



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MARBOFLOKSASİNİN N- ASETİLSİSTEİN İLE BİRLİKTE
SIĞIR TRAKEA EPİTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE APOPTOTİK,
SİTOTOKSİK VE NEKROTİK ETKİLERİ**

Ceren IŞIK

FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI (VETERİNER)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ebru YILDIRIM**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine BAYDAN**

KIRIKKALE – 2022



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MARBOFLOKSASİNİN N- ASETİLSİSTEİN İLE BİRLİKTE
SIĞIR TRAKEA EPİTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE APOPTOTİK,
SİTOTOKSİK VE NEKROTİK ETKİLERİ**

Ceren IŞIK

FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI (VETERİNER)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ebru YILDIRIM**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine BAYDAN**

KIRIKKALE – 2022

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ° Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi
- ° Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ° Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi
- ° Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı

Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi durumda aleyhime doğabilecