleri gibi hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde etkili olduğu ortaya konmuştur (2, 3). Ayrıca B hücre işlevlerini baskılama, immün sistem hücrelerinde adezyon moleküllerini ve sitokin üretimini azaltma ve apoptozu tetikleme gibi çeşitli etkilerine dayanarak otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Ancak myelosupresyon, ürotoksisite, mutajenite, teratojenite ve karsinojenite gibi düşündürücü toksik etkilere de sahiptir (4).

Alkilleyici antineoplastik ajanlar genel olarak hücre fonksiyonlarını amino, karboksil, sülfidril ve fosfat gruplarına kovalent bağlanarak bozarlar. En sık bağlandıkları moleküller DNA, RNA ve proteinlerdir. Etkisini çoğalan hücreler üzerinde gösterirken faz spesifik etki göstermezler. Bağ dokusu hastalarında yapılan çalışmalar bu ajanın hem antikor hem de otoantikor titrelerini azalttığını göstermiştir. CYP, insan vücudunda humoral antikor üretimini hücrel immuniteden daha fazla suprese eder (5-10).

Tablo 1. CYP'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (5)

Moleküler Formülü	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P
Moleküler Ağırlık	261,09
Fiziksel Özellikleri	Kokusuz, ince beyaz kristal toz
Erime noktası	49,5-53 °C
Kaynama noktası	336 °C
Yoğunluk	1,479 g/cm ³ 1,479 g/cm ³
Çözünürlük	Kloroform, dioksan ve glikoller içinde çözünür, benzen, karbontetraklorürde hafifçe çözünür, eter ve asetonda çok az çözünür
Bölüm katsayısı	0,63
pKa	4,5-6,5
Stabilite	30 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda klor atomlarının ayrışmasıyla hidroliz meydana gelir. Oksidasyon, nem ve ışığa duyarlıdır

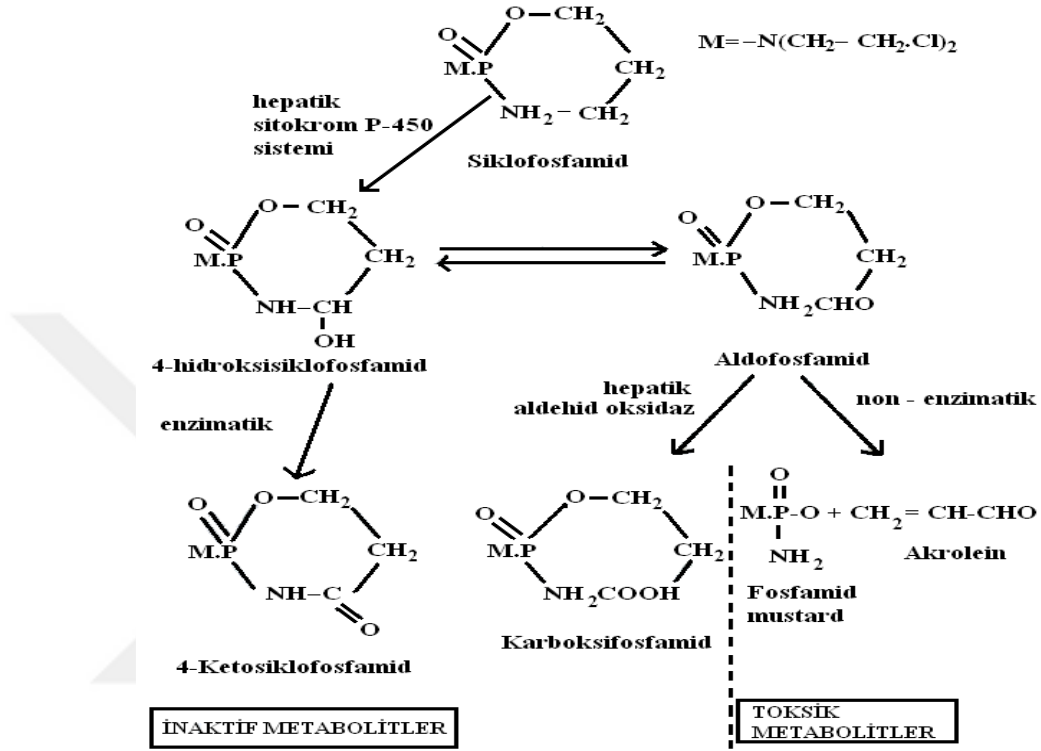
3.2.1. CYP'in Fizyopatolojisi

Başışıklık baskılayıcı ve bir antitümör ajan olan CYP'nin onkosidal etki gösterebilmesi için metabolik olarak aktive edilmesi gerekir (6). CYP tarafından oluşturulan başışıklık baskılayıcılık ana ilaçtan ziyade onun metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. CYP karaciğerde mikrozomal sitokrom P-450 enzim sistemi ile 4-hidroksi CYP'e metabolize olduktan sonra aldofosfamide dönüşür. Hem normal hem de tümör dokularda sonradan enzimatik olmayan bir yolla sitotoksik moleküller fosforamid mustard (FAM) ve akrolein (ACR)'e dönüştürülürler. Bu iki bileşen oldukça sitotoksiktir ve ilacın aktif formlarıdır. Sitotoksik etkileri, bünyelerindeki elektrofilik alkil kökü ile hedef makromoleküllerin nükleofilik parçasının geri dönüşsüz bir kombinasyon yapması ile olmaktadır (11, 12).

FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CYP'in başışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. Öte yandan ACR'in önemli makromoleküllerinin sülfidril (-SH) gruplarıyla çabucak reaksiyona girdiğı böylece başışıklığın baskılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Elektrofilik bir aldehit olan ACR, antitümör aktivitesi olmamasına karşın sitokrom P-450 ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)-sitokrom P-450 redüktaz proteinleri ile hızlı şekilde reaksiyona girerek enzim inaktivasyonuna neden olur. Diğer taraftan bazı reaktif oksijen türevlerini (ROT) uyarma ve nitrik oksit sentaz (NOS) üzerinden nitrik oksit (NO) seviyelerini artırma gibi özellikleri de bulunur (13).

ACR sadece CYP in yıkılması ile oluşmamakta ayrıca sigara, böcek ilaçlarında, bazı yiyeceklerde ve yanmış organik malzemelerde de bulunabilmektedir. Oluşan ara ürünler veya son metabolitlerin; kanser seçiciliğı,

sistemik toksisite, mutajenite, teratojenite, genotoksisite ve kanserojenite gibi farklı etkileri olabileceği ileri sürülmektedir (9, 14). CYP'in metabolizması şekil 2'de gösterilmiştir



Şekil 2. CYP'in Moleküler Yapısı ve Metabolizması (15)

3.2.2. CYP'in Vücuda Alımı

Hem oral hem de parenteral olarak kullanılan CYP, hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde başarılı bulunmuştur. CYP'in plazmada yarılanma ömrü 6,5 saattir. Parenteral olarak verildiğinde aktif metabolitlerin plazma konsantrasyon pikine ulaşması 2-3 saat sürer. CYP, ifosfasmid ve dikarbazin farmakokinetik anlamda ön ilaçlardır. Bu ilaçlar karaciğerde karma fonksiyonlu oksidazlar tarafından aktif metabolitlere dönüştürülürler, bu metabolitler de

kanser hücresinde reaktif metabolitlere dönüşürler. Vezikan olmaları nedeniyle damar dışına kaçmalarına engel olunmaya çalışılmalıdır (15, 16).

Alkilleyici tipte bir antineoplastik ilaç olan CYP, sitotoksik immünosüpresif ilaçların en güçlüsü olduğu kabul edilir; ancak toksisitesinin fazlalığı nedeniyle immünosüpresif ilaç olarak kısıtlı sayıdaki endikasyonlarda kullanılır. CYP hem immünosüpresif hem de sitotoksik etkilerini DNA üzerinden hücrenin mitotik aktivitesini engelleyerek göstermektedir. Hem hücresel hem de humoral immunitiyi etkilemekle birlikte daha çok B hücreleri üzerine etkilidir. Böbrek yetmezliği durumlarında ilacın atılımı gecikir ve toksik etkileri artar (17).

3.2.3. CYP'in Kullanım Alanları

CYP, solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmasının yanında lenfoma, miyeloma, kronik lenfositik lösemide kullanılmaktadır. Ayrıca CYP trombositopenik purpura, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozis, nefrotik sendrom ve wegner granulomatozisi gibi nonneoplastik hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (15, 18).

3.2.4 CYP'in Yan Etkileri

CYP'den en çok etkilenen hücreler lenfositlerdir ve bunların sayı ve işlev açısından değişiklikleri bağışıklık sisteminin baskılandığının göstergesidir. Bağışıklığı büyük oranda etkilemektedir ve yakın laboratuvar takibi gerektiren yan etkileri vardır. En çok görülen yan etki bulantı ve kusmadır. CYP, bağışıklığı bozan yüksek doz kortikosteroid gibi ilaçlarla birlikte kullanıldığı zaman savunma sistemini baskılayıp enfeksiyon riskini artırır (18, 19).

Uzun dönemde CYP'in yan etkisi; malignite, pulmoner fibrozis, ovaryan fibrozis, erkeklerde yüksek oranda sterilite olasılığı vardır. Kümülatif doz: 150-250 mg/kg olarak verilmektedir CYP hücre DNA'sına penetre olarak etki etmektedir. Akut evrede komplikasyonları olarak; kemik iliği baskılanması, hemorajik sistit, gastrointestinal yakınmalar, alopesi, enfeksiyon riskinde artış gözlenmiştir (20).

CYP, emziren kadınlarda süte geçerek bebekte immunosupresyon, gelişme geriliği ve karsinogenezis gibi toksik etkiler yapmaktadır. Erkek Swiss farelerde yapılan deneysel çalışmalarda 200 mg/kg CYP'in hemorajik sistit oluşturduğu rapor edilmiştir (21). CYP'in insanlarda ve deney hayvanlarında mesane kanseri yaptığı yönünde raporlarda bulunmaktadır (22). CYP'in kemik iliği mutajenitesi konusunda yapılan çalışmalar, bu maddenin insanlarda ve sıçanlarda hematopoietik sistemde kanserojen olduğunu göstermiştir. Farelerde yapılan bir deneysel çalışmada 100 mg/kg i.p. CYP uygulamasının hematopoietik sistemde tümör gelişimini uyardığı gözlenmiştir. Sıçanlarda yapılan diğer bir deneysel çalışmada 20 ve 40 mg/kg i.p. CYP uygulamasının dalakta ve kemik iliğinde mutajen olduğu gösterilmiştir. Hodgkin lenfomalı hastalara CYP verildiğinde, hastalarda üreterik tümörlerin geliştiği rapor edilmiştir (13, 21, 22).

Öte yandan, CYP'e bağlı en önemli renal yan etki hiponatremidir. CYP'in daha çok i.v. yüksek doz tedavi sonrası fizyolojik olarak uygun olmayan antidiüretik hormon (ADH) salgısını arttırarak hipernatremiye yol açar. Hiponatremi, ADH'un artmış etkisi nedeniyle su ekskresyonunun bozulmasına bağlı gelişir. Hiponatremi genellikle akut gelişir ve ilacın kesilmesiyle 24 saat

içinde düzelir. Renal yetmezliği olan hastalarda CYP kullanımında doz ayarlaması gerekip gerekmediği tartışılmalıdır (15, 16).

Özellikle yüksek doz CYP (120-200 mg/kg) kullanımından sonra kardiyak etkiler bildirilmiştir. Kardiyak semptomları; aritmi, akut fulminant kalp yetersizliği ve hemorajik miyoperikardiyum ve bunun neden olduğu perikardiyal efüzyon, kardiyak tamponat ve hatta ölüme neden olabilir. Akut semptomlar genellikle ilaç verildikten 1-2 hafta sonra görülür, yan etki gelişirse % 11 oranında ölümcül olabilir (23, 24). Ando ve ark. (23)'nın yüksek doz CYP ile kemik iliği transplantasyonu yapılan 39 meme kanserli hastayı içeren çalışmalarında hazırlama rejimi olarak CYP (2000 mg/m²) ve thiotepa (200 mg/m²) kullanılmıştır. Bu çalışmada hastaların birisinde konjestif kalp yetersizliği, ikisinde sol ventrikul disfonksiyonu, 3 hastada perikardiyal effuzyon, 2 hastada ST-T anormallikleri, aritmi gelişen 9 hastanın üçünde atriyal, ikisinde ventrikuler aritmi ve dördünde atriyoventrikuler blok epizotları izlenmiştir.

Morandi ve ark. (24)'nın kemik iliği transplantasyonu yapılan 16 meme kanseri hastasını içeren çalışmalarında CYP dozu 200 mg/kg olarak kullanılmış ve hastaların takibinde kardiyak enzimlerden troponin, kreatinin kinaz (CK) ve CK-MB kullanmışlardır. Hastaların hiçbirinde kardiyak enzimlerin yükselmediği tespit edilmiştir.

Goldberg ve ark. (25)'nin 84 kemik iliği transplant hastasını içeren, 50 mg/kg/gün dozunda 4 gün süre ile CYP'nin kullanıldığı çalışmasında hastaların 14'ünde CYP'nin kardiyak toksisitesine bağlı bulgular saptamışlardır. Hastalar, CYP'in dozuna göre (vücut yüzey alanı göz önüne alınarak) 2 gruba ayrılmıştır. Günlük 1,55 mg/m²/günden yüksek dozda CYP kullanılan 52 olgunun 13'ünde

konjestif kalp yetersizliği gözlenirken, 6 olgu ölümle sonuçlanmış; günlük 1,55 mg/m²/günden daha az dozda CYP kullanılan 32 olgunun 1'inde konjestif kalp yetersizliği gelişmiş ve hiçbir hasta kaybedilmemiştir. Yapılan bu çalışmada 60 mg/kg/gün dozunda kullanılan CYP, vücut yüzey alanına göre hesaplandığında, 2,3 mg/m²/gün olup yan etki gözlenmiştir. Olgudaki kardiyak toksisite nedeninin, vücut yüzey alanına göre hesaplanan yüksek doza bağlı olabileceği görülmüştür.

3.2.5. CYP'in Böbrek Üzerine Etkisi

Kanser hastalarında antineoplastik kemoterapinin gelişmesi ve destek tedavisi ile mortalite ve morbidite oranları önemli ölçüde azalmıştır. Ancak yüksek doz sitotoksik ilaçların kullanılması ve kanser hastalarının daha uzun süre yaşaması ilaçların yan etkilerini de artırmıştır (26).

Sitotoksik ilaçlara bağlı nefrotoksisite kemoterapinin en sık görülen yan etkilerinden birisidir. Antimetabolitler, alkilleyici ilaçlar ve antrasiklinler en sık nefrotoksisiteye neden olan ilaçların başındadır. Sisplatin, CYP ve yüksek doz sitozin arabinozidinin nefrotoksik etkileri bilinmektedir (27).

Kemoterapi ilaçları böbrekte başlıca proksimal tübül, distal tübül ve glomerül olmak üzere nefronun üç ana bölümünde hasarlanmaya ve fonksiyon bozukluğuna neden olur (28). Glomerüler fonksiyon bozukluğuna bağlı glomerüler filtrasyon hızında azalma, serum kreatinin ve idrar protein/kreatin oranında artma görülür. Proksimal tübüler fonksiyon bozukluğuna bağlı ise idrar sodyum (Na)'unda artma; serum Na, potasyum (K), klor (Cl), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve fosfor (P) seviyesinde azalma görülür. Distal tübüler fonksiyon bozukluğunda idrar pH'ı ve ozmolalitesi artar. Kanser hastalarında

uygulanan kemoterapi ilaçlarının özelliklerine göre glomerüler fonksiyonların yanında tübüler fonksiyonların da bozulduğu bilinmektedir (29).

CYP'e bağlı nefrotoksisiteden nefronun tüm segmentleri etkilenir. En sık tübüler glukoz, amino asit, protein, fosfat, bikarbonat kaybı ile karakterize proksimal tübül tutulumu görülür (30). CYP'in en önemli yan etkisi hemorajik sistittir. Uzun süreli veya yüksek doz CYP tedavisinden sonra % 40 hastada hemorajik sistit geliştiği bildirilmiştir. CYP'in aktif metaboliti olan ACR tarafından üriner epitelin hasar görmesi sonucu oluşur. Hemorajik sistit birkaç saat içinde gelişir ve tedaviyle 1-2 hafta içinde düzelir. CYP'in infüzyon ve metabolizma oranı, idrarın miktarı ve sıklığı, diğer nefrotoksik ilaçlara ve genitoüriner radyasyona maruz kalma hemorajik sistit gelişimini artıran risk faktörleridir. Ciddi hemorajik sistit; mesane kontraksiyonu, anemi, tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu, mesane perforasyonu, böbrek yetmezliği ve ölüme yol açabilir. Uzun dönem komplikasyonları ise mesane fibrozisi, üriner reflü ve transizyonel hücreli mesane tümörüdür (21, 31).

3.3. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron taşıyan yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (32, 33).

Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeni ile çok aktif yapılı olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir. Etkileşime girdikleri molekülden bir elektron alarak yada ona bir

elektron vererek molekülün yapısını bozarlar. Böylece radikal olmayan bir yapı, radikale dönüşmüş olur (32, 33, 34).

Tablo 2. Serbest Oksijen Radikalleri (35)

1. Radikaller	2. Radikal Olmayanlar	3. Singlet Oksijen (1O_2)
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	
Hidroksil radikali ($\cdot OH$)	Lipid hidroperoksit (LOOH)	
Alkoksil radikali ($LO^{\cdot}$)	Hipoklorik asit ($HOC1$)	
Peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$)		

SOR'leri, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı olarak normal veya patolojik aerobik metabolizma ile sürekli üretilmektedirler. Mitokondrilerdeki O_2 'li solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada SOR'lar oluşur. Tablo 3'te kaynakları görülmektedir (35).

Aerobik metabolizması olan canlılarda SOR genellikle oksijen (O_2)'den üretilmekle birlikte organizmada O_2 türevi SOR dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (36). Kimyasal maddelere maruz kalma, karbontetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksisiteleri, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı gibi çevresel faktörler, bleomisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar SOR oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklı etmenlerdir (37).

Tablo 3. Serbest Oksijen Radikallerinin Kaynakları (38)

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

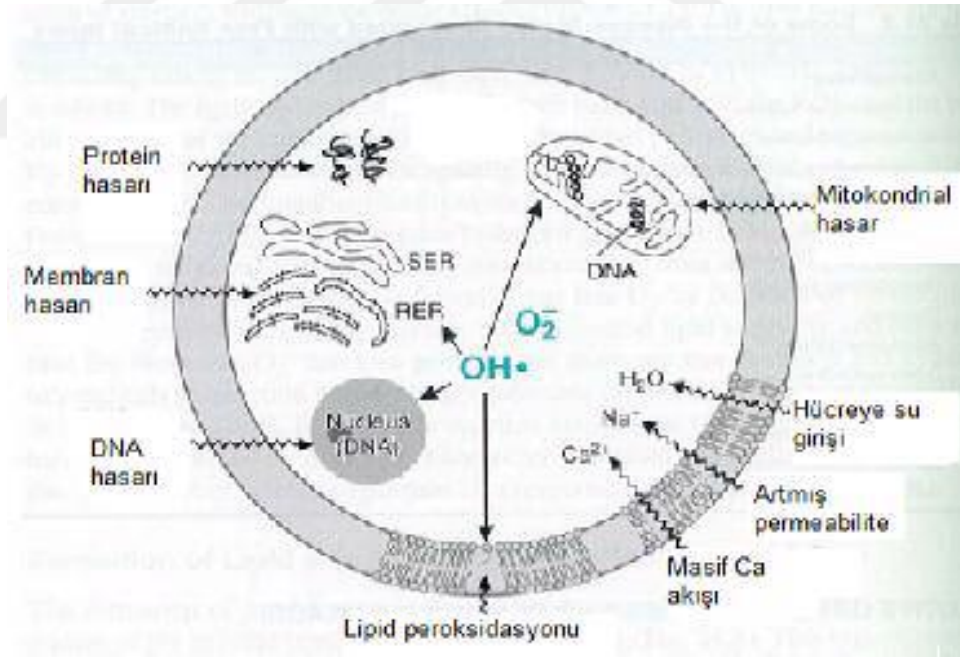
3.3.1 Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikal patolojisi, hücre membranlarındaki makromoleküllerin ve diğer makromoleküllerin yüksek oranda radikal reaksiyonlarına maruz kalmasını içerir. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle başta membran lipidleri olmak üzere, proteinler, karbonhidrat ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde

hasara yol açabilme özelliğine sahiptir. Bunların sonucunda işlev bozukluğu veya hücre ölümü olmakta ya da mutant özellikler kazandırarak tümör oluşturabilmektedirler. Bu zararlar hücrenin cinsine, maruz kalınan strese ve şiddetine bağlı olarak, toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilir (36-40).

Oluşan hasarlar kanser, ateroskleroz, amiloidoz, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, senil demans ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynadığı bilinmektedir (34).

Normal metabolizma sırasında ya da patolojik yolla ortaya çıkan serbest radikaller, hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır (41).



Şekil 3. Serbest Radikallere Bağlı Hasarlar (36)

3.3.1.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden ne derecede etkileneceği amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, sistein gibi amino asitler kolaylıkla etkilenirler. Protein oksidasyonu; ROT ve oksidatif stresin ikincil ara ürünlerinin proteinlerin kovalent modifikasyonuna neden olması ile oluşur. Proteinlerdeki bu değişiklikler sonrasında çeşitli hücre fonksiyonları (sinyal iletimi mekanizmaları, transport ve enzim sistemleri) etkilenir (42, 43, 44, 45).

3.3.1.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikallerin mutajenik etkilerinden dolayı DNA üzerinde önemli hasarlara neden olduğu bilinmektedir (117). DNA'nın yarılması, DNA-protein çapraz bağları, purinlerin otooksidasyonu gibi bazı durumlar ROT'nin özellikle de $\cdot\text{OH}$ 'nin neden olduğu hasarlardır. DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar da SOT'nden etkilenirler. DNA molekülünün hasarı kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenez, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara yol açar (42).

3.3.1.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Fizyolojik pH ve sıcaklıkta glukoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehitler oluşur. Glukoz aminoglikan olan ve sinoviyal sıvının vizkozitesinde önemli rol oynayan hyaluronik asit O_2 tarafından depolimerize olarak, bağ dokunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olmaktadır (41).

3.3.1.4. Serbest Radikallerin Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

Lipidler, biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Özellikle hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri serbest oksijen ürünleri ile yüksek oranda tepkimeye girer ve peroksidasyon meydana gelir. Membran akışkanlığını sağlayan bu doymamış yağ asitlerinin hasarı sonucu akışkanlıkta azalma olur (46, 47).

3.3.1.5. Serbest Radikallerin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

Lipid peroksidasyonunda, hücre membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asidi ile O_2^- radikali, lipid hidroperoksit (ROOH)'lerini oluşturmak için reaksiyona girer. Peroksidasyon şiddeti, lipidlerin doymamışlık derecesi ile orantılı olarak artar. Doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesi ile yağ asidi radikali oluşur. Buna oksijenin eklenmesi ile peroksil radikali (LOO^-) oluşur. LOO^- radikali zincir reaksiyonunun taşıyıcısıdır. Bir antioksidan tarafından önlenmezse komşu doymamış yağ asit moleküllerini okside eder. Bu durumda yeni radikallerin ve toksik aldehytlerin oluşmasına neden olan ROOH'leri meydana gelir. Lipid peroksidasyonu membran yapısına ve diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Membran geçirgenliği ve membran akışkanlığı ciddi şekilde etkilenir. Bu durumda yeni radikallerin ve toksik aldehytlerin oluşmasına neden olan ROOH'leri meydana gelir. Membranda lipid peroksidasyonu sonucu:

- a. Membran transport sistemleri bozulur (38, 46, 48).
- b. Hücre içi ve hücre dışı iyon dengeleri bozulur.
- c. Hücre içi Ca konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur.
- d. Hücre içi organellerde oluşan lipid peroksidasyonu ve litik enzimlerin salgılanmasına bağlı hücre hasarı gelişir (46, 48-50).

derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit düzeylerinin indikatorü olarak kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonu, ROOH'lerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden sonuncusu olan MDA, tiyobarbiturikasit (TBA) testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksidasyonunun saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (36, 46, 47, 52).

3.3.1.6. Serbest Radikallerin Böbrek Dokusu Üzerine Etkileri

Böbrekler aerobik metabolizmanın belirgin bir şekilde görüldüğü, canlılar için önemli bir organdır. Beden sıvı elektrolit dengesini korumak için, böbrekler tüm beden ağırlığının % 1'ini oluşturmalarına rağmen, bütün beden O₂ tüketiminin % 10'undan sorumludur. Kardiyak outputun % 20'sine de maruz kalan süzme organı böbrekler, bu özelliklerinden dolayı dolaşımdaki polimorfonükleer lökosit (PMN)'lerin ve monositlerin glomerüllere ve dokular arası boşluğa geçmesi sonucunda ek bir oksidan strese maruz kalırlar (53, 54).

Böbrekler, yüksek O₂ tüketimi ve metabolik aktiviteye ek olarak, infiltratif hücreler ve kendi yerleşik hücrelerinden de ROT'leri oluşması nedeniyle zaman zaman, kendi antioksidan korunma mekanizmasını aşan oksidan stresle karşılaşmakta ve böbreklerde ROT'lerine bağlı doku hasarları oluşmaktadır. Deneysel böbrek iskemisinde, elektron transport zinciri, ksantin oksidaz gibi oksidan enzimler, fagositler, epinefrinin otooksidasyonu ve araşidonik asit metabolitleri, ROT'lerinin kaynaklarını oluşturmaktadır (55, 56).

SOR'leri, hücre ve organel zarlarında lipid peroksidasyona neden olarak ve özellikle proksimal tübül segmentlerinde, tübül yapısını, hücre transport kapasitesini ve enerji üretimini bozarak etkilerini gösterirler (57, 58). Deneysel

immün glomerülonefritte SOR, PMN ve monositler gibi kan kaynaklı infiltratif hücrelerden oluşurlar ve glomerül hücrelerine ve özellikle mezenşial hücrelere yerleşirler. Bunların oluşması, morfolojik lezyonların meydana gelmesine, proteazların aktive olmasına, proteoglikan sentezinin düşmesine ve bunlara bağlı olarak proteinlere karşı glomerüler geçirgenlik artışının görülmesine neden olur (55-57).

Proksimal, distal ve toplayıcı segmentlerdeki böbrek tübüler hücrelerinin SOR'ları üretebildikleri bildirilmiştir. SOR'nin böbrek hasarındaki rolü glomerülonefrit, nefrotik sendrom, akut böbrek yetmezliği, toksik hasar, enfeksiyon, obstrüktif nefropati ve kronik böbrek yetmezliği gibi patolojiler deneysel modellerle in vivo hayvan deneyleriyle gösterilmiştir (58, 59).

Malign hastalıkların seyrinde böbrek fonksiyonları çok çeşitli nedenlere bağlı olarak bozulabilir. Kemoterapi bu nedenlerden en sık rastlananıdır. Bununla beraber, kemoterapi malign hastalıkların seyri sırasında böbrek fonksiyonlarının bozulmasının tek sebebi değildir. Malign hastalıkların seyrinde böbrek fonksiyon bozukluğunun nedeni malign hastalığın böbreği infiltre etmesi veya tümörün etkisine bağlı idrar yolu tıkanması gibi hastalığın doğrudan kendisine de bağlı olabilir. Bir diğer neden, neoplastik hücre yıkımının artmasına bağlı gelişebilecek tümör lizis sendromudur. Öte yandan malign hastalıklar, değişik mekanizmalarla gelişen hiperkalseminin sık rastlanan sebeplerinden biridir ve hiperkalsemi böbrek hasarına yol açabilir (60).

3.3.2. Oksidatif Stres

Hücreler, serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidan üretirler. Serbest radikallerin oluşumları ve bunların antioksidanlar

tarafından nötrale edilmeleri arasında bir denge vardır. Bu denge sayesinde hücreler serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez. Bu dengenin serbest radikaller lehinde bozulması halinde hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücredeki bu artışına ve hücre fonksiyonları üzerinde yapmış olduğu olumsuz etkiye oksidatif stres denir (36, 61).

3.3.3. Kemoterapi ve Oksidatif Stres

Kemoterapide kullanılan birçok ajanın, organizmada oksidatif stresi artırdığı tespit edilmiştir. Bu durum, kemoterapotiklerin toksik etkilerinden de sorumlu tutulmaktadır. Onların arasında antrasiklinler en çok SOR seviyelerini yükseltenlerdir. Doksorubisin ve bleomisin kemoterapisinin, kanser hastalarının PMN'lerinde oksijen radikali ve H_2O_2 üretimini artırdığı gösterilmiştir. Doksorubisin iki farklı mekanizma ile SOR oluşturabilir, kinon ve oksijen radikalleri üreten redoks siklusu ve $\cdot OH$ radikalleri üreten doksorubisin-Fe kompleksleri tarafından katalize edilen Haber-Weiss tipi reaksiyondur (62).

3.4. Antioksidanlar

Serbest radikalleri ortadan kaldıran, oksidasyonunu engelleyen ya da oksidasyon reaksiyonun gecikmesine neden olan maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Yani antioksidanlar, SOR'ni etkisiz hale getirip, reaksiyonları yavaşlatıp, sonlandırıp ya da SOR'nin olumsuz etkilerini azaltmaya çalışırlar (36, 63).

Bazı araştırmacılar antioksidan savunmayı enzimatik savunma ve nonenzimatik savunma olarak gruplandırmışlardır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve

glutasyon-S-transferaz (GST)'ın rol aldığı antioksidan aktivitelerini “enzimatik antioksidan savunma”, vitamin A, vitamin E, askorbat, GSH gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini ise “nonenzimatik antioksidan savunma” şeklinde adlandırmışlardır. Yapılan çalışmalar, antioksidanların serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücrelerin zarar görmesini engellediğini ortaya koymuştur (2, 62-67).

3.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

Tablo 4. Başlıca Enzimatik Endojen Antioksidanlar (36)

Antioksidan	Reaksiyonu
SOD	$O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.
GSH-Px	LOOH'lerin indirgenmesinden sorumludur. Özellikle eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan enzimidir.
GR	GSH-Px vasıtasıyla LOOH'lerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonu (GSSG) tekrar redükte glutatyona (GSH) dönüşümünü kataliz eder.
GST	Lipid peroksitlere karşı GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.
CAT	H_2O_2 'i ve $\cdot OH$ radikallerinin oluşumunu önlemek için bunları H_2O ve O_2 'e parçalar.

3.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD enzimi, iki molekül $O_2^{\cdot-}$ 'ini dismutasyona uğratarak H_2O_2 ve O_2 oluşturur (68, 69).

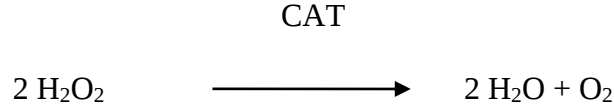


Aynı kinetik özelliğe sahip üç farklı SOD enzimi tarif edilmiştir. Biri prokaryotlarda bulunan aktif bölgesinde demir (Fe) içeren, diğeri prokaryot ve ökaryot hücrelerin mitokondrisinde mangan (Mn) içeren, üçüncüsü ise ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bakır (Cu) ve çinko (Zn) içerendir. Bir de klasik sitozolik Cu/Zn SOD'dan immunolojik olarak farklı olan ekstrasellüler Cu/Zn SOD tarif edilmiştir. Bu enzim serbest oksijen radikallerine karşı savunmada ilk basamak olabilir ve hücreler veya organizmalar oksidatif strese maruz kaldıklarında hızla indüklenabilir (70-72).

Aerobik tüm hücreler SOD içerirler. Hem sitozol, hem de mitokondrilerde bulunan bu enzim $O_2^{\cdot-}$ radikallerini etkisizleştirerek, hücreleri $O_2^{\cdot-}$ 'nin zararlı etkilerinden korur. SOD tam anlamıyla detoksifiye edici bir enzim değildir. Çünkü ürünü olan H_2O_2 toksik bir ajandır. Ama $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonuna giden enzimatik yolun ilk basamağıdır. İkinci basamak CAT'a dayanır ve bu enzim de H_2O_2 'in su (H_2O)'ya dönüşmesini sağlar (42, 72).

3.4.1.2. Katalaz (CAT)

Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan ve yapısında hem içeren bir protein olan CAT, H_2O_2 'in O_2 ve H_2O çevrilmesini katalizler. Enzim aktif bölgesinde katalitik aktivitesinden sorumlu bir hem grubu içerir (42, 72).



Birçok memeli hücre tipinde bulunan CAT çok farklı konsantrasyonlarda bulunur. Enzim böbrek ve karaciğerin peroksizomları gibi subsellüler organellerde veya diğer hücre çeşitlerinde bulunan mikroperoksizomlar gibi daha küçük organellerde yerleşirler. Karaciğer, böbrek gibi yüksek CAT içeriği olan organlarda düşük H_2O_2 konsantrasyonu, düşük CAT içeriği olan kalp, beyin gibi dokularda daha fazla H_2O_2 konsantrasyonu vardır (72, 73, 74).

CAT metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini de sağlar, ancak LOOH gibi büyük moleküllere karşı etkili değildir. CAT ve GSH-Px arasındaki karakteristik H_2O_2 metabolizmasını paylaşma, iki enzim dağılımına da yansımıştır (42, 71, 73).

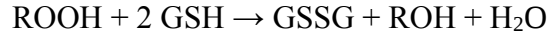
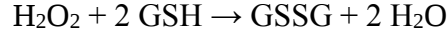
3.4.1.3. Glutatyon-S-Transferaz (GST)

GST'ler üç sitozolik, bir de mikrozomal gruba ayrılırlar. Yabancı maddeleri GSH'daki $-\text{SH}$ grubu ile bağlayarak nötralize ederler. Bu şekilde ürünün daha fazla H_2O 'da çözünür hale gelmesini sağlayarak, organizmadan atılımını kolaylaştırırlar. GSH-Px enziminden sonra ROOH'lerinin detoksifikasyonunda önemli enzimdir (75, 76).

3.4.1.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px; H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu sağlayarak hücre membran lipidlerini oksidatif hasara karşı korumaktadır. Hücrelerdeki GSH redoks döngüsünün, H_2O_2 ve ROOH'lerin indirgenmesinde

hayati önemi vardır. Bu döngünün anahtar enzimi GSH-Px, substratı ise GSH'dır. Bu sitozolik enzim tetramerik dört selenyum atomu ihtiva etmektedir.

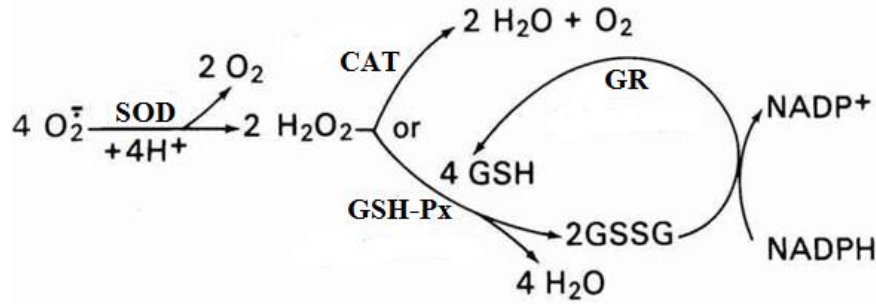


Özellikle eritrositlerin membran bütünlüğünün sağlanmasında görev yapmaktadır. GSH-Px enzimi iki farklı kategoride ele alınmaktadır;

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

Selenyumdan bağımsız GSH-Px: Diğer dokularda olmakla birlikte özellikle karaciğer mitokondrilerinde aktivitede bulunmaktadır.

Okside glutatyon (GSSG)/GSH oranı oksidatif stresin bir başka göstergesi olarak kabul edilmektedir. Örneğin eritrositlerdeki bu oran 1/500 seviyesinde tutulur. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açarak eritrosit hasarına neden olabilir. Antioksidan etkinliği kanıtlanmış olan vitamin E'nin özellikle membranlarda sınırlı olduğu durumlarda GSH-Px, membranları peroksidasyona karşı korumaktadır (73, 74).



Şekil 5. Antioksidanların Metabolizması (36)

3.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Tablo 5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar (36)

Antioksidan	Reaksiyonu
Melatonin	Lipofilik özellik göstermesinden dolayı hücrenin hemen hemen bütün organellerine kadar ulaşarak geniş bir dağılım gösteren melatonin $\cdot OH$ ve O_2^- radikallerini tutarak antioksidan etki gösterir.
Seruloplazmin	Ferro demiri (Fe^{+2}) ferri demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve $\cdot OH$ oluşumunu engeller.
Transferrin	Serbest Fe iyonlarını bağlayarak Fenton reaksiyonunu önler.
Laktoferritin	Düşük pH'lı ortamlardaki Fe iyonlarını bağlar.
GSH	Hb'in oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini önler.
Sistein	$\cdot OH$ ve O_2^- toplayıcısıdır.
Ürik Asit	Genelde metal bağlayıcı olarak çalışırken değişik radikalleri de toplar.
Glukoz	$\cdot OH$ gidericisidir.
Albumin	Proteini ve metal iyonlarını bağlar.
Biluribin	Önemli bir LOO^- toplayıcısıdır.

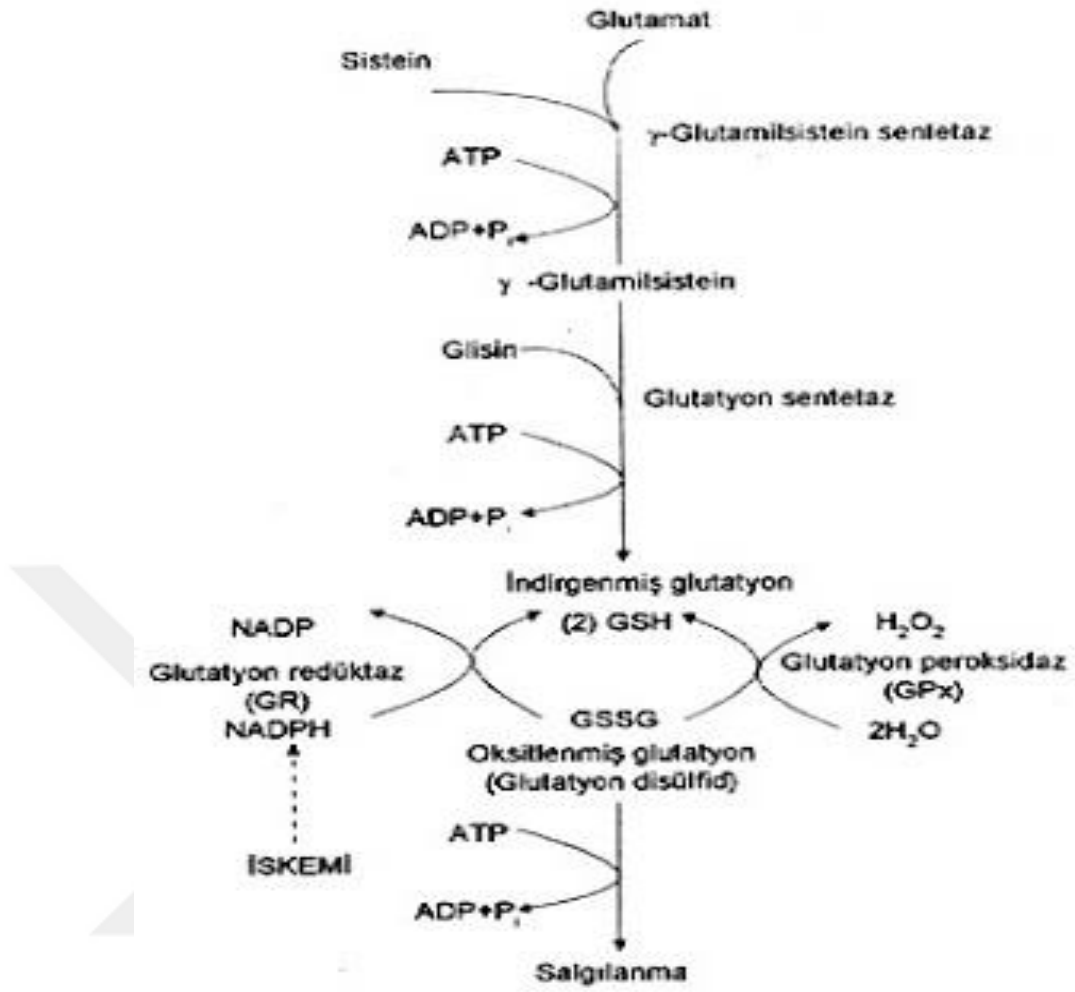
3.4.2.1. Glutatyon (GSH)

Tripeptit yapıdaki bu antioksidan glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşmaktadır. Hemen hemen tüm hücrelerde bulunmakta ve antioksidan olarak metabolik faaliyetler sırasında çok önemli rol oynamaktadır.

Glutatyon, GSH ve GSSG olmak üzere iki formda bulunmaktadır. GSH formu hücrede baskın olan formdur. Hücre GSH'unun % 80-85'i sitozolde, % 10-15'i mitokondride ve çok az bir kısmı endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. Mitokondrial GSH hücre için esansiyeldir. GSH sentezi için gerekli enzimler mitokondride bulunmadığı için mitokondri GSH'ı sitozolden sağlanmaktadır (77, 78).

GSH, GSH-Px ve GR gibi ksenobiyotiklerin, karsinojenlerin, serbest radikallerin ve lipopolisakkaridler gibi endojen ve eksojen zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan çok önemli bir antioksidan olarak bilinmektedir. GSH'ın peroksitlerle ve disüflitlerle GSH-Px enzimi varlığında reaksiyonu sonucu GSSG oluşmaktadır. GSSG konsantrasyonunda artış, oksidatif stresin bir göstergesi olmaktadır. GSSG, tiol içeren proteinlerin konformasyonu ve aktivitesi üzerine zararlı etkileri olan prooksidan bir madde olduğu için hızla redüklenmesi gerekmektedir (63).

Hücredeki önemli fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi, enzim aktivitesi regülasyonu gibi) yanı sıra antioksidan olarak da görev yapar GSH-Px, GR ve GST enzimlerinin substratı ve kosubstratıdır. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girip oksidatif hasara karşı koruma yapar. Karaciğer vücuttaki GSH'un en önemli kaynağıdır. Hb'in oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini engeller. Eritrosit ve lökositleri oksidatif strese karşı korur. SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak, birçok protein ve enzimin inaktivasyonunu engeller (63, 77).



Şekil 6. GSH Sentezi ve Siklusu (80)

GSH; hücre için en önemli antioksidan olmasının yanında, ksenobiyotik ve metabolitlerinin detoksifikasyonunun sağlanması, redoks durumunun düzenlenmesi, immün yanıt ve hücre farklılaşması gibi birçok hücre işlevinin kontrolünde önemli rollere sahiptir (79, 80).

3.5. Propolis

Propolis, bal arılarının çeşitli bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden topladığı özütleri, bal mumu ve diğer bitkisel maddelerle karıştırarak oluşturduğu, yapışkan, organik bir maddedir. "Arı tutkalı" olarak da bilinen propolis, arı

kovanında dolgu olarak kullanmak için bal arıları tarafından farklı bitki türlerinden toplanarak üretilen bir reçineli malzemedir Adını eski Yunanca'dan almakta olup, ön, giriş anlamına gelen “pro” ve topluluk, şehir anlamına gelen “polis” kelimelerinden oluşmaktadır (81) (Şekil 5).



Şekil 7. Propolisin Şekli (81)

Propolis, çam, meşe, huş, okaliptüs, kavak, kestane vb. ağaçlar ve bazı otsu bitkilerin tomurcuk, yaprak ve benzeri kısımlarından arılar tarafından toplanan ve mumla karıştırılarak kovan içerisinde birçok amaca yönelik olarak kullanılan zamk gibi yapışkan, reçinemsî kokulu ve rengi koyu sarıdan kahverengiye kadar değişen bir maddedir (81, 82).

Bal arıları propolisi, bal mumuna karıştırarak kovan girişinin küçültülmesinde petek yapımında, kovan duvarlarındaki çatlakların kapatılmasında, dış ortamdan izole edilmesinde, dezenfeksiyonunda ve kovanın içine giren zararlı maddeler, mikroorganizmalar ve böceklerin mumyalanarak etkisiz hale getirilmesi işlemlerinde kullanırlar. Buna bağlı olarak propolis bakteri, mantar ve virüslerle mücadelede etkilidir ve kovanda enfeksiyonlara karşı tüm arı popülasyonu için koruyucu olarak görev yapmaktadır (16). Aynı zamanda

propolisi kullanarak kovan içerisine giren büyük olup taşınamayan canlıları da mumyalayarak bir enfeksiyon oluşturmalarını önlerler (81).

Ham propolisin içeriği arıların propolis elde etmek için kullandıkları bitkinin kaynağına göre değişiklik göstermektedir. Propolis genel olarak % 50 oranında reçine ve bitkisel balzam, % 30 balmumu, % 10 kadar esansiyel ve aromatik yağ, % 5 oranında polen ve buna ek olarak % 5 kadar da diğer organik maddelerden oluşmaktadır (Tablo 6).

Tablo 6. Kavak, Kestane ve Okaliptus Propolislerinin Mum, Kül, Etanolik Propolis Ekstraktı (EEP) ve Toplam Fenolik Madde Miktarları (81)

Parametreler	Kavak	Kestane	Okaliptus
Mum (%)	30,68±0,89	40,01±0,31	30,71±0,17
Kül (%)	2,71±0,32	48,95±0,24	2,45±0,43
EEP (%)	60,25±0,80	3,66±0,12	52,22±0,23
Toplam fenolik madde (mg/g propolis)	127,39±12,08	125,30±19,83	87,62±8,93

Propolis doğal bir ürün olarak tıpta kullanmak üzere insanların dikkatini binlerce yıl önce çekmiş olup eski dönemlerde Avrupa, Kuzey Afrika, Mısır, Yunan ve Romalılar tarafından değişik hastalıkların tedavi edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Özellikle Mısırlılar propolisin çürümeye karşı önemli koruyucu özelliğinden dolayı ölümlerin mumyalanmasında yaygın olarak kullanmışlardır. Ancak propolis ilk olarak Yunanlılar tarafından keşfedildiği ve değişik hastalıkların iyileştirilmesinde antibiyotik olarak kullanıldığı

bildirilmektedir. Propolisin geleneksel ilaç olarak kullanımı M.Ö. 300 yıllarına kadar gittiği ve bunun antioksidan, antiinflamatuvar, antibiyotik ve antifungal aktivite gibi geniş kapsamlı biyolojik etkisinin olduğu bildirilmektedir. Propolis, Avrupa’da geleneksel tıpta kullanılırken, Japonya’da ise sağlıklı bir besin olarak kullanmanın yanında iltihap, kalp rahatsızlıkları, diyabet ve kanser tedavisinde kullanılabilmektedir. Propolisin biyolojik özellikleri ve içeriğinin araştırılması son yıllarda olmuştur (82-84).

Propolis çok değişik kimyasal maddeler içermesi ve antibakteriyel etkisinden dolayı kovan içinde arılar tarafından kullanımı dışında, ilaç ve kozmetik sanayii ile apiterapi merkezlerinde de çok yönlü olarak kullanılan bir maddedir (Tablo 7). Son yıllarda ülkemizde arı sütü ve arı zehiri üretimine dönük bazı çalışmalar yapılırken, propolis üretimi henüz çok yeni bir konudur. Ülkemizde propolis üretim teknikleri, muhafazası ve işlenmesi ile kullanım biçimi hakkında yapılmış çalışmalar çok azdır (82-84).

Tablo 7. Propolisin Yapısındaki Maddeler ve Miktarları (85)

Kısım	Oran (%)
Balzam ve reçine	50-70
Bitkisel mumlar	30-50
Esansiyel yağlar	10
Polen	5
Organik bileşikler ve mineraller	5

3.5.1. Propolisin Kaynakları

- Pinus spp. (Çam)'nin reçineleri
- Petula spp. (Huş)
- Populus spp. (Kavak)
- Aesculus hippocastanum (At keşanesi)
- Salix spp. (Söğüt)
- Alnus spp. (Kızılağaç)
- Abies spp. (Gökmar)
- Prunus spp. (Erik)
- Ulmus spp. (Karaağaç) vs (85).

Saf propolisi nitelendirmek için toplam fenolik maddeler, flavonoidler, mumlar, kül ve uçucu maddeler gibi parametreler çalışılmıştır. İnce tabaka kromatografi metodu (TLC) metodunun kullanılmasıyla, farklı coğrafik kaynaklı saf propolis örneklerindeki farklılıklar ve propolisteki bileşiklerin farklılıkları tespit edilebilir. En çok bulunan bileşikler benzoik asit ve benzaldehit türevleri, flavonlar, flavonoller ve flavanonlar olmuştur (85) (Tablo 8).

Tablo 8. Propoliste Belirlenen Bileşik Grupları ve Sayıları (84)

Bileşikler	Tanımlanan Bileşik Sayısı (adet)
Flavanoidler	38
Hidroksiflavonlar	27
Hidroksiflavononlar	11
Kalkonlar	2
Benzoik Asit ve Türevleri	12
Asitler	8
Esterler	4
Benzaldehit Türevleri	2
Sinamil ve Sinamik Asit ile Türevleri	14
Alkoller, Ketonlar, Fenoller	8
Heteroaromatik Bileşikler	12
Terpen ve Sekuterpen ve Türevler	7
Alifatik Hidrokarbonlar	6
Sekuterpen ve Triterpen Hidrokarbonlar	22

Bazı elementlerin içerikleri bitki kaynakları ve diğer faktörlerin farklılıklarından dolayı değişiklik göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, etanol ekstraktlarında makro ve mikro elementlerin içerikleri üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi analiz edilmiştir. Propoliste Mn, Cu, kobalt (Co),), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), nikel (Ni) ve krom mikro elementler, Ca, Mg, K, Na, Fe ve çinko (Zn) makro elementler olarak bildirilmiştir. Propolis ekstraktlarında incelenen elementlerin miktarı propoliste kendi içeriklerinin % 30'u altında olmuştur. Na, Mn, Zn ve Cd'un en iyi ekstraksiyonları sulu propolis ekstraktlarında (propolisteki içerikleri sırasıyla % 26,1, % 20,8, % 6,2 ve % 25) olurken, Cu, Na, K, Co, Pb, Cr ve Ni'in en fazla miktarı % 96 veya % 70'lik etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarında elde edilmiştir (86, 87).

B1, B2, B6, A, C, E, niasin, pantotenik asit gibi vitaminlerinde propolisin yapısında bulunabildiği gösterilmiştir. Propolis içerisinde triptofan, tirozin, treonin, alanin, fenilalanin, lösin, sistin, metiyonin, valin, serin, histidin, arginin, sistein, prolin, aspartik asit, glutamik ve lizin gibi amino asitlerden oluşmuş olan azot % 0,7 oranında bulunur. Adenozin trifosfataz, suksinat dehidrogenaz, glukoz-6-fosfataz ve asit fosfataz gibi enzimler de yapısında yer almaktadır. Farklı bölgelerden toplanıp elde edilen Türk propolisinin başlıca fenolik bileşenlerinin ise galangin, kuersetin ve kafeik asit olduğu da çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir (88).

Türk propolisinin kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden (Bursa, Erzurum-Aşkale, Gümüşhane-Sogutagil ve Trabzon-Çağlayan) toplanan propolis örneklerinin benzer kimyasal yapıya sahip oldukları belirlenmiştir. Her iki örnekte de aromatik asitler, alifatik asitler ve esterleri ve keton türevleri temel bileşik grupları olmuştur. Erzurum yöresinden toplanan tek örnek, kimyasal kompozisyon bakımından diğer iki örnekten daha çok farklılık göstermiştir. Bu propolisteki başlıca bileşiklerin aromatik asit esterleri ve alkoller olmasının yanı sıra, diğerleriyle karşılaştırıldığında fazla miktarda amino asit içerdiği de tespit edilmiştir. Bursa'nın farklı 3 yöresinden toplanan örnekler de flavonlar, aromatik asitler ve esterleri ile terpenoidler, flavonlar ve ketonlarca zengin olduğu bulunmuştur (88).

3.5.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin kokusu, rengi, yapısı ve kompozisyonu büyük ölçüde kovanın etrafında bulunan botanik kaynaklara, coğrafi konuma ve iklim koşullarına bağlı

olarak değişmektedir. Yüksek sıcaklıklarda, yumuşak, esnek ve çok yapışkan olup soğutulduğunda sert ve kırılgan hale gelir. Tipik propolis 70 °C’de sıvıdır ancak bazı örnekler için erime noktası 100 °C kadar yüksek olabilir. Sıcaklığın 15-20 °C arasında olması durumunda ise mum gibi elastik bir özellik göstermektedir. Propolisler genelde suda az oranda erirken, % 95’lik alkolde büyük oranda erime özelliği göstermektedir. Propolisin eter, kloroform, aseton ve diğer bir takım organik çözücülerle kısmen eridiği bildirilmektedir (89).

3.5.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri

Propolisin rengi sarı yeşilimsiden koyu kırmızı veya kahverengiye değişir. Propolis kovanda arılar tarafından çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır, rengi ve fiziksel özellikleri kaynağına göre değişmektedir.

Propolisin kimyasal bileşimi, toplandığı bitkilerin tür, toplandığı mevsim ve çeşitlerine göre farklılık gösterebilir. Propolisin bileşenleri, bal arıları tarafından çeşitli ağaçların doğrudan guddelerindeki sızan reçinelerden toplanır. Ham propolisin içeriği arıların propolis elde etmek için kullandıkları bitkinin kaynağına göre değişiklik göstermektedir. Propolis genel olarak % 50 oranında reçine ile bitkisel balzam, % 30 civarında balmumu, % 10 kadar esansiyel ve aromatik yağ, % 5 oranında polen ve buna ek olarak % 5 kadarda diğer organik maddelerden meydana gelmektedir. Propolisin 300 den fazla içeriği vardır bunlar; fenolik aldehytler, polifenoller, sekuiterpen kininler, kumarinler, steroidler, amino asitler ve inorganik bileşiklerdir. Buna ek olarak yapısında pinosembirin, akasetin, krisin, rutin, katesin, naringenin, galangin, luteolin, kamferol, apigenin, mirsetin, kuersetin olarak isimlendirilen flavonoidler ile birlikte kafeik asit ve sinamik asit gibi fenolik asitler de bulunmaktadır. Propolisin Ca, Mg, K, Na, Fe, Cu, Zn ve

Mn gibi değişik mineral maddeleri içerisinde bulundurduğu ifade edilmektedir. Propolisin yapısında ayrıca glukoz, fruktoz ve sukroz gibi şekerlerin bulunduğu bildirilmektedir. Propolisin B1, B2, C ve E gibi vitaminleri önemli düzeyde ihtiva ettiği belirtilmektedir.

Lipidler propoliste yaklaşık % 60,2 oranında bulunmakta olup bu miktarın % 49,09'unu yağ asitleri, % 50,91'ini ise steroller, hidrokarbonlar ve uzun zincirli alkoller gibi sabunlaşmayan maddeler meydana getirmektedir. Bunun yanında palmitik asit ve stearik asit bulunan doymuş yağ asitlerine örnek verilebilir. Doymamış yağ asitlerinden ise nervolik, eicosapentaenoic, araşidonik, oleik, linoleik ve linolenik gibi asitlerin propolisten izole dildiği bildirilmektedir.

Propolisin kimyasal bileşimi çok kompleks olup toplandığı alandaki floraya bağlıdır. Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'yı içeren sıcak bölgede, farklı kavak tomurcukların tomurcuk salgıları propolisin ana kaynağıdır. Tropikal bölgelerden toplanan propolisin karasal iklimle sahip bölgelerden toplanan propolisten farklı kimyasal yapı göstermesinin nedeni, vejetasyon farklılığından kaynaklanmaktadır. Propolisin arılar tarafından toplanma sezonunda, aynı bölgeden toplanmasına rağmen sezonlar arasında bile toplanan propolisin kimyasal yapısında farklılıkların olabildiği ifade edilmektedir. Bunun yanında, dünyanın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinde tespit edilen flavon ve flavonoidler; pinosembrin, pinobanksin, organik ve yağ asitleri, kafeik asit, 9-hekzadekanoik asit, sinnamik asit, ferulik asit, terpenler, lignanlar, ketonlar ve hidrokarbonlu bileşikler bulunmaktadır (88, 90).

3.5.4. Propolisteki Bazı Bileşiklerin Bilinen Farmakolojik Aktiviteleri

- **Flavonoidler;** Antimikrobiyal ve antioksidan özellikler, ateş düşürücü, kılcal damarların geçirgenliğini azaltır.
- **Apigenin;** Gastrik ülserin iyileştirilmesi
- **Acacetin;** Ateş düşürücü
- **Kaempferide;** Spazmolitik mikroorganizmaların asit direncine karşı etki
- **Ermanin;** Antimikotik
- **Galangin;** Bakteriostatik aktivite
- **Pinobanksin;** Antimikrobiyal etki
- **Pinostrobin;** Lokal anaestetik
- **Dihydroxy flavanoids;** kılcal damarların güçlendirilmesi (83, 90, 91).

3.5.5. Propolisin Tıbbi Amaçlarla Kullanımı

Propolisin antioksidan, antifungal ve antimikrobiyal etkileri gıda teknolojisinde kullanım alanı sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada yağ ilave edilmiş et ürünlerinin 8 haftalık muhafaza periyodu esnasında % 0,02 ve % 0,4'lük EEP ve % 0,28 potasyum sorbat uygulanmış ve % 0,4 EEP ile muamele edilen et ürünlerinin muhafaza süresinin, % 0,28 potasyum sorbat ile muamele edilenlerden daha uzun olduğu tespit edilerek propolisin et ürünlerinde koruyucu bir madde olarak kullanılabileceği önerilmiştir. Ayrıca propolisin donmuş balığın muhafazasında depo ömrünü 2-3 kat artırdığı, ızgaralık piliçlerin yemlerine belli bir miktar propolis eklenmesi durumunda ise piliçlerin kilo artışının % 20 oranında artış gösterdiği belirtilmiştir. Geleneksel hekimlikte yaygın kullanım alanı olan propolis, modern hekimlikte büyük çoğunlukla sentetik ilaçların

kullanılmasıyla önemini yitirmiştir. Ancak, son 20 yıl içerisinde sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara karşı dirençli hale gelmesi sonucu doğal ilaçların kullanımına karşı eğilim artmıştır (88, 91).

3.5.6. Propolisin Tedavi Edici Özellikleri

Propolisin geniş ölçüde tedavi edici özellikleri vardır. Propolis, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antioksidan, antiinflamatuvar, yara iyileştirmede, doku yenilemede ve anestezi özelliği ile birlikte birçok biyolojik aktivitenin gerçekleşmesinde etkili olduğu bildirilmektedir. Klinik çalışmalar propolisin bronşit ve benzeri rahatsızlıkların, influenza ve herpes, deri mantarları, diş ve diş eti rahatsızlıklarında, yanık, ülser ve apselerde, kulak enfeksiyonlarında, kolitde, vajinal ve servikal rahatsızlıklarda etkili olduğunu göstermiştir (88, 92).

Propolisin Tedavi Edici Özelliklerini Şöyle Sıralayabiliriz:

3.5.6.1. Antimikrobiyal Etkileri:

Yapılan birçok araştırma da doğal antibiyotik olarak bilinen propolisin yüksek antimikrobiyal olduğunu göstermiştir. Propolisin 9 tür mantar üzerinde, 21 tür bakteri üzerinde, Giardia'nın da dahil olduğu 3 protozoa türü üzerinde ve Herpes ve Influenza'nın da dahil olduğu geniş yelpazeli virüsler üzerinde inhibitör etkisi bildirilmiştir. Propolisin antimikrobiyal aktivitesinden flavanoidler, aromatik asitler ve esterlerin özellikle kafeik asit ve kafeatların olduğu belirtilmektedir (87, 88, 93). (Tablo 9).

Tablo 9. Propolis ve Ekstresinin Mikroorganizmalara Etkisi (85)

Bakteri	Açıklama
<i>Bacillus larvae</i>	Yok edici
<i>Bacillus subtilis</i>	Yok edici
<i>Helicobacter pylori</i>	Engelleyici
<i>Staphylococcus sp.</i>	Engelleyici
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bileşik etki
<i>Streptococcus sp.</i>	Yok edici

3.5.6.2. Antioksidant Etkileri

Propolisin antioksidan özelliği, serbest radikalleri tutmak ya da daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürmek sureti ile serbest radikalle etkileşime girip oksidan maddelerin aktivitelerini azaltır. Böylelikle serbest radikaller etkilerini kendilerine bağlamak sureti ile reaksiyonun zincirini kırmak ya da onarım yapmak sureti ile göstermektedirler. Propoliste bulunan flavonoidler propolisin en önemli bileşenlerinden birisidir. Propoliste bulunan temel bileşiklerden birisi olan flavonoidler ve diğer bileşenlerin serbest radikallerin zararlı etkisini azaltan önemli bileşikler olduğu bildirilmektedir. Propolisin yapısında bulunan ve antioksidan olarak kullanılan flavanoidlerin lipid peroksidasyonunu önlediği bildirilmektedir. Flavanoidler, iz elementler veya radikaller ile şelat yaparak antioksidan özellik göstermektedirler. Bazı flavonoidler doymamış yağ asitlerinin LOO[•]leri ile reaksiyona girip temizleyici görevi görüp lipid peroksidasyonunun başlangıç aşamasına etki edebilmektedir. Flavonoidlerin antioksidan etkileri peroksit iyonları, H₂O₂, lipid peroksit ve O₂⁻ radikallerini bulundukları ortamdan uzaklaştırma gibi bir aktivitesine bağlanmaktadır. Bu aktivitenin yanında flavonoidlerin lipooksijenaz ve siklo oksijenaz enzimlerini inhibe etmek sureti ile antioksidan etki gösterdikleri bildirilmektedir. Flavonoidler, şalkonlar ve yapısal

olarak bağlantılı bileşiklerin imidazol kinolin ve diğer heterosiklik mutajenlerin üzerinde antimutajenik aktiviteye sahip olduğu da gösterilmektedir. Kafeik asit esterleri (CAPE)'nin ve dihidroksi sinnamil gibi iki lipofilik derivasyonunun μmol konsantrasyonda 5-lipooksijenaz enzimini inhibe ettiği ve CAPE'in ayrıca insan nötrofillerin deksantin/ksantinoksidaz sisteminde reaktif oksijen üretimini bloke etmek sureti ile antioksidan bir etki oluşturduğu gösterilmiştir. Antioksidan etki ile bu bileşiklerin H_2O_2 üretimini önleyerek muhtemelen katarakt gelişimine karşı da etkili olabileceği üzerinde durulmuştur (88, 94, 95).

Propoliste 300 den fazla bileşenler bulunmaktadır. Bundan dolayı günümüzde propolis oksidatif stresle olan ilişkisinden önemini daha da artırmaktadır. Propolis bugün gıda olarak geniş ölçüde kullanılması ile kanser, diyabet, kalp hastalıkları ve yangı gibi hastalıklara engel olmakta ve sağlığın gelişmesine önemli katkısı bulunmaktadır. Propolis içinde bulunan bu bileşenlerin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antikanser dâhil çoğu biyolojik ve farmakolojik aktiviteler için kullanılmaktadır. Laboratuvar şartlarında propolis etanolik ekstraktları ve sulu ekstraktının yüksek antioksidatif özelliği olduğu kanıtlanmış ancak etanol preparatın sulu ekstraktan daha az aktif olduğu bildirilmiştir.

Propolis antioksidan etkisinde özellikle propolis ana bileşenlerinden birisi olan CAPE'inin önemli rolü olduğu bildirilmiştir. CAPE ROT'nin üretimini bloklamaktadır. Propolis ile yapılan çalışmalarda propolis lipid peroksidasyonunu düşürdüğü ve serbest radikal oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Propolis en önemli antioksidan mekanizması; serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarlarını tamir edici özellikte olmasından ve lipid peroksidasyonuna

neden olan polimerize zincir reaksiyonlarını kırıcı özelliği ile reaktif oksijen radikallerini dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Propolisin antioksidan etkisi alkoksi radikaller ve daha az olarak da O_2^- karşı serbest radikal temizleme etkilerinin sonucudur.. Arı tutkalının sulu ve etanolik ekstraktı propolisin antioksidatif özelliği geleneksel tıptaki antiinflamatuvar ilaçlar olarak kullanılmıştır. Basit biyokimyasal testler bu ekstraktların önemli bileşiklerin temel aktivitesini standardize etmek için başlatılmıştır (95).

3.5.6.3. Antikanser Etkileri

Propolisin etanol ekstraktının karaciğer ve mesanede kanserli hücreleri dönüşüme uğrattığı ve gelişmelerini önlediği bulunmuştur. Bu hücre öldürücü etkiyi sağlayan maddeler, propolisten izole edilen quercetin, kafeik asit ve clerodane diterpenoiddir. Clerodane diterpenoid, tümör hücrelerine karşı seçici öldürücü etki gösterir. Ayrıca göğüs, cilt, kolon ve böbrek kanseri hücreleri gibi insan ve hayvan tümör hücre kültürleri üzerinde öldürücü etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bu etkileri oluşturan bileşenin CAPE olduğu belirlenmiştir. Bu etki, kanserli hücrelerin gelişimini sağlayan genler üzerindeki seçici toksik etki ile gerçekleşmektedir. Propolisden izole edilen Artepillin C, insan gırtlak kanseri hücreleri, insan mide kanseri hücreleri ve fare kolon kanseri hücreleri üzerinde hücre öldürücü etki göstermiştir (88, 91, 96, 97).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmeleri

Çalışmada 3 aylık toplam 34 adet Wistar-Albino ırkı erkek rat kullanılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurul izni (Protokol No: 2014/10) alınmıştır. Bütün deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deney Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Deneysel uygulamalar, laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlara (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve 24 ± 3 °C) uygun olarak yürütülmüştür. Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari rat yemi (pellet yem) ve musluk suyu *ad libitum* sağlanmıştır.

Tablo 10. Rat Yeminin Bileşimi ve Kalori Değeri

Maddenin adı	Birim	Değer
Kuru madde	%	93,63
Ham protein	%	34,15
Ham yağ	%	3,00
Metabolik enerji	Kcal/kg	2095
Ca	%	3,36
Na	%	1,09
Mg	%	0,50
Zn	mg/kg	286,80
Fe	mg/kg	920,00
Cu	mg/kg	29,33
Ham maddeler	Balık unu, mısır, buğday, ayçiçeği küspesi, çavdar ve mineral maddeler	

4.2. Kullanılan Gereçler

Cihazlar:

- Homojenizatör
- Soğutmalı santrifüj
- Derin dondurucu
- Spektrofotometre
- pH metre
- Su banyosu
- Distile su cihazı
- Hassas terazi
- Vorteks
- Magnetik karıştırıcı

4.3. Kimyasal Maddeler

Araştırmamızda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma ve Merck firmalarından satın alınmıştır.

4.4. Yöntemlerin Uygulanması

4.4.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Hayvanlar 4 gruba ayrılmıştır:

1. **Grup:** Kontrol grubu (ratlara tedavi verilmemiştir) (n:7)
2. **Grup:** Propolis uygulanan grup (200 mg/kg/gün oral, 7 gün) (n:7)
3. **Grup:** CYP uygulanan grup (150 mg/kg/i.p. tek doz) (n:10)

4. Grup: CYP (150 mg/kg/i.p. tek doz) + Propolis (200 mg/kg/gün oral, 7 gün) uygulanan grup (n:10)

4.4.2. CYP ve Propolis Uygulaması

CYP serum fizyolojik (% 0,9'luk NaCl)'te, propolis % 70'lik etanolde çözülmüştür. CYP 150 mg/kg tek doz i.p.i olarak uygulanmıştır. Propolis 200 mg/kg/gün dozunda uygulanmıştır. Propolis uygulamasına oral olarak CYP tedavisinden 2 gün önce başlanmış ve 7 gün süre ile devam edilmiştir.

4.5. Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler

Uygulamaların sonunda ratlar sakrifiye edilerek kan ve böbrek doku örnekleri alınmıştır. Kan ile böbrek doku örnekleri biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Kan örnekleri antikoagülan (EDTA) içeren tüplerde toplanmış ve plazmalarını ayırmak için +4 °C'de 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Plazma örneklerinde Na, K, Ca, Cl, Mg, P, üre, ürik asit, kreatinin düzey tayinleri otoanalizörde (Cobas 8000 modular analyzer series: Roche) yapılmıştır.

4.6. Kan Örneklerinin Hazırlanması

4.6.1. MDA Tayini için Hazırlanması

MDA düzey tayini için alınan EDTA'lı kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları alınmış ve plazmada MDA düzeyleri ölçülmüştür.

4.6.2. GSH Tayini için Hazırlanması

Tam kanın 1:10 oranında distile su ile sulandırılması ile elde edilen hemolizatlarda GSH düzey tayini yapılmıştır.

4.6.3. CAT Tayini için Hazırlanması

Plazması ayrılan EDTA'lı kan örnekleri, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandıktan sonra eritrositler 1:5 oranında distile su ile sulandırılarak Hb tayini yapılmıştır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1:100 oranında 50 mM fosfat tamponu ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH:7.0) ile tekrar sulandırılmış ve hazırlanmış bu hemolizatlarda CAT aktivite tayini yapılmıştır.

4.7. Doku Örneklerinin Hazırlanması

4.7.1. MDA, GSH, CAT ve GST Tayini için Doku Örneklerinin Hazırlanması

Böbrek doku örnekleri serum fizyolojik ile yıkanarak iki süzgeç kâğıdı arasında suyu alınmıştır. Analizler öncesinde böbrek dokuları tartılarak distile su ile 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde, 3.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, GSH, CAT, GST ve protein tayinleri yapılmıştır.

4.8. Kullanılan Yöntemler

4.8.1. Plazma ve Dokuda MDA Düzeyinin Tayini

Prensip: MDA tayini Placer ve ark. (97) tarafından modifiye edilen yöntemle göre yapılmıştır. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbansı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyonun derecesi saptanmıştır.

Metodun Ayraçları

1- TBA: 0,67 g TBA 80 ml % 10'luk perklorik asitte çözülür ve 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

2- % 10 Triklorasetik Asit (TCA): 10 g TCA distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlanır. Ayıraç koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklanır.

3- Standart: Tetraetoxipropan

4- Renk Ayıracı: 3 kısım TCA solüsyonu ve 1 kısım TBA solüsyonu reaktif şişeye konularak 1 dakika magnetik karıştırıcıda karıştırılır. Ayıraç günlük hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 11. Plazma ve Doku MDA Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	0,25
Standart	-	0,25	-
Serum Fizyolojik	0,25	-	-
Renk Ayıracı	2,25	2,25	2,25

Tüpler karıştırıldıktan sonra 100 °C’de 20 dakika bekletilmiştir. Musluk suyu altında soğutma işleminden sonra tüpler 3.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz absorbansı 532 nm’de okunmuştur.

MDA Düzeyinin Hesaplanması:

$$\text{MDA} = \text{Örneğin OD} / \text{Standartın OD} \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$$

MDA düzeyleri; plazmada nmol/ml, dokuda nmol/g doku olarak verilmiştir.

4.8.2. Eritrosit ve Dokuda GSH Düzeyinin Tayini

Prensip: GSH düzeyi Elman (98) yöntemine göre tayin edilmiştir. Bu metod 5,5’ dithiobis-2-nitrobenzoik asit eklendiğinde sülfidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması temeline dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir.

Metodun Ayıraçları:

1- Çöktürücü Solüsyon: 1,67 g glasiyel metafosforik asit, 0,2 g disodyum EDTA ve 30 g NaCl saf suda çözünür, 100 ml’ye tamamlanır.

2- 0.3 M Na₂HPO₄ Solüsyonu: 42,58 g Na₂HPO₄ distile suda çözünür, 1 L’ye tamamlanır. +4 °C’de saklanır.

3- Elman Ayıracı: 20 mg 5.5’-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) % 1’lik Na-sitrat çözeltisi ile 100 ml’ye tamamlanır.

4- GSH Standartı: 2 mg/dl GSH solüsyonu hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

Deney esnasında 1 ml distile su (kör) ve 1 ml örnekler üzerine 1,5 ml çöktürücü solüsyondan konulup, vortekslenmiş ve 3.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant deney ortamında kullanılmıştır.

Tablo 12. Eritrosit ve Doku GSH Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)	Standart (ml)
Süzüntü	0,25	0,25	0,25
Na ₂ HPO ₄	1	1	1
Elman Ayırıcı	0,125	0,125	0,125

Tüpler karıştırıldıktan sonra 412 nm’de köre karşı absorbanslar okunmuştur.

GSH Düzeyinin Hesaplanması:

GSH (µmol/ml)= Örneğin OD / Standartın OD x Standartın Konsantrasyonu x Dilüsyon

GSH düzeyleri; kanda ve dokuda µmol/ml olarak verilmiştir.

4.8.3. Eritrosit ve Dokuda CAT Aktivitesinin Tayini

Prensip: Eritrosit ve doku CAT aktivitesi Aebi (99) metodu ile ölçülmüştür. CAT H₂O₂’in yıkımını katalize eder. H₂O₂’in CAT tarafından yıkım hızı, H₂O₂’in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür.

Metodun Ayıraçları

1- 50 mM Fosfat Tamponu (pH: 7.0): 6,81 g KH₂PO₄ 1 L’ye tamamlanır. 8,9 g Na₂HPO₄ (2 H₂O) 1 L’ye tamamlanır, pH: 7.0’ye ayarlanır.

2- 30 mM H₂O₂ Çözeltisi: 0,34 ml % 30’luk H₂O₂ fosfat tamponu ile 100 ml’ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Tablo 13. Eritrosit ve Doku CAT Aktivite Ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Fosfat Tamponu	1	-
H ₂ O ₂	-	1
Örnek	2	2

240 nm’de kör ile sıfır ayarı yapıldıktan sonra örneğin 0. (OD1) ve 30. (OD2) saniyedeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle CAT aktivitesi hesaplanmıştır.

CAT Aktivitesinin Hesaplanması:

$$k = (2.3 / 30) \times (\log OD1 / OD2) \times \text{Dilüsyon}$$

CAT’ın spesifik aktivitesi; kanda k/g Hb, dokuda k/mg protein olarak verilmiştir.

4.8.4. Dokuda GST Aktivitesinin Tayini

Prensip: GST’lar GSSG ile elektrofilik maddelerin konjugasyonunu katalizleyen bir grup enzimdir. Enzim aktivitesi 340 nm’de 37 °C’de GSH ve 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılarak dakikada oluşan S-2,4 dinitrofenil glutatyonun 1 µmol’unu katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenir. GSH ile CDNB bileşiğinin konjugasyonu sonucu oluşan ürün 1-(S-glutatyonil)-2,4 dinitrobenzen spektrofotometrik olarak 340 nm’de ölçülür (100). Bir ünite enzim, 25 °C’de bir dakikada 1 µmol substratı (CDNB), 1-(S-glutatyonil)-2,4 dinitrobenzene çeviren enzim aktivitesidir.

Metodun Ayıraçları

- 1- **0,1 M Tris Tamponu (pH 7.4):** 6,05 g Tris tartılır ve distile suda çözülür. pH 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.
- 2- **1 mM CDNB:** 2 mg CDNB tartılır ve 10 ml etanolde çözülür.
- 3- **5 mM GSH:** 15 mg GSH tartılır ve distile suda çözülür.

Deneyin Yapılışı:

Tablo 14. Doku GST Aktivite Ölçümü

	Kör (µl)	Örnek (µl)
CDNB	100	100
GSH	100	100
Tris Tamponu	2,2	2,2
Örnek	-	100
Distile Su	100	-

Tüpler karıştırılarak 25 °C'de 340 nm dalga boyunda 0. (OD1) ve 2. (OD2) dakikadaki absorbanlar okunmuştur.

GST Aktivitesinin Hesabı:

GST Aktivitesi (µmol/dakika/ml) = $\Delta OD / t \times V \text{ toplam} / 0,0096 \times V$
örnek

ΔOD = Optik dansite değişimi

9,6 = 1 µmol CDNB'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

V toplam = Toplam hacim

V örnek = Örnek hacmi

GST'in spesifik aktivitesi; dokuda U/mg protein olarak hesaplanmıştır.

4.8.5. Hb Düzey Tayini

Prensip: Hb tayini siyanomethemoglobin yöntemi ile yapılmıştır (101). Ferrisiyanür hemoglobindeki Fe^{+2} 'yi oksitleyerek +2 değerden +3 değerli Fe^+ e çevirir, methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile stabil bir pigment olan siyanomethemoglobin meydana gelir. Siyanomethemoglobinin absorbanı 546 nm'de okunur.

Metodun Ayraçları

1- Drabkin Çözeltilisi: 50 mg KCN, 200 mg $K_3Fe(CN)_6$ ve 1 g $NaHCO_3$ tartılarak bir miktar distile suda çözülür ve L'ye tamamlanır. Koyu renkli şişede 1 yıl dayanır.

2- Hb Standartı: 18 g liyofilize Hb standardı 100 ml distile suda çözülür. Bu standart 18 g/dl Hb içerir.

Deneyin Yapılışı:

Tablo 15. Hb Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Drabkin Çözeltilisi	5	5	5
Hb Standardı	-	0,02	-
Hemolizat	-	-	0,02

Tüpler iyice karıştırılmıştır. Oda ısısında 20 dakika bekletilmiştir. 546 nm'de köre karşı diğer tüplerin absorbanları okunmuştur.

Hb Düzeyinin Hesaplanması:

$$\text{Hb (g/dl)} = (\text{Örneğin OD} / \text{Standartın OD}) \times 18$$

4.8.6. Dokuda Protein Tayini

Prensip: Homojenatlardaki protein miktarı modifiye Lowry (102) yöntemine göre ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks yapar. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom Cu bağlar. Fenol ayırıcı, Cu ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk şiddeti 650 nm dalga boyunda okunur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapılmıştır.

Metodun Ayraçları

1- Alkali Bakır Ayırıcı: 10 g Na₂CO₃, 0,1 g potasyum tartarat ve 0,05 g bakır sülfat, 0,5 N NaOH içinde çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

2- Fenol Ayırıcı: 2 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayırıcından 3,75 ml alınır, distile su ile 67,5 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltideki örnek sayısına göre çalışma anında günlük olarak hazırlanır.

3- Protein Standartı: 50 µg/ml Sığır Serum Albumin (BSA)

Deneyin Yapılışı :

Tablo 16. Protein Düzey Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Alkali Bakır Ayıracı	1	1	1
Örnek	-	-	1
Distile Su	1	-	-
Standart	-	1	-
Tüpler iyice karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında bekletilir			
Fenol Ayıracı	4	4	4

Tüpler hemen vortekste iyice karıştırılmış ve 5 dakika 55 °C’de bekletilmiştir. İnkubasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutulmuştur. Daha sonra 650 nm’de standart ve örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okunmuştur.

Protein Düzeyinin Hesaplanması:

Protein (µg/ml)= (Örneğin OD / Standartın OD) x Standartın Konsantrasyonu x Dilüsyon

4.8.7. Plazma Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Üre, Ürik Asit, Kreatinin Düzey

Tayini

Plazma örneklerinde Na, K, Ca, Cl, Mg, P, üre, ürik asit, kreatinin düzey tayini otoanalizörde (Cobas 8000 modular analyzer series: Roche) yapılmıştır.

4.9. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 21 paket programı kullanılmıştır. Grup ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi

(One-Way ANOVA) kullanılarak hesaplanmıştır. Post-hoc olarak Duncan testinden faydalanılarak, tüm değerler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (ortalama $\pm$ SEM) şeklinde hesaplanmıştır.



5. BULGULAR

5.1. Plazma MDA Düzeyi

150 mg/kg CYP, 200 mg/kg/gün propolis uygulanan deney gruplarının plazma MDA düzeyleri, kan GSH düzeyleri ve CAT aktivitelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 17’de gösterilmiştir.

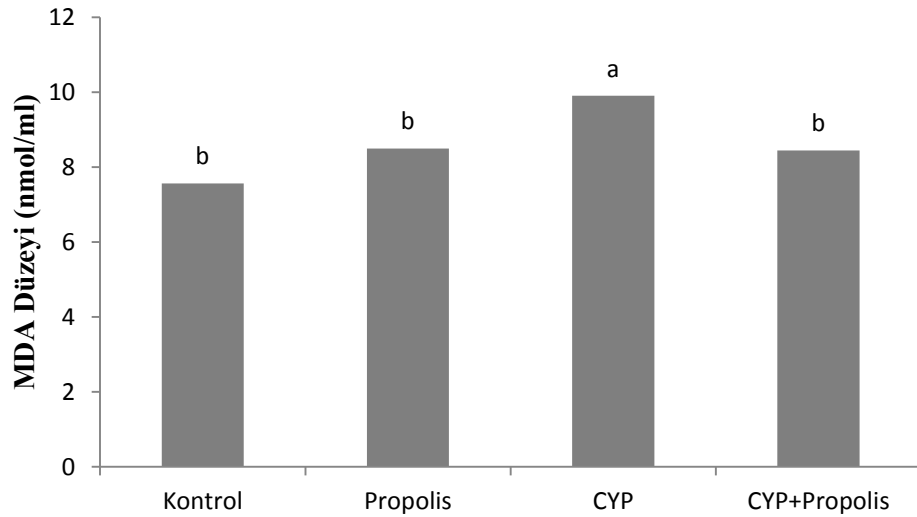
Tablo 17. CYP ve Propolis Uygulanan Ratlarda Kan MDA, GSH Düzeyleri ve CAT Aktiviteleri

Parametreler	Kontrol	Propolis	CYP	CYP+Propolis
MDA(nmol/ml)	7,57±0,37 ^b	8,50±0,67 ^b	9,91±0,27 ^a	8,45±0,42 ^b
GSH (μmol/ml)	34,99±0,52 ^a	33,25±1,37 ^a	26,75±0,89 ^b	33,98±1,55 ^a
CAT (k/g Hb)	50,04±1,09 ^a	49,07±0,84 ^a	45,03±0,51 ^b	48,53±1,28 ^{ab}
P	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05

^{a, b}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Plazma MDA düzeyleri; kontrol grubunda $7,57 \pm 0,37$ nmol/ml, propolis uygulanan grupta $8,50 \pm 0,67$ nmol/ml, CYP uygulanan grupta $9,91 \pm 0,27$ nmol/ml, CYP+propolis uygulanan grupta ise $8,45 \pm 0,42$ nmol/ml bulunmuştur (Tablo 17).

CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma MDA düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma MDA düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma MDA düzeyleri istatistiksel açıdan azalış göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 8).

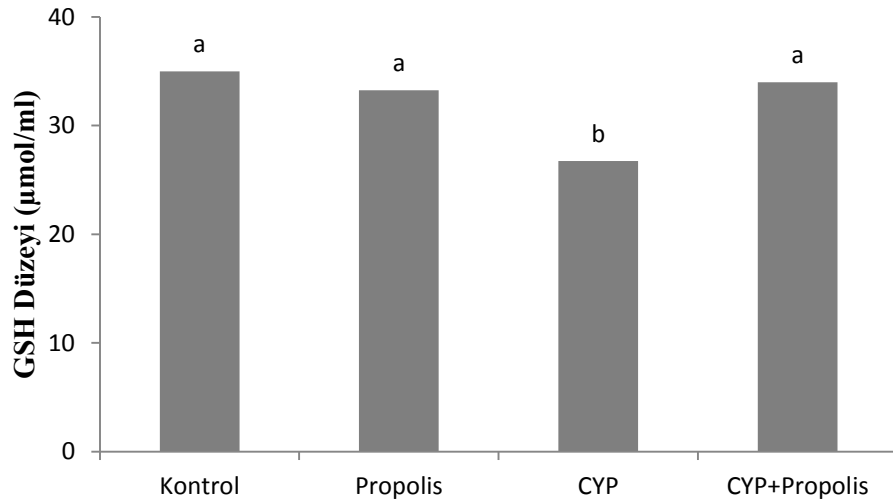


Şekil 8. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Plazma MDA Düzeyleri

5.2. Eritrosit GSH Düzeyi

Kan GSH düzeyleri; kontrol grubunda $34,99 \pm 0,52$ $\mu\text{mol/ml}$, propolis uygulanan grupta $33,25 \pm 1,37$ $\mu\text{mol/ml}$, CYP uygulanan grupta $26,75 \pm 0,89$ $\mu\text{mol/ml}$, CYP+propolis uygulanan grupta $33,98 \pm 1,55$ $\mu\text{mol/ml}$ bulunmuştur (Tablo 17).

CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan GSH düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan GSH düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında kan GSH düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 9).

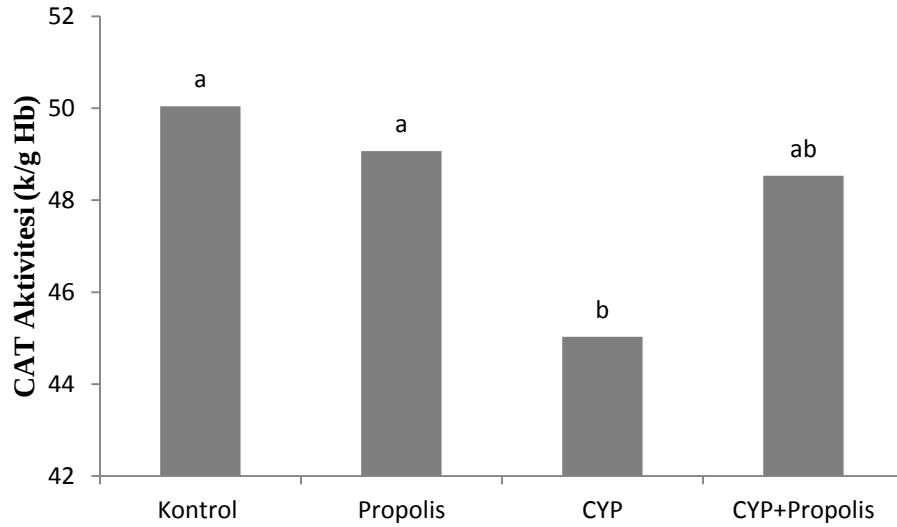


Şekil 9. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Eritrosit GSH Düzeyleri

5.3. Eritrosit CAT Aktivitesi

Kan CAT aktiviteleri; kontrol grubunda $50,04 \pm 1,09$ k/g Hb, propolis uygulanan grupta $49,07 \pm 0,84$ k/g Hb, CYP uygulanan grupta $45,03 \pm 0,51$ k/g Hb, CYP+propolis uygulanan grupta $48,53 \pm 1,28$ k/g Hb bulunmuştur (Tablo 17).

CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan CAT aktivitelerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında kan CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli bir bir fark gözlenememiştir (Şekil 10).



Şekil 10. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Eritrosit CAT Aktiviteleri

5.4. Eritrosit GST Aktivitesi

Rat kanında GST aktivitesi okunamayacak düzeyde olduğundan ölçülememiştir.

5.5. Böbrek Dokusunda MDA Düzeyi

150 mg/kg CYP, 200 mg/kg/gün propolis uygulanan deney gruplarının böbrek dokusunda MDA, GSH düzeyleri, CAT ve GST aktivitelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 18’de gösterilmiştir.

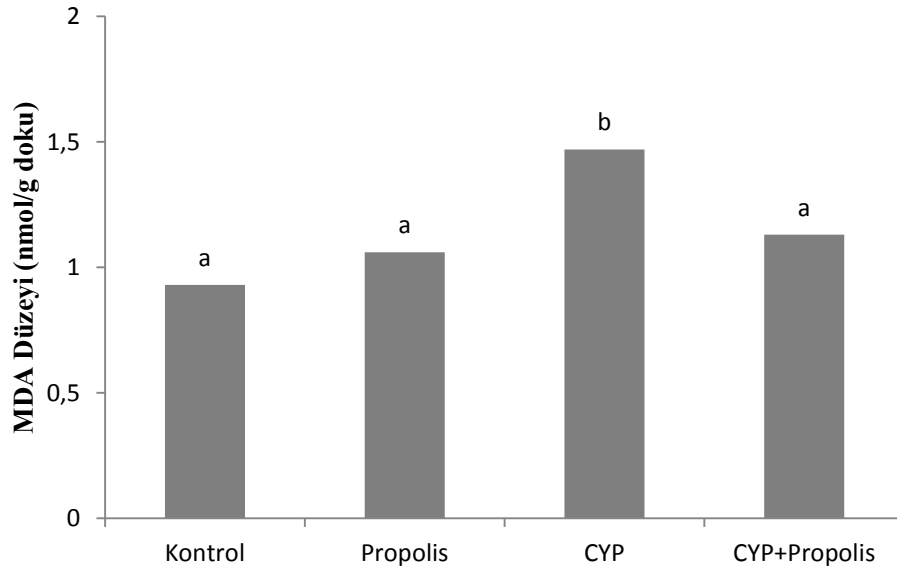
Tablo 18. CYP ve Propolis Uygulanan Ratlarda Böbrek MDA, GSH Düzeyleri, CAT ve GST Aktiviteleri

Parametreler	Kontrol	Propolis	CYP	CYP+Propolis
MDA (nmol/g doku)	0,93±0,05 ^a	1,06±0,02 ^a	1,47±0,04 ^b	1,13±0,08 ^a
GSH (µmol/ml)	12,47±0,21 ^a	11,24±0,44 ^a	8,75±0,45 ^b	12,60±0,83 ^a
CAT (k/g protein)	104,59±4,68 ^a	100,47±8,30 ^a	77,19±3,71 ^b	97,08±4,68 ^a
GST (U/g protein)	1,31±0,08 ^a	1,37±0,09 ^a	2,60±0,10 ^b	1,63±0,09 ^a
P	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05

^{a, b}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Böbrek dokusunda MDA düzeyleri; kontrol grubunda $0,93 \pm 0,05$ nmol/g doku, propolis uygulanan grupta $1,06 \pm 0,02$ nmol/g doku, CYP uygulanan grupta $1,47 \pm 0,04$ nmol/g doku, CYP+propolis uygulanan grupta $1,13 \pm 0,08$ nmol/g doku bulunmuştur (Tablo 18).

CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek MDA düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek MDA düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında böbrek MDA düzeyi istatistiksel açıdan önemli bir azalış göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 11).

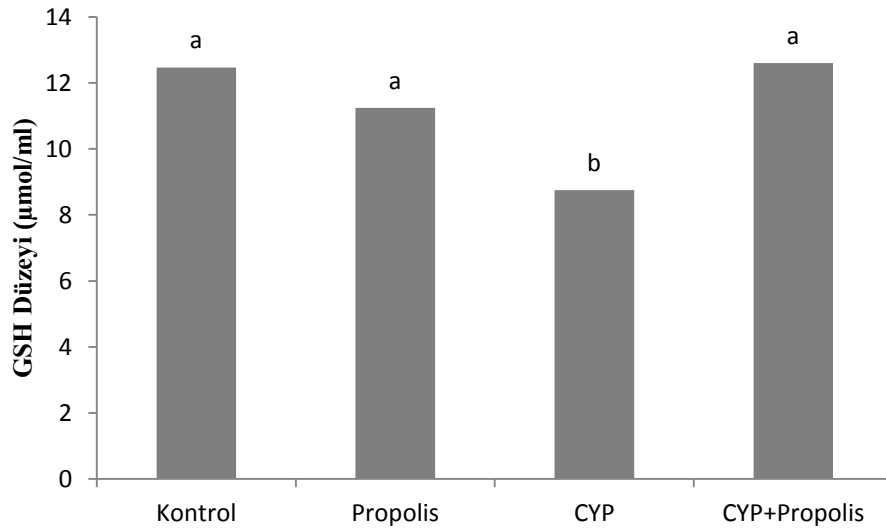


Şekil 11. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarının Böbrek Dokusunda MDA Düzeyleri

5.6. Böbrek Dokusunda GSH Düzeyi

Böbrek dokusunda GSH düzeyleri; kontrol grubunda $12,47 \pm 0,21$ $\mu\text{mol/ml}$, propolis uygulanan grupta $11,24 \pm 0,044$ $\mu\text{mol/ml}$, CYP uygulanan grupta $8,75 \pm 0,45$ $\mu\text{mol/ml}$, CYP+propolis uygulanan grupta $12,60 \pm 0,83$ $\mu\text{mol/ml}$ bulunmuştur (Tablo 18).

CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek GSH düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek GSH düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. CYP propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında böbrek GSH düzeyleri istatistiksel açıdan önemli bir artış göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 12).

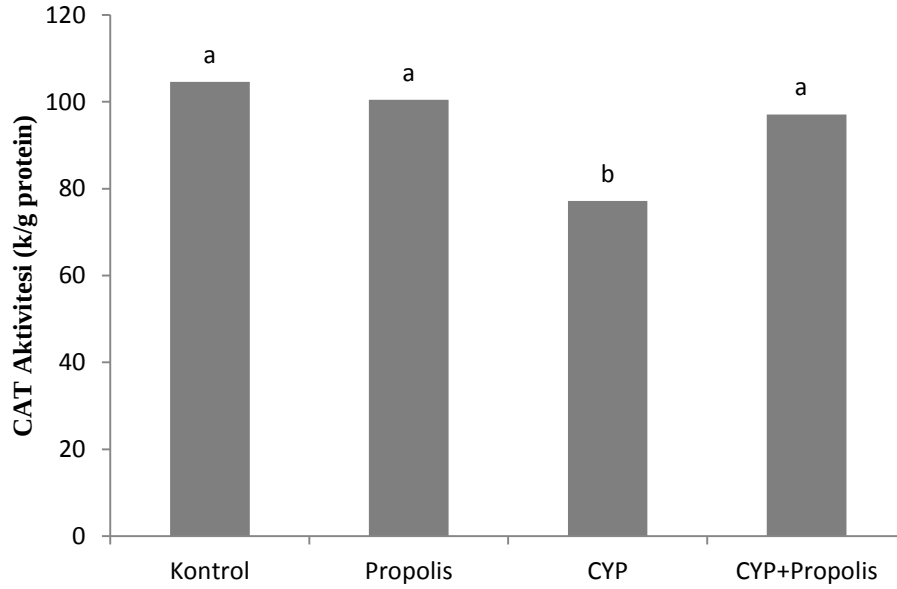


Şekil 12. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarının Böbrek Dokusunda GSH Düzeyleri

5.7. Böbrek Dokusunda CAT Aktivitesi

Böbrek dokusunda CAT aktiviteleri; kontrol grubunda $104,59 \pm 4,68$ k/g protein, propolis uygulanan grupta $100,47 \pm 8,30$ k/g protein, CYP uygulanan grupta $77,19 \pm 3,71$ k/g protein, CYP+propolis uygulanan grupta ise $97,08 \pm 4,68$ k/g protein olarak bulunmuştur (Tablo 18).

CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek CAT aktivitelerinde istatistiki olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan grup CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında böbrek dokusunda CAT aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli artış görülmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 13).

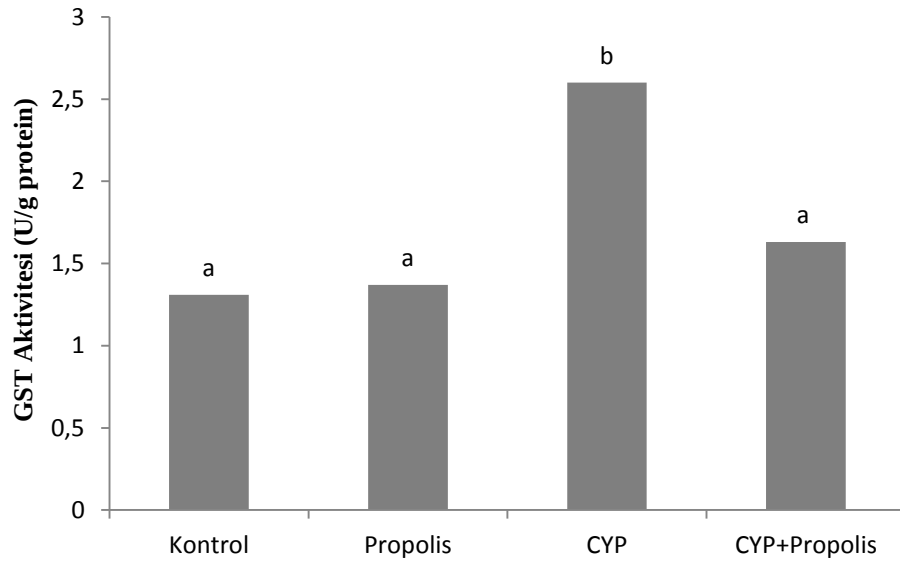


Şekil 13. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarının Böbrek Dokusunda CAT Aktivitesi

5.8. Böbrek Dokusunda GST Aktivitesi

Böbrek dokusunda GST aktiviteleri; kontrol grubunda $1,31 \pm 0,08$ U/mg protein, propolis uygulanan grupta $1,37 \pm 0,09$ U/mg protein, CYP uygulanan grupta $2,60 \pm 0,10$ U/mg protein, CYP+propolis uygulanan grupta $1,63 \pm 0,09$ U/mg protein bulunmuştur (Tablo 18).

CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek GST aktivitelerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek GST aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında böbrek GST aktivitelerinde istatistiksel açıdan azalış göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 14).



Şekil 14. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarının Böbrek Dokusunda GST Aktiviteleri

5.9. Plazma Örneklerinde Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Üre, Ürik Asit, Kreatinin Düzeyleri

150 mg/kg CYP, 200 mg/kg/gün propolis uygulanan deney gruplarının plazma örneklerinde Na, K, Ca, Cl, Mg, P, üre, ürik asit, kreatinin düzeylerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 19’da gösterilmiştir.

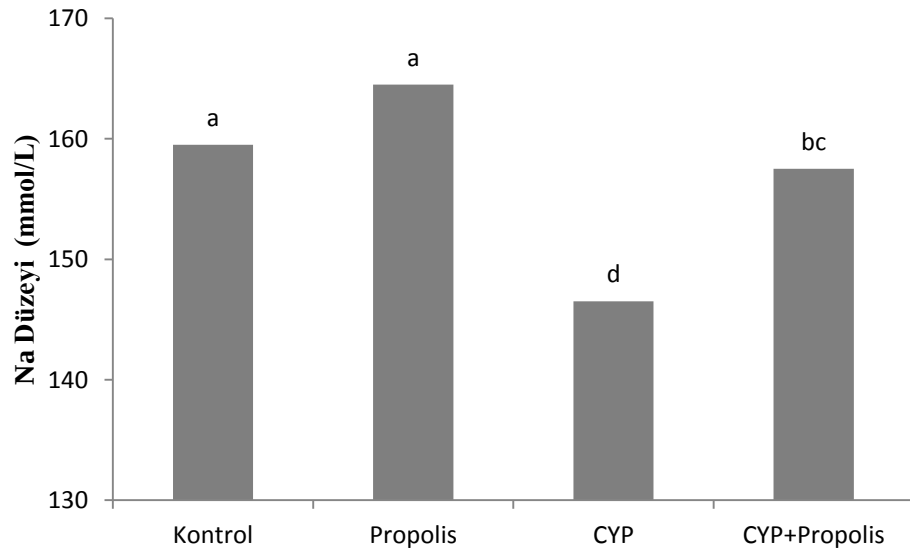
Tablo 19. Plazma Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Üre, Ürik Asit, Kreatinin Düzeyleri

Parametreler	Kontrol	Propolis	CYP	CYP+Propolis
Na (mmol/L)	159,50±2,88 ^a	164,50±3,17 ^a	146,50±3,25 ^d	157,50±1,36 ^{bc}
K (mmol/L)	18,17±0,56 ^a	20,11±1,84 ^a	14,14±0,93 ^b	17,28±0,90 ^{ab}
Ca (mg\dl)	0,15±0,02 ^a	0,11± 0,01 ^a	0,06 ±0,01 ^b	0,12±0,01 ^a
Cl (mmol/L)	113,0±2,88 ^a	109,0±2,30 ^a	102,0 ±2,54 ^b	110,0 ±1,11 ^a
Mg (mg/dl)	0,27±0,02 ^a	0,25±0,02 ^{ab}	0,15±0,01 ^c	0,21±0,01 ^b
P (mg/dl)	7,99±0,18 ^a	7,90±0,32 ^{ab}	6,48±0,12 ^c	7,36±0,09 ^b
Üre (mg/dl)	48,50±0,99 ^a	48,45±0,95 ^a	67,07±4,23 ^b	47,04±1,86 ^a
Ürik Asit (mg/dl)	0,22±0,03	0,23±0,005	0,29±0,02	0,21±0,02
Kreatinin (mg/dl)	0,37±0,01 ^a	0,36±0,04 ^a	0,49±0,02 ^b	0,33±0,02 ^a
P	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05

^{a, b, c}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Plazma Na düzeyleri; kontrol grubunda $159,50 \pm 2,88$ mmol/L, propolis uygulanan grupta $164,50 \pm 3,17$ mmol/L, CYP uygulanan grupta $146,50 \pm 3,25$ mmol/L, CYP+propolis uygulanan grupta $157,50 \pm 1,36$ mmol/L saptanmıştır (Tablo 19).

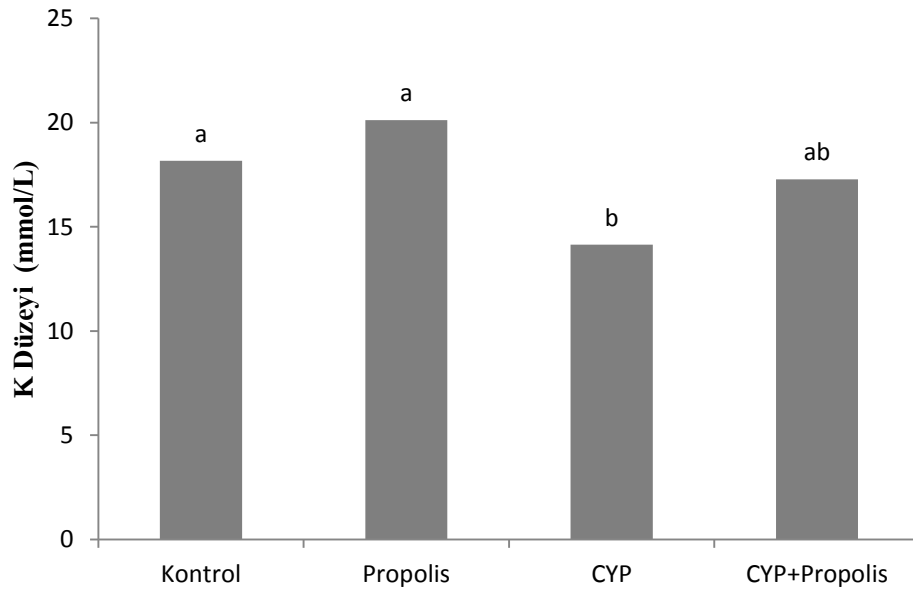
CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Na düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış görülmüştür ($p < 0.05$). Propolis uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Na düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma Na düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 15).



Şekil 15. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Plazma Na Düzeyleri

Plazma K düzeyleri; kontrol grubunda $18,17 \pm 0,56$ mmol/L, propolis uygulanan grupta $20,11 \pm 1,84$ mmol/L, CYP uygulanan grupta $14,14 \pm 0,93$ mmol/L, CYP+propolis uygulanan grupta $17,28 \pm 0,90$ mmol/L bulunmuştur (Tablo 19).

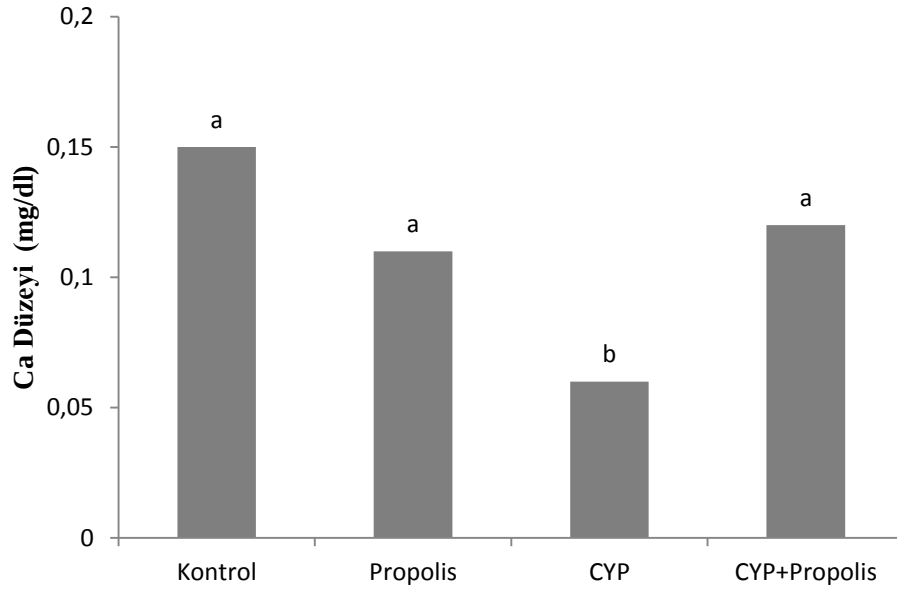
150 mg/kg CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma K düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma K düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma K düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır (Şekil 16).



Şekil 16. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma K Düzeyleri

Plazma Ca düzeyleri; kontrol grubunda $0,15 \pm 0,02$ mg/dl propolis uygulanan grupta $0,11 \pm 0,01$ mg/dl, CYP uygulanan grupta $0,06 \pm 0,01$ mg/dl, CYP+propolis uygulanan grupta $0,12 \pm 0,01$ mg/dl bulunmuştur (Tablo 19).

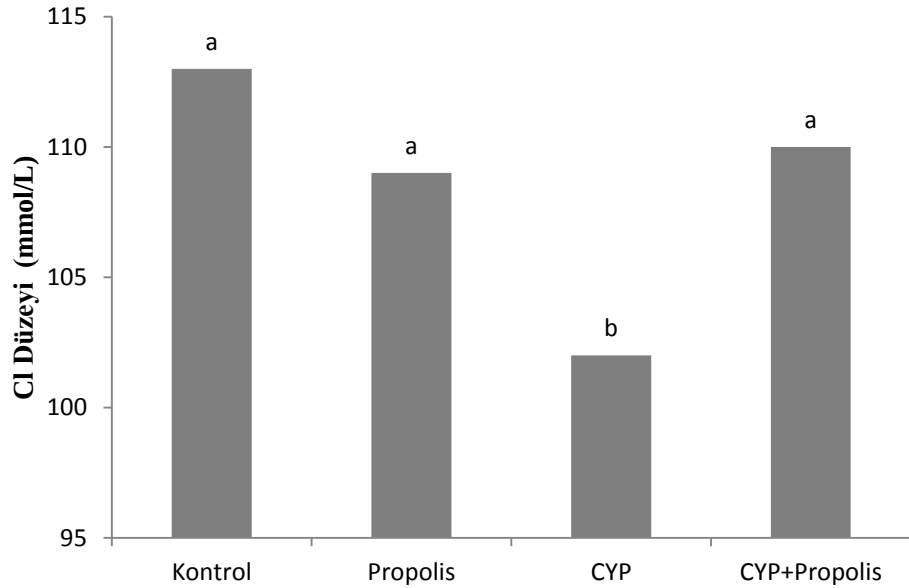
150 mg/kg CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Ca düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Ca düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır. CYP propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma Ca düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 17).



Şekil 17. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Ca Düzeyleri

Plazma Cl düzeyleri; kontrol grubunda 113.0 ± 2.88 mmol/L, propolis uygulanan grupta 109.0 ± 2.3 mmol/L, CYP uygulanan grupta 102.0 ± 2.54 mmol/L, CYP+propolis uygulanan grupta 110.0 ± 1.11 mmol/L bulunmuştur (Tablo 19).

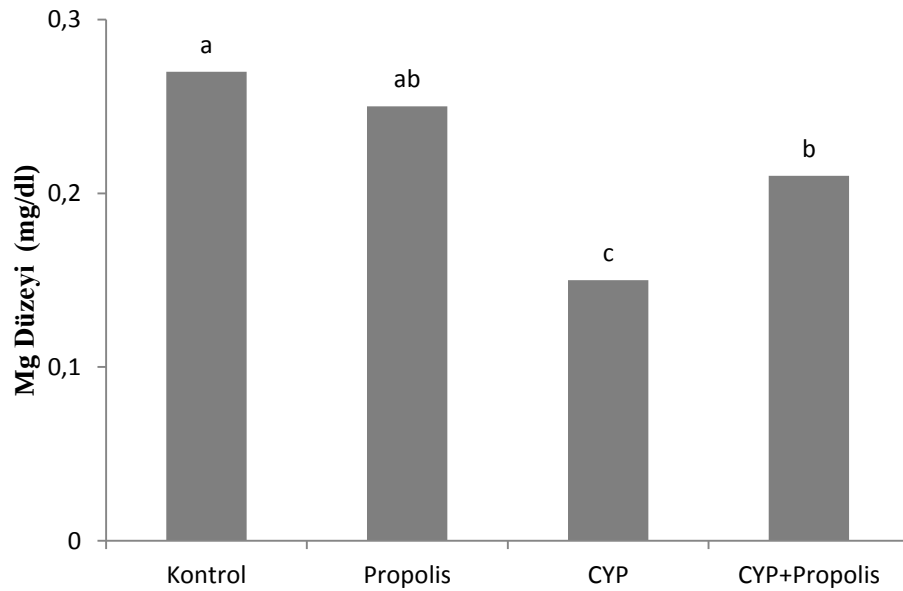
150 mg/kg CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Cl düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı azalış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Cl düzeylerinde istatistiki anlamda önemli bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma Cl düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 18).



Şekil 18. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Cl Düzeyleri

Plazma Mg düzeyleri; kontrol grubunda $0,27 \pm 0,02$ mg/dl, propolis uygulanan grupta $0,25 \pm 0,02$ mg/dl, CYP uygulanan grupta $0,15 \pm 0,01$ mg/dl, CYP propolis uygulanan grupta $0,21 \pm 0,01$ mg/dl bulunmuştur (Tablo 19).

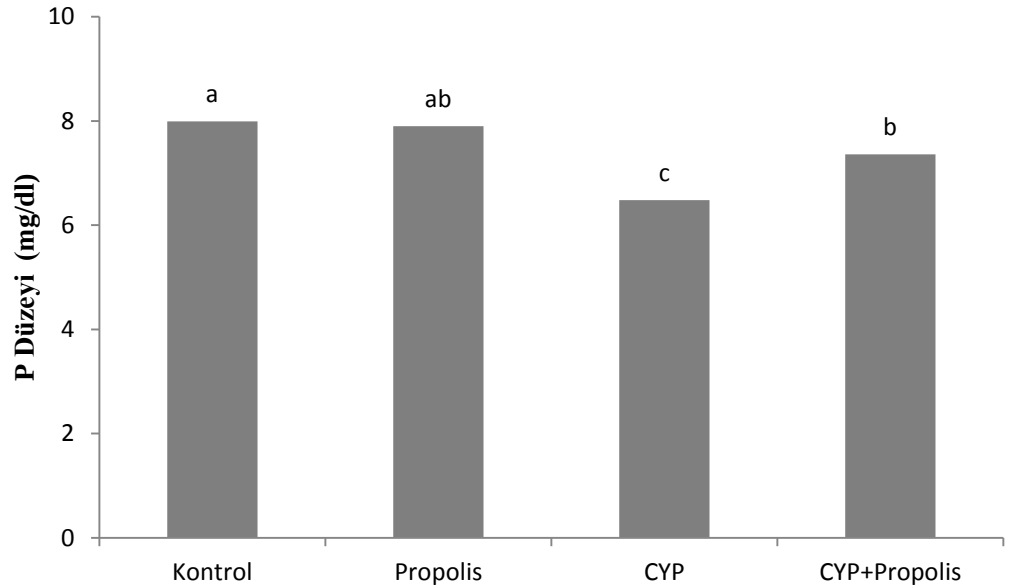
CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Mg düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış görülmüştür ($p < 0.05$). Propolis uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Mg düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma Mg düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalış saptanırken ($p < 0.05$), propolis uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma Mg düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 19).



Şekil 19. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Mg Düzeyleri

Plazma P düzeyleri; kontrol grubunda $7,99 \pm 0,18$ mg/dl, propolis uygulanan grupta $7,90 \pm 0,32$ mg/dl, CYP uygulanan grupta $6,48 \pm 0,12$ mg/dl, CYP+propolis uygulanan grupta $7,36 \pm 0,09$ mg/dl bulunmuştur (Tablo 19).

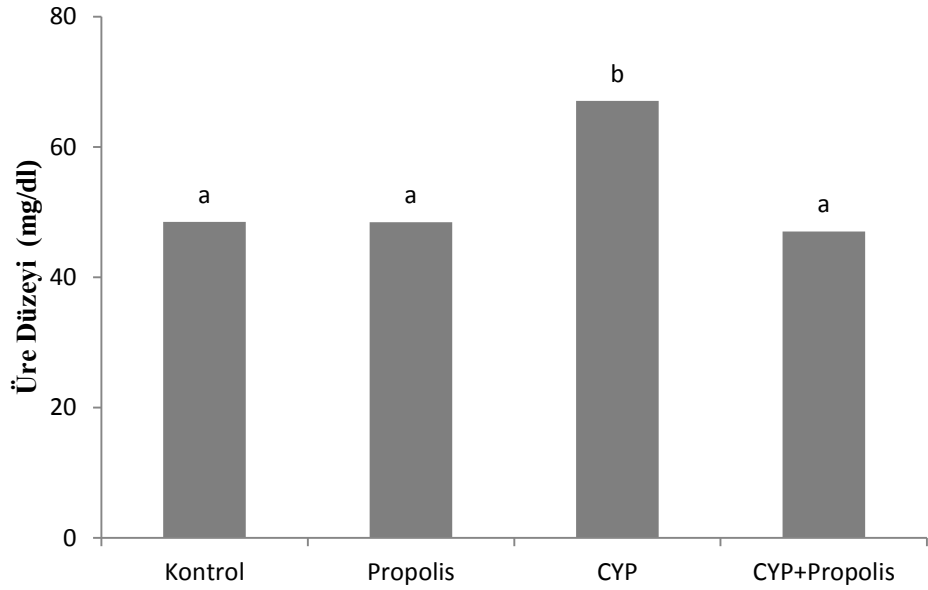
CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma P düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış görülmüştür ($p < 0.05$). Propolis uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma P düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma P düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 20).



Şekil 20. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Plazma P Düzeyleri

Plazma üre düzeyleri; kontrol grubunda $48,50 \pm 0,99$ mg/dl, propolis uygulanan grupta $48,45 \pm 0,95$ mg/dl, CYP uygulanan grupta $67,07 \pm 4,23$ mg/dl, CYP+propolis uygulanan grupta $47,04 \pm 1,86$ mg/dl bulunmuştur (Tablo 19).

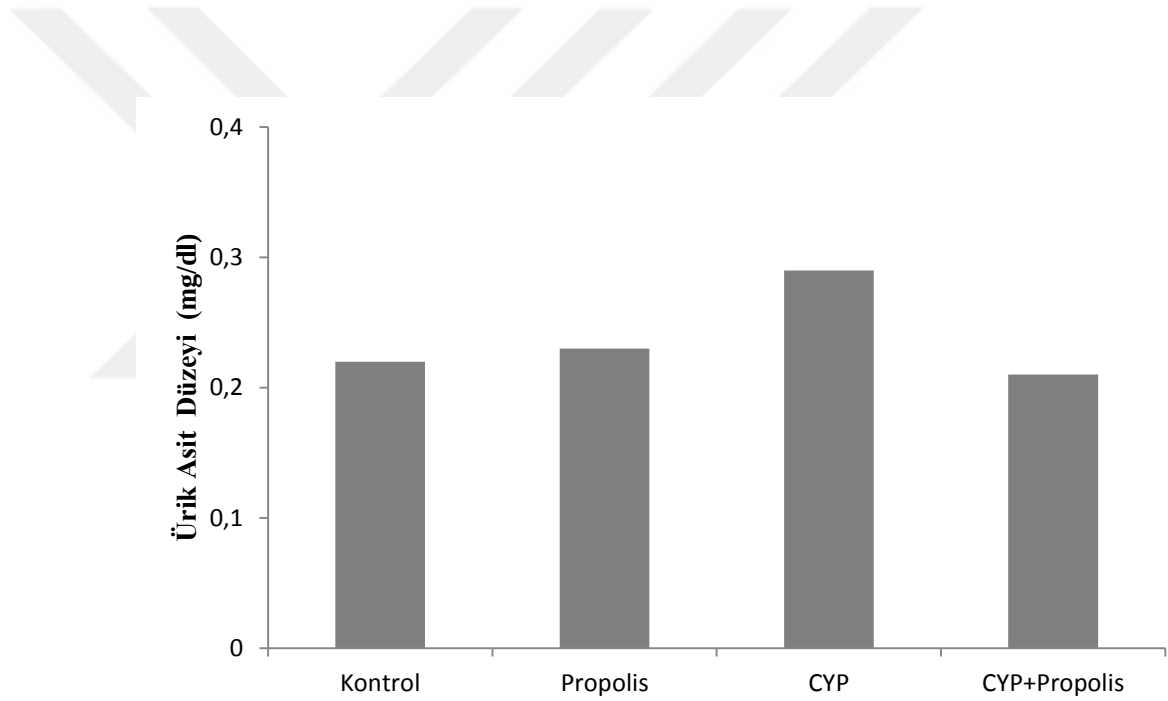
150 mg/kg CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma üre düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı derecede bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma üre düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma üre düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 21).



Şekil 21. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Üre Düzeyleri

Plazma ürik asit düzeyleri; kontrol grubunda $0,22 \pm 0,03$ mg/dl, propolis uygulanan grupta $0,23 \pm 0,01$ mg/dl, CYP uygulanan grupta $0,29 \pm 0,02$ mg/dl, CYP+propolis uygulanan grupta $0,21 \pm 0,02$ mg/dl bulunmuştur (Tablo 19).

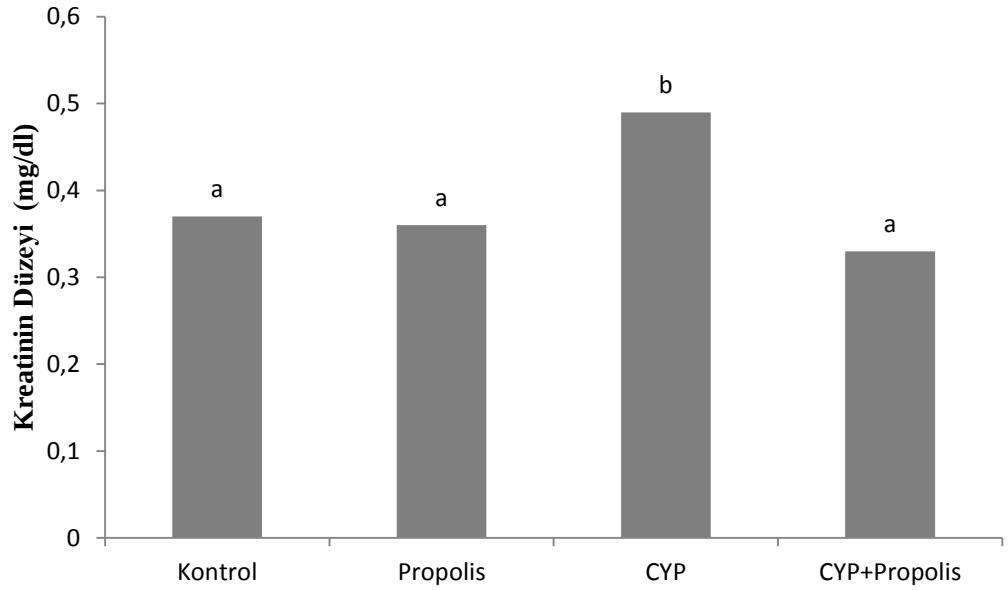
CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma ürik asit düzeylerinde istatistiki açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir. Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma ürik asit düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 22).



Şekil 22. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarda Plazma Ürik Asit Düzeyleri

Plazma kreatinin düzeyleri; kontrol grubunda $0,37 \pm 0,01$ mg/dl, propolis uygulanan grupta $0,36 \pm 0,04$ mg/dl, CYP uygulanan grupta $0,49 \pm 0,02$ mg/dl, CYP+propolis uygulanan grupta $0,33 \pm 0,02$ mg/dl bulunmuştur (Tablo 19).

CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma kreatinin düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı artış bulunmuştur ($p < 0.05$). Propolis ve CYP+propolis uygulanan deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma kreatinin düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır. CYP+propolis uygulanan deney grubu CYP uygulanan deney grubu ile karşılaştırıldığında plazma kreatinin düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 23).



Şekil 23. CYP ve Propolis Uygulanan Deney Gruplarında Plazma Kreatinin Düzeyleri

6. TARTIŞMA

Kanser, anormal vücut hücrelerinin kontrolsüz üremeleri ile meydana gelen bir doku kitlesi olarak tanımlanmakta olup günümüzde en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Kanser kemoterapisinin esası; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı olan selektiflikleri, antibiyotiklerin bakteri hücresine karşı olan selektifliklerinden daha azdır. Çünkü malign hücre ile normal hücre arasında kalitatif bakımdan fazla fark yoktur; mevcut fark daha çok kantitatif yöndedir. Antineoplastik ilaçlar vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok ederler. Bu nedenle çoğu kanser ilacının normal hücre ve kan dokusu üzerine de yan etkileri vardır (26, 27).

Son yıllarda kanser tarama yöntemlerinin geliştirilmesi ile erken tanı konabilmekte ve kemoterapi kullanımının yaygınlaşması ile de kanser tedavisinde şifa oranı belirgin olarak yüksek olabilmektedir. Kanser hastalarındaki uzun yaşam beklentisine karşın kanser ilaçlarının yapmış oldukları nefrotik yan etkiler gittikçe artan bir konu olmuştur. Böbrek hücrelerinin bölünme hızı yüksek olmamasına rağmen, yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etme yeteneği ve tübüler epitelde spesifik taşıyıcılara sahip olması nedeniyle toksik zedelenmeye oldukça duyarlıdır (104).

CYP, insan ve veteriner hekimliğinde neoplastik ve otoimmün hastalıkların tedavisinde, yine veteriner hekimlikte kimyasal kırkım için kullanılan ve karaciğer sitokrom P-450 sistemi etkisiyle sitotoksik metabolitlere

dönüşen, azotlu hardallar grubundan alkilleyici bir ajandır. İdeal olarak, kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar kanser hücrelerini yok ederken, normal dokuları olumsuz biçimde etkilememelidir. Ancak bugün de kullanılan CYP gibi yüksek doz alkilleyici (DNA'yı etkileyen) ajanlar bu koşulu tam olarak yerine getirmemektedir. Kanser ve malignant olmayan hastalıkların tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış geniş klinik kullanımlı kemoterapötik bir ilaç olan CYP'nin antitümoral etkinliği, yüksek dozda kullanılabilmesine bağlanmaktadır (14, 105, 106). Ancak yüksek doz CYP kullanımı mesanede akut inflamasyona, böbrek hasarına ve karaciğer hasarına neden olmaktadır (105, 107).

Bu bilgiler ışığında; yaptığımız deneysel çalışmada CYP nedenli böbrek doku hasarının önlenmesinde propolisin muhtemel koruyucu etkisini tespit etmek amacı ile kan ve böbrek dokularında MDA, GSH düzeyleri ve CAT, GST aktiviteleri ölçülmüştür.

Hematopoietik sistemin CYP gibi alkilleyici ajanların etkilerine karşı oldukça hassas olduğu bildirilmektedir. CYP klinikte kullanıldığında en önemli yan etkileri kemik iliği baskılanması ve lökopeni ile daha seyrek olarak da trombositopenidir. Deneysel olarak hayvanlara azotlu hardalların subletal dozlarının uygulanmasından 6-8 saat sonra kemik iliğinde ve lenfoid dokularda mitozun durduğu ve hücre organellerinin parçalandığı ortaya konmuştur (108).

Bazı çalışmalarda kanserin kendisinin de böbrek fonksiyon bozukluğuna yol açtığı bildirilmektedir. Kanserli vakalardaki böbrek hasarından immün komplekslerin sorumlu olduğu ve bunların glomerüllerde depolanmasının doku hasarına neden olduğu rapor edilmiştir. Glomerüler hastalıkların en sık eşlik ettiği kanser türleri akciğer, gastrointestinal sistem tümörleri, lenfoma ve lösemilerdir.

Karsinomalarda membranöz glomerülonefrit, lenfomalarda da minimal değişikliğin daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Kanser hastalarında nefrotoksisite için risk faktörleri; bu hastaların çoğunun yaşlı olması, öncesinde renal hastalık, hipovolemi, kombine kemoterapi almaları, tedavi sırasında nefrotoksik ajanlarla kombinasyon ve radyokontrast maddeye maruz kalmalarıdır (27, 109).

Akut böbrek yetmezliği gelişmesi antineoplastik kemoterapi alan hastalarda sık görülen bir olaydır (27, 109, 110). Ratlar üzerinde yapılan deneysel çalışmada doksorubisinin glomerüler hasarlanmaya neden olduğu bildirilmiştir. Tek doz sisplatin sonrasında bile akut böbrek yetmezliği bildirilmiştir (64, 82).

CYP'e bağlı nefrotoksisitede en sık tübüler glukoz, amino asit, protein, fosfat, bikarbonat kaybı ile karakterize proksimal tübül tutulumu görülür (111, 112). Harmon ve ark. (111) kemoterapiden sonraki 6 ile 12 aylar arasında sisplatine bağlı glomerülopati rapor etmişlerdir. Hsu ve Tsai (112) yaptıkları çalışmada tek doz 50 ve 110 mg/kg dozunda i.p. CYP uygulanan anneden doğan farelerin glomerüllerinin değişen derecelerde mesanjiyoliz, yaygın mesangial ve segmental skleroz görülmüştür. Bu sonuçlar CYP'in yeni doğmuş farelerin gelişen glomeruluslarda hasara yol açabileceğini ve glomerüler mikroliflerin glomerüler onarım sürecinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir

Hematolojik ve solid kanserlere sahip 30 hastada yapılan bir çalışmada; her hastaya 28 günde bir olmak üzere 4 kür kemoterapi uygulanmış ve tedavi bitiminde kemoterapi öncesine göre hastaların böbrek fonksiyonları karşılaştırılmıştır. Bu hastalara kemoterapi öncesinde böbrek koruyucu olarak sadece serum fizyolojik ile hidrasyon yapılmıştır. Sonuçta kemoterapi alan

hastalarda glomerüler bozukluklar başta olmak üzere renal disfonksiyon gösterilmiştir. Hastaların çoğunun yaşlı olması ve kombinasyon kemoterapisi almaları nefrotosisitenin artmasına katkıda bulunmuş olabilir. Ancak hiçbirinde kalıcı böbrek hasarı görünmemesinin nedeni kemoterapi öncesinde serum fizyolojik ile yapılan hidrasyon olarak düşünülebilir (16).

Tek doz CYP'in tübül epitel hücrelerinde nekroza yol açarak nefrotoksisteye sebep olduğu bildirilmiştir. Deneysel bir çalışmada erkek sıçanlara 222 mg/kg i.p. olarak tek doz uygulanan CYP'nin renal tübüler nekroza neden olduğu rapor edilmiştir. 24 saat içinde hızla mesanede hemoraji ve ödem, mukozal epitelin ülserasyonu, düz kas ve küçük arterlerde nekroz oluşmuş, renal pelvis epitel ve submukoza epiteli ve submukozada da aynı etki gözlenmiştir (113, 114).

CYP'nin nefrotoksisteye neden olduğuna dair yapılan çalışmalarda uzun süreli CYP kullanımının renal tübüler nekroza, glomerüler değişikliklere ve lizozomal enzim aktivitesinde anlamlı ölçüde düşüşe neden olarak renal hasara yol açtığından bahsedilmiştir (56). 10 günlük yüksek doz CYP uygulamasının ölümlerle bile sonuçlanabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (107, 112, 114).

Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçların ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir. Kemoterapi aracılığıyla oluşan serbest radikallerinin; protein, DNA, RNA ve lipid gibi makromoleküllerde hücre ölümüne kadar giden hasara neden olabildiği belirtilmektedir (57, 60, 61).

Yüksek doz sitotoksik ilaçların kullanılması ve kanser hastalarının yaşam sürelerinin % 18 uzaması ilaçların yan etkilerini de artırmaktadır (105). Sitotoksik bir ilaç olan CYP'in klinik kullanımı oldukça geniş bir ilaçtır ve romatoid artrit ve kanser (lenfoma, akut ve kronik lösemi ve çok çeşitli omurilik tümörü) tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu ilaç idrar kesesindeki akut enflamasyonuna, böbrek ve karaciğer hasarına sebep olabilir. Bu yüzden bu ilacın teropatik kullanımı kısıtlanmaktadır. CYP'nin idrar kesesi ve karaciğer hasarı mekanizması ayrıntılı olarak incelenmiş olup böbrek hasarı mekanizması üzerindeki çalışmalar sınırlıdır ve oksidatif stresin böbrek hasarına sebep olan CYP'de bir rol oynadığı düşünülmektedir (17, 114-118).

CYP karaciğerde hidroksillenerek metabolitleri olan FAM ve ACR'e dönüşmektedir. CYP'nin antineoplastik etkileri FAM ile ilişkilidir. FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskılayıp CYP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. CYP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan ACR ile ilgilidir. ACR doku antioksidan savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır ve memeli hücreleri için mutajeniktir. ACR kaynaklı oluşan serbest radikaller; enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle birleşerek onların fonksiyonlarını bozarlar (5, 6, 115).

SOR'lerin inflamatuvar süreç içerisinde aşırı üretimi oksidatif strese neden olur ve bu da hücre ve DNA hasarlanması, protein denatürasyonu ve zar lipidlerinin peroksidasyonunu da içeren mekanizmalar yoluyla nekroza yol açmaktadır Yapılan çalışmada 150 mg/kg CYP uygulanan ratların kan ve böbrek dokularında oksidatif stresin başlıca belirteci olan MDA düzeylerinin CYP

kaynaklı oksidatif stresi ve nefrotoksisiteyi gösterecek şekilde oldukça önemli oranda arttığı saptanmıştır. Çalışmanın sonuçları gösteriyor ki oksidatif stres böbrek hasarına yol açan CYP’de önemli bir rol oynamaktadır. Buna karşın CYP ile propolisin birlikte verildiği grubun kontrole yakın bulunan değerleri ise propolisin CYP’in toksik etkisini düzelttiğini göstermektedir. Chen ve ark. (116)’nın yaptıkları çalışmada farelere 100 mg/kg dozda verilen CYP’nin oksidatif strese neden olduğu, MDA ve nitrik oksit (NO) düzeyini artırdığı, total antioksidan seviye (TAS)’sini düşürdüğü rapor etmişlerdir. CYP uygulanan farelerde MDA düzeyinin arttığını ve TAS’sinin ise düştüğünü rapor etmeleri deneysel çalışmamızdan elde edilen verileri doğrular niteliktedir. Yine Tarek ve ark. (117) sıçanlarla yaptıkları çalışmalarında CYP (200 mg/kg)’nin neden olduğu kalp hasarını serumda artan oksidatif stres, NO ve MDA, azalan GSH ve TAS düzeylerine bağlamışlardır.

CYP’nin nefrotoksik mekanizması tam olarak bilinmemektedir ancak tübül hücrelerinde serbest radikal ve lipid peroksidasyonu oluşumuna neden olduğu öne sürülmektedir. Yapılan birçok çalışmada; CYP’nin özellikle yüksek doz kullanımından sonra nefrotik etkiler bildirilmiştir (106, 114).

Nazıroğlu ve ark. (118) sisplatin kaynaklı toksisitede böbrek, karaciğer, lens dokularında lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitesi üzerine yüksek dozda E vitamini ile selenyum verilmesinin etkisini araştırmışlardır. Ratlara 6 mg/kg ip. olarak sisplatin, 1000 mg/kg E vitamini ve 1,5 mg/kg selenyum uygulamışlardır. Sisplatin uygulanan sıçanlarda böbrek, karaciğer ve lenste MDA düzeylerinde anlamlı bir artış olurken, böbrekte GSH, A vitamini düzeyleri, böbrek, karaciğer ve lenste GSH-Px, E vitamini, β -karoten düzeylerinin

azaldığını saptamışlardır. Sisplatin uygulanan ratlarda böbrek, karaciğer ve lens dokusunda artmış MDA düzeyleri, azalmış antioksidan enzimler ve vitamin düzeylerinde selenyum ve yüksek dozda E vitamini enjeksiyonu ile önemli bir gelişme görülmüştür. Yüksek doz E vitamini enjeksiyonu ile selenyumun kanserli hastalarda sisplatin kaynaklı nefropati ve katarakt oluşumunu önlemede rol oynayabileceğini bildirmişlerdir.

Memeli kalp dokusu hücrelerinde yapılan bir çalışmada CYP terapisi boyunca SOR'lerinin aşırı üretildiği ve oluşan membran hasarının miyokardiyal membranın bütünlüğünü bozduğu ve disfonksiyona neden olduğu rapor edilmiştir (119).

Günümüzde antioksidanların kanser üzerine etkileri yaygın olarak araştırılmaktadır. Neoplastik hastalıklarda, CYP kemoterapisi boyunca, ACR'nin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı antioksidan ajanlar kullanılarak bu toksik etkilerin detoksifiye edilmesi gerekir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da antioksidanların karsinogenezin başlama ve gelişme dönemini baskıladıkları, hücre ölümü ve değişimini önledikleri gösterilmiştir (63).

Organizmada serbest radikal reaksiyonları antioksidan sistem ile kontrol edilir. Serbest radikallerin oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren veya azaltan CAT, GSH-Px, GST ve SOD gibi bazı endojen antioksidan enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulursa serbest radikaller zararlı olmaya başlar ve oksidatif stres şeklinde etkilerini gösterirler (61).

Çalışmamızda rat kan ve böbrek dokularında GSH düzeyleri ve CAT aktiviteleri CYP uygulanan deney grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde

düşük bulunmuştur. Bu antioksidanların düşük olması, CYP'in antioksidan kapasiteyi azaltarak oksidatif stresi artırdığını göstermektedir. Propolis ise rat kan ve böbrek dokularında GSH düzeyi ve CAT aktivitesinin artmasına yol açmaktadır.

Abraham ve ark. (54) tarafından yapılan çalışmada CYP kaynaklı böbrek hasarında oksidatif stresin rolünü araştırılmıştır. Sıçanlara 150 mg/kg i.p. olarak CYP uygulamasından sonraki 6, 12 ve 24. saatlerde saatlerde ratlar kurban edilmiştir. Plazma üre ve kreatinin düzeyleri ölçülmüş, böbrek histopatolojisi değerlendirilmiştir. Böbrek dokusunda lizozomal enzimler yani asit fosfataz, β -glukuronidaz, N-asetil glukozaminidaz ve total protein düzeylerine bakılmıştır. Histolojik olarak, CYP uygulanmış fare böbreklerinde zaman içinde ilerleyici böbrek hasarı görülmüştür. Şaşırtıcı bir şekilde, böbrekte CYP uygulamasından 16 ve 24 saat sonra lizozomal enzimlerin aktivitelerinde artışın yerine bir ciddi bir düşüş gözlenmiştir. CYP uygulamasından 16 ve 24 saat sonra ratların böbreklerinde kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Lizozomal protein sindirim enzimlerinin aktivitelerinde azalma CYP kaynaklı böbrek hasarına katkıda bulunabilir. Böbrek protein anormal miktarda birikmesi lisosomal enzim aktivitesinde defekt en azından kısmen bağlı olabilir ve böbrek hasarına katkıda bulunur. Bizim çalışmada da

Sugumar ve ark. (106) 200-240 g ağırlığındaki sıçanlara 150 mg/kg CYP uygulamış ve 6, 16 ve 24. saatlerde plazma kreatinin, böbrek MDA, GSH düzeylerini tayin etmişler ve histopatolojik değişikliklere bakmışlardır. Kontrol grubu sıçanların böbrekleri normal bir şekilde bulunmuştur. CYP uygulamasından 6 saat sonra böbrek küçük ve hafif arayer ödemi gibi patolojik değişiklikler

göstermiştir. Böbrek MDA düzeyi kontrol grubuna kıyasla değişmemiş ve GSH düzeyi % 11 dolaylarında düşmüştür. CYP uygulamasından 16 saat sonra ödem ve glomerulonefrit gözlenmiştir. Bu zaman periyodunda böbrekteki MDA düzeyi % 35 oranda artış ve GSH düzeyi de % 74 oranda düşüş gözlenmiştir. CYP uygulamasından 24 saat sonra böbrek hasarında histolojik glomerulonefrit, kortikal borularda kofullaşma, arayer ödemi ve hafif hemorajik korteks gözlemlenmiş ve böbrek MDA düzeyi kontrol grubuyla kıyaslandığında % 47'ye yükselirken, GSH düzeyi % 77 dolaylarına düşmüştür. Burada böbrek dokusunda yüksek MDA düzeyi ile düşük GSH düzeyi arasında bir korelasyon görülmektedir. Böbrek dokusundaki GSH düzeyi zamanla düşerken, MDA düzeyi de zamanla yükselmektedir, aynı zamanda böbrek hasarının şiddeti de artmaktadır. CYP uygulanmış sıçanların plazma kreatinin değerleri tüm uygulama zamanından sonra kontrolden istatistiki olarak önemli fark göstermemiştir. Bu bulgu plazma kreatinin değerinin her zaman CYP uygulamasının böbrek hasarının varlığına işaret etmediğini göstermektedir. Bu yüzden insanlardaki CYP uygulamaları boyunca plazma kreatinin ile birlikte diğer parametrelerinde gözlenmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Çalışmada; CYP uygulanarak nefrotoksisite oluşturulan grubunun böbrek dokusunda GST aktivitesinde belirgin artma, CYP+propolis uygulanan grupta ise GST aktivitesinde belirgin azalma olduğu saptanmıştır. Böbrek dokusundaki GST aktivitesindeki artış oksidatif stres artışına adaptif bir cevap olabilir.

Yapılan bir çalışmada sıçanlara 150 mg/kg CYP i.p. uygulanmış ve 16 saat sonra sıçanlar dekapite edilmiştir. Böbrek dokusunda biyokimyasal olarak nitrit, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) seviyeleri ve SOD aktivitesi ölçülmüştür.

CYP ile muamele edilmiş sıçanların böbreklerinde nitrit seviyesinde 2 kat artma, NAD seviyelerinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Hassas bir enzim olan SOD aktivitesi önemli ölçüde CYP uygulanan sıçanların böbreklerinde azalmıştır. Nitrosatif stres CYP kaynaklı böbrek hasarında önemli bir rol oynayabileceği ortaya konmuştur. 50 ve 100 mg/kg CYP verilen sıçanlara göre 150 mg/kg CYP verilen sıçanlarda ortaya çıkan böbrek hasarı böbreğin CYP varlığında gördüğü zararın doza bağlı olduğu anlamına gelebilir (120).

Elangovan ve ark. (121) CYP'e bağlı olarak artan serum MDA düzeylerini α - lipoik asidin azalttığını, lipid peroksitte meydana gelen artmayı önemli oranda tersine çevirdiğini ve GSH düzeylerini yükselttiğini tespit etmişlerdir. CYP'in rat spermelerinde değişiklik meydana getirdiği, verilen α -lipoik asidin ise sperm karakteristiklerinde düzelme meydana getirdiği bildirmişlerdir.

Kumar ve Kuttan (105)'ın yaptıkları çalışmada farelerde 750 mg/kg CYP uygulanmasının neden olduğu toksisiteye karşı bitki *Phyllanthus amarus* (*S. amarus*)'un % 75 metanolik ekstresinin etkisi incelenmiştir. CYP uygulanması ile lökosit sayısı, GSH ve GST aktiviteleri azalmış, monositlerin sayısı ise artmıştır. 14 gün boyunca 25 mg/kg, i.p. *P. amarus* uygulaması hücreler üzerinde CYP'in toksik metabolitlerinin etkisini azaltarak, hücre GSH ve GST aktivitesini artırmıştır. Sonuç olarak *P. amarus* uygulanması önemli ölçüde CYP'in toksik yan etkileri azaltabileceğini ve CYP'in antitümör etkinliği engelleyebileceğini göstermiştir.

Senthilkumar ve ark. (115)'in çalışmasında platinum nedenli böbrek hasarına karşı bir tiyol antioksidan olan amifostinin sitoprotektif etkileri olduğu belirlenmiştir. Ancak hipokalsemi, anksiyete ve hipotansiyon gibi

toksisitelerinden dolayı bundan kaçınılmaktadır. Sodyum tiyosülfat, mesna (2-merkaptotanol sülfonat) ve procainamide gibi diğer sitoprotektif ajanlar etkinliklerinin yetersizliği yüzünden geniş klinik kullanımlar için onaylanmamaktadır. Bu bileşikler aynı zamanda tümör dokusunda platin ve alkilleyici ajanlar tarafından oluşturulan toksisiteye karşı sitoprotektivitede seçici değildirler. Bu yüzden tümör koruyucu ve tümör büyümesini uyarıcı özellikler olmaksızın normal dokuları kemoterapi nedenli toksisitelerden koruyabilecek yeni ajanlara ihtiyaç vardır. Biz de çalışmamızda arı kovanından elde edilen antioksidan özellikleri bilinen propolisin CYP nedenli nefrotoksisiteden koruyucu etkileri olduğunu saptadık.

CYP'in toksisiteye neden olduğu savunma sistemine yönelik bir çalışmada, squalenin antioksidan etkisi araştırılmıştır. Hemolizat, plazma ve kalpte SOD, CAT, GSH-Px, GST ve GR ve non-enzimatik antioksidan seviyelerinde (GSH, E vitamini, C vitamini ve seruloplazmin) anlamlı değişiklikler saptanmıştır. Serum ve organ total protein ve kolesterol düzeylerinde anormallikler gözlenmiştir. Serum trigliserid düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu gözlemler CYP'e bağlı toksisiteye karşı squalenin sıçanlarda doku savunma sistemine yönelik koruyucu rolünü göstermiştir (115).

Hücre hasarının neden olduğu oksidatif strese karşı savunmada kritik bir rol oynayan GSH düzeyi ve CAT aktivitesi 150 mg/kg CYP uygulanan deney grubunda oldukça önemli derecede azalma göstermiştir. CYP ile birlikte verilen propolisin GSH düzeyi, CAT aktivitesini artırarak kontrol düzeyine yaklaştırdığı görülmüştür. 200 mg/kg propolisin CYP toksisitesini önemli oranda önlediği GSH düzeyinin ve CAT aktivitesinin artmasıyla açıklanmaktadır. CAT H_2O_2 'i zararsız

yan ürünlere dönüştürdüğü için hücrel hasarın şiddetinde önemli rol oynar. H_2O_2 'in zararsız hale getirilmesinde GSH, GSH-Px enzimi ile GSSG dönüşür. Propolis CAT ve GSH miktarlarının artmasına yol açmaktadır. Bulgularımız CYP'nin neden olduğu böbrek toksisitesinin doğal antioksidanlardan biri olan propolisin kullanılmasıyla önemli ölçüde önlenebileceğini göstermektedir. Propolisin lipid peroksidasyonunu inhibe ederek hücre zarını koruyucu rolünün yanı sıra antioksidanlarla etkileşimi sayesinde CYP gibi sitotoksik ajanların toksik yan etkilerini azaltabileceği söylenebilir.

Sisplatin ve karboplatin doz ile ilişkili olarak renal disfonksiyona neden olur. Serum üre ve kreatinin seviyelerini artırır. Hipomagnezemi ve hipokalsemi gibi serum elektrolitlerinde anormalliklere neden olur. Sisplatin nadir olarak hemolitik üremik sendroma yol açar. CYP analogu olan ifosfamid doz ve yaş ile ilişkili olarak proksimal tübüler hasara neden olur. Ek olarak glukoz, amino asit ve elektrolitlerin böbrekten atılımına neden olur. Metotreksat serum üre ve kreatinin seviyesinde artıştan başka hematuriyeye neden olur. Yüksek doz metotreksat kullanımı sonrasında akut böbrek yetmezliği rapor edilmiştir. Metotreksata bağlı renal disfonksiyonun önlenmesinde üriner alkalizasyon önemlidir. Toksik etkileri folinik asit tarafından antagonize edilir. Kloroetilnitrozüre bileşikleri (karmustin, semustin ve streptozosin) serum üre, kreatinin seviyesini artırır ve proteinüriye neden olur. Streptozosine bağlı nefrotosisitede hipofosfatemi, hipokalemi, hipourisemi, hipourisemi, renal tübüler asidoz, glukozüri ve aminoasitüri görülür. Yüksek doz azasidin kullanımı tübüler asidoz, poliüriye neden olur. Elektrolit, glukoz ve amino asitlerin idrarla atılımını artırır. Hemolitik üremi gempitabinin nadir görülen yan etkilerindendir. Alfa

interferon kullanımı sonrası akut böbrek yetmezliği nadir olarak görülebilir. Mitomisin uygulanması hemolitik üremik sendroma yol açabilir ve mortalite oranı % 50-100 arasında bildirilmiştir. Karmustin infüzyonla ilişkili hipotansyona neden olur. Kemoterapi ilaçlarının nefrotoksisite mekanizmaları ve renal fonksiyon bozukluğunda doz modifikasyonu gösterilmiştir. Kemoterapiye bağlı nefrotoksisteyi önlemek için hastaların kreatinin ve ilaç serum düzeyleri düzenli takip edilmeli, glomerül filtrasyon hızına göre ilaç dozu ve süresi ayarlanmalı, gerekirse ilaç kesilmelidir (26, 107).

CYP'e bağlı en önemli renal yan etkilerden biri de hiponatremidir. Bode ve ark. (122)'nin CYP nedenli antidiüretik, idrar hacmi yanı sıra, serum elektrolitleri, kreatinin, osmolalitenin mekanizmasını aydınlatmak için yapılan çalışmada plazma hipotonisine ve idrar hipertonisine rağmen, plazma vasopresin konsantrasyonu değişmediği bildirilmiştir. Sonuç olarak suyun geri emilimi ve Na kaybına CYPin direk etkisi olduğu belirlenmiştir.

CYP (2 gün boyunca 150 mg/kg) uygulanan ratlarda kalp, böbrek ve karaciğer gibi organların CK, laktat dehidrogenaz, aspartat transaminaz, alanin transaminaz, alkalen fosfataz, total bilirubin, üre ve kreatinin düzeylerinde önemli artışlar saptanmıştır (115). Kemoterapi ilaçları glomerül, tübül veya interstisyum düzeyinde etkili olarak böbrek fonksiyonlarını bozabilir (60, 122).

Çalışmamızda deneysel olarak 150 mg/kg CYP uygulanan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma üre ve kreatinin düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı derecede bir artış saptanmıştır. CYP ile birlikte propolis uygulanan grupta ise normal kontrol düzeyine ulaştığı saptanmıştır. Serum kreatinin seviyesi böbrekteki glomerüler fonksiyonun göstergesidir.

Nefrotoksisite serum kreatinin konsantrasyonunun 0,5 mg/dl'ye eşit veya üstüne çıkması (≥ 0.5 mg/dl) olarak tanımlanır. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada histolojik inceleme sonucunda CYP'in ratlarda orta derecede böbrek hasarına neden olduğu, ancak böbrek fonksiyon parametrelerinin yani plazma kreatinin ve üre düzeylerinin yüksek olmadığı gösterilmiştir. CYP uygulamasında plazma kreatinin normal seviyede olması böbrekte hasar olmaması anlamına gelmemektedir (106). Senthilkumar ve ark. (115)'nin yaptıkları çalışmada, CYP uygulaması ile plazma üre ve kreatinin düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızın bulguları Senthilkumar ve ark.'nın sonuçları ile uyumlu olup CYP kaynaklı böbrek hasarını göstermektedir.

Çalışmada CYP uygulanan grupta böbrek hasarının spesifik bir göstergesi olan plazma Na, K, Ca, Cl, Mg, P düzeyleri mevcut literatürlere uygun bir azalma gözlenmiştir. Bu durum böbrek dokusunun CYP varlığında hasar gördüğünü göstermektedir. CYP ile birlikte verilen 200 mg/kg propolisin Na, K, Ca, Cl, Mg, P düzeylerini kontrol düzeyine yaklaştırarak iyileşme yaptığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular propolisin böbrek üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Nitekim biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler, artmış MDA düzeyi, azalmış GSH düzeyi ve CAT aktivitesi böbrek hasarını çok net bir şekilde ortaya koymuştur. Çalışmamızın sonuçları oksidatif stresin CYP'ye bağlı böbrek hasarında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. CYP ile birlikte uyguladığımız propolisin bu doku hasarını azalttığı ve böbrek dokusunu oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermektedir. Bu bulguların ışığında, başta kanser tedavisi olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan CYP'in yüksek

dozlarda kullanılabilmesine olanak sağlamak ve CYP'in yan etkilerinin azaltılması noktasında antioksidan özelliği bilinen propolisin tedaviye destek olarak kullanılabileceği fikri bizde uyanmıştır. Ancak bu konuda özellikle kullanılan doz yönünden daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Kayaalp O, İmmün sistem bozuklukları ve immünomodülatör ilaçlar. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 11. Baskı, Ankara 2005.
2. Block K, Koch AC, Mead MN, et al. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer Treatment Reviews* 2007; 33(5): 407-418.
3. Atakaya KM, Valeriote FA, Ramahi-Ataya AJ. Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. *Cancer Res* 1989; 49: 1660-1664.
4. Monach PA, Arnold LM, Merkel PA. Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: a data-driven review. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 9-21.
5. Budavari S, An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, The Merck Index. Eleventh Edition Centennial Edition, USA. 1987; 429-430.
6. Kawabata TT, Chapman MY, Kim DH, Stevens WD, Holsapple MP. Mechanism of in vitro Immunosuppression by hepatocyte generated cyclophosphamide metabolites and 4-hydroxycyclophosphamide. *Biochemical Pharmacology* 1990; 927-935.
7. Plowchalk DR, Mattison DR. Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 107: 472-481.
8. Pool BL, Bos RP, Niemeyer U et al. In vitro/in vivo effect of mesna on the genotoxicity and toxicity of cyclophosphamide a study aimed at clarifying the ultimate mechanism of mesna's anticarcinogenic activity. *Toxicology Letters* 1988; 41: 49-56.
9. Ayhancı A, Uyar R, Aral E, et al. Protective effect of zinc on cyclophosphamide induced hematotoxicity and urotoxicity. *Biol Trace Elem Res* 2008; 126: 186-193.
10. Büyüknacar HS, Kumcu EK, Göçmen C, et al. Effect of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram on cyclophosphamide induced cystitis in rats. *European Journal of Pharmacology* 2008; 586: 293-299.
11. Wang L, Albasi C, Faucet-Marquis V, et al. Cyclophosphamide removal from water by nanofiltration and reverse osmosis membrane. *Water Res* 2009; 43: 4115-22.
12. Shaunak S, Munro JM, Weinbren K. Cyclophosphamide induced liver necrosis a possible interaction with azathioprine. *Q J Med New Series* 1988; 252: 309-317.
13. Ayhancı A, Siklofosfamid Sitotoksitesinin Çinko ile Etkileşimi. Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 1997.
14. Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, et al. The safety profile of cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy. *Expert Opin Drug Saf* 2007; 6: 183-190.
15. Bertram G. Basic Clinical Pharmacology. 9 Edition: 2001.
16. Akçasu A, Banoğlu N, Berkarda Ş. Farmakoloji. İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitapevi, 1992.

17. Ludeman SM. The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. *Curr Pharm Des* 1999; 8: 627-643.
18. Dollery C. Cyclophosphamide. In Dollery C. (Editor). *Therapeutic Drugs*, Edinburg Churchill Livingstone 1999: 349-353.
19. Coggins PR, Ravdin RG, Eisman SH. Clinical evaluation of a new alkylating agent: cytoxan (cyclophosphamide). *Cancer* 1960; 13: 1254-1260.
20. Vester U, Kranz B, Zimmermann S, et al. Cyclophosphamide in steroid sensitive nephrotic syndrome: outcome and outlook. *Pediatr Nephrol* 2003; 18 (7): 661-664.
21. Miller LJ, Chandler SW, Ippoliti CM. Treatment of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis with prostaglandins. *Ann Pharmacother* 1994; 28: 590-594.
22. Shepherd JD, Pringle LE, Barnett MJ et al. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1991; 9: 2016-2020.
23. Ando M, Yokozawa T, Sawada J, et al. Cardiac conduction abnormalities in patients with breast cancer under going highdose chemotherapy and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 185-189.
24. Morandi P, Ruffini PA, Benvenuto GM, La Vecchia L, Mezzena G, Raimondi R. Serum cardiac troponin I levels and ECG/Echo monitoring in breast cancer patients undergoing high dose (7g/m²) cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 277-282.
25. Goldberg MA, Antin JH, Guinan EC, Rapoport JM. Cyclophosphamide cardiotoxicity: an analysis of dosing as a risk factor. *Blood* 1986; 68: 1114-1118.
26. Erkurt ME, Kuku İ, Kaya E, et al. Kanser Kemoterapisi ve Böbrek. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2009; 16: (1): 63-68.
27. Kintzel PE, Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. *Drug Safety* 2001; 24: 19-38.
28. Ikarashi Y, Kakihara Y, Imai C, et al. Glomerular dysfunction, independent of tubular dysfunction, induced by antineoplastic chemotherapy in children. *Pediatrics International* 2004; 46: 570-575.
29. Fels LM, Bokemeyer C, Rhee J. Evaluation of late nephrotoxicity in long-term survivors of Hodgkin's disease. *Oncology* 1996; 53: 73-78.
30. Goren MP, Wright RK, Horowitz ME, Pratt CB. Ifosfamide induced subclinical nephrotoxicity despite mesna. *Cancer Treat Rep* 1987; 71: 127-130.
31. West NJ. Prevention and treatment of hemorrhagic cystitis. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 696-706.
32. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-357.
33. Stocker R, Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1990; 9: 101-112.

34. Kopani M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. Oxidative stress and electron spin resonance. Clin Chim Acta 2006; 364: 61-66.
35. Carroll EC. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 1987; 107: 526-545.
36. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya 1995.
37. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens free radicals. Jpn J Physiol 1996; 46: 15-32.
38. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd Edition, Oxford University Pres. Inc: New York, 1999.
39. Dündar Y, Aslan R. Oksidan-antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. Hayvancılık Araştırma Dergisi 1999; 9 (1-2): 32-39.
40. Nordberg, J. and Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biol Med 2001; 1287-1312.
41. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. Sendrom 2000; 9: 31-39.
42. Oksidatif stres ve antioksidanlar. oksidatif stres analiz parametreleri ve oksantest. Oksante Ar-Ge Laboratuvarı 2012.
43. Chianeh YR, Prabhu K. Protein thiols as an indicator of oxidative stress. Archives Medical Review Journal 2014; 23 (3): 443-456.
44. Brantley RE. The Mechanism of autoxidation of myoglobin. J Biol Chem 1993; 268: 6995-7010.
45. Shacter E. Protein oxidative damage. Methods Enzymol 2000; 319: 428-436.
46. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction free radical biochemistry. Br Med Bull 1993; 49 (3): 481-93.
47. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri 1989; 9 (1): 1-8.
48. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in Enzymol 1989; 186: 1-17.
49. Yılmaz S, Bahçecioğlu İH. Karbontetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve pirüvat kinaz aktiviteleri. Turk J Vet Anim Sci 2000; 24: 25-28.
50. Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 47: 412-426.
51. Weiss SJ, Lobuglio AF. Phagocyte generated oxgen metabolites and cellular injury. Lab Inves 1982; 47: 5-18.
52. Erenel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. Gazi Tıp Dergisi 1992; 3: 243-250.
53. Abraham P, Sugumar E. Enhanced PON1 activity in the kidneys of cyclophosphamide treated rats may play a protective role as an antioxidant against cyclophosphamide induced oxidative stress. Arch Toxicol 2008; 82: 237-238.

54. Abraham P, Sugumar E, Indirani K. Effect of cyclophosphamide treatment on selected lysosomal enzymes in the kidney of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2007; 143-149.
55. Stratta P, Canavessa C, Dogliani M, et al. The role of free radicals in the progression of renal disease. *Am J Kid Diseases* 1991; 17: 33-37.
56. Baud L, Ardaillou R. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *British Medical Bulletin* 1993; 49: 621-630.
57. Rovin BH, Wurst E, Kohan DE. Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney International* 1990; 37: 1509-1514.
58. Waz WR, Feld LG. Reactive oxygen molecules in the kidney. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 171-183.
59. Andreoli SP, McAteer JA. Reactive oxygen molecule-mediated injury in endothelial and renal tubular epithelial cells in vitro. *Kidney International* 1990; 38: 785-794.
60. Tokgöz B. Malign hastalıkların seyrinde böbreğin etkilenmesi ve kemoterapiye bağlı ABY. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2006; 15: 79-86.
61. Diplock, A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant Nutrients. 1998; 59.
62. Kasapović J, Pejić S, Stojković V, Todorović A et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Clin Biochem* 2010; 43: 1287-1293.
63. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1-40.
64. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health: Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research* 1996; 25: 57-74.
65. Blumenthal RD, Lew W, Reising A, et al. Antioxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radioimmunotherapy. *International Journal of Cancer* 2000; 86 (2): 276-280.
66. Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 2007; 13 (1): 22-28.
67. Aydemir B, Karadağ E. antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal* 2009; 2: 5660.
68. Feeney L, Berman ER. Oxygen toxicity: Membrane damage by free radicals. *Invest Ophthalmology* 1976; 15 (10): 789-792.
69. Lavelle F, Michelson AM, Dimitrijevic L. Biological protection by superoxide dismutase. *Biochemical Biophysical Research Communications* 1973; 65 (2): 350-357.
70. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The fenton reaction. *Toxicology Letters* 1995; 82-83: 969-974.
71. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* 1992; 6: 2675-2683.

72. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17 (3): 235-48.
73. Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch Biochem Biophys* 1981; 210 (2): 505- 516.
74. Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, et al. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol. Indust Health* 2005; 21: 67–73.
75. Andersson C, Soderstrom M, Mannervik BJ. Activation and inhibition of microsomal glutathione transferase from mouse liver. *Biochem* 1988; 249: 819-823.
76. Boyer TD, Zakim D, Vessey DA. Do the soluble glutathione-S-transferases have direct access to membrane-bound substrates? *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 29-35.
77. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular Aspects of Medicine* 2009; 30: 29-41.
78. Sarita C, Sava L, Saxena V, et al. Reduced glutathione: importance of specimen collection. *I J of Clin Biochem* 2005; 20 (1): 150-152.
79. Cavalletti E, Tofanetti O, Zunino F. Comparison of reduced glutathione with 2–mercaptoethane sulfonate to prevent cyclophosphamide induced urotoxicity. *Cancer letters* 1986; 32: 1-6.
80. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988; 263: 17205-17208.
81. Carpes ST, Begnini R, Alencar SM, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciencia E Agrotecnologia Lavras* 2007; 6 (31): 1818-1825.
82. Benguedouar L, Boussenane HN, Wided K, et al. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian J Exp Biol* 1998; 46: 112-119.
83. Benkovi V, Orsoli N, Knezevic A, et al. Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: the alkaline comet assay study. *Biol Pharm* 2008; 31: 167-172.
84. Bankova V, Popov S, Marekov NL. A study on flavanoids of propolis. *J Nat Prod* 1983; 46 (4): 471-474.
85. Santos FA, Emaif B, Abra M, et al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research* 1999; 17: 285-289

86. Sawaya ACHF, Palma AM, Caetano FM, et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of candida. *Letters In Applied Microbiology* 2002; 35: 203-207 .
87. Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytotherapy Research* 2008; 22: 1256-1263.
88. Güney F, Yılmaz M. Propolisin kimyasal içeriği ile antibakteriyel, antiviral, antitümör, antifungal ve antioksidan aktivitesi. Arıcılık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Ordu 2013.
89. Szczesna T. Concentration of selected elements in honeybee collected polen. *Journal of Apicultural Science* 2006; 1 (51): 5-13.
90. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; 25: 83.
91. Chernyak NF. On synergistic effect of propolis and some antibacterial drugs antibiotiki 1973; 18: 259-261.
92. Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sciences* 2007; 80: 370-77.
93. Hady FK, Hegazi AG. Egyptian propolis. 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east nile delta propolis. *Z Naturforsch* 2002; 57: 386-394.
94. Russo A, Cardile V, Sanchez F, et al. Chilean propolis antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *In life Sciences* 2004; 76: 545-558.
95. Gabbianelli, R. Falcioni, G. et al. Antioxidative and gastroprotective activities of antiinflammatory formulations derived from chest-nut honey in rats. *Nutrition Research* 2006; 26: 130-137.
96. Fischer G, Leite FP, Conceicao FR, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with suhv-1. *Vaccine* 2007; 25: 1250-1256.
97. Placer ZA, Cushman L, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation(malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
98. Ellman G. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.
99. Aebi H. Catalase. In vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
100. Habig HW, Pabst JM, Jakoby WBJ. *Biol Chem* 1974; 249 (22): 7130-7139.
101. Frankel SS, Reitma S, Sonnenwirth AC. ‘‘Grandwoh’s clinical laboratory methods and diagnosis’’. 7th Edition. St Louis, USA. 1970; 403-404.
102. Lowry By OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
103. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, et al. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 2005; 212 (2): 116-123.

104. Aktürk E, Kurtoğlu E, Harputluoğlu H. Kanseri ilaçlarının kardiyovasküler yan etkileri: bu yan etkiler nasıl belirlenmeli, tedavi ve takip nasıl yapılmalı? İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2011; 18 (2): 137-42.
105. Kumar KBH, Kuttan R. Chemoprotective activity of an extract of phyllanthus amarus against cyclophosphamide induced toxicity in mice, *Phytomedicine* 2004; 494-500.
106. Sugumar E, Kanakasabapathy I, Abraham P. Normal plasma creatinine level despite histological evidence of damage and increased oxidative stress in the kidneys of cyclophosphamide treated rats. *Clin Chim Acta* 2007; 376: 244-245.
107. Abraham P, Rabi S. Nitrosative stress, protein tyrosine nitration, PARP activation and NAD depletion in the kidneys of rats after single dose of cyclophosphamide. *Clin Exp Nephrol* 2009; 10.
108. Etlik Ö, Sagmanlıgil V, Tomir A. Kobaylarda siklofosfamidin yalnız ve mesna ile kullanılmasının bazı kan parametreleri üzerine etkisi. *Tr J of Veterinary and Animals Sciences* 1999; 23 (4): 747-750.
109. Glasscock RJ, Massry SG. Neoplasia Textbook of Nephrology. In: Glasscock RJ, Massry SG (Editors). Williams and Wilkins, Baltimore 1996: 1117-1123.
110. Fillastre JP, Godin M, Davison AM, et al. Drug induced nephropathies. In: *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. New York: Oxford University Press 1998; 2645-2657.
111. Harmon WE, Cohen HJ, Schneeberger EE, Grupe WE. Chronic renal failure in children treated with methyl CCNU. *N Engl J Med* 1979; 300: 1200-1203.
112. Hsu HC, Tsai HM. Cyclophosphamide induced glomerular injury in newborn mice. *Lab Invest* 1982; 47: 281-285.
113. Dick Da F. Clinical experience with cyclophosphamide in malignant disease. *Can Med Assoc J* 1961; 28 (85): 974-986.
114. Lavin P, Koss LC. Effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat. IV. Electron microscopic study of the renal tubules. *Am J Pathol* 1971; 62: 169-180.
115. Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R, Devaki T. attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats, *Chemico Biological Interactions* 2006; 160: 252-260.
116. Qin C, Songzhao Z, Huazhong Y, Xiaoyan D, et al. Chemical characterization and immunostimulatory effects of a polysaccharide from Polygoni Multiflori Radix Praeparata in cyclophosphamide induced anemic mice. *Carbohydrate Polymers* 2012; 1476-1482.
117. Tarek MK, Nermin AH. Cytoprotective effects of DL alpha lipoic acid or squalene on cyclophosphamide induced oxidative injury: An experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48 (8): 2326-2336.
118. Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatininduced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 2004; 195: 221-230.

119. Janero DR, Hreniuk D, Sharif HM. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heartmuscle cell (cardiomyocyte): lethal peroxidative membrane injury. J Cell Physiol 1991; 149: 347-64.
120. Çetik S. Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Kardiyotoksisitede Oksidatif Stres ve Kalp Hasarına Karşı Karvakrolün Koruyucu Etkisi. Doktora Tezi. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
121. Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, et al. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. Toxicology 2006; 222: 60-70.
122. Bode U, Seif SM, Levine AS. Studies on the antidiuretic effect of cyclophosphamide: vasopressin release and sodium excretion. Med Pediatr Oncol 1980; 8 (3): 295-303.



8. ÖZGEÇMİŞ

20.09.1990 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta, lise eğitimimi aynı şehirde tamamladım. 2008 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Öğretmenliğinden 2012 yılında Biyolog olarak mezun oldum. Aynı zamanda Fırat Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Pedagojik Formasyon eğitimini tamamladım. 2013 yılı bahar döneminde, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. Yüksek lisans eğitimine hala devam etmekteyim. Bekarım.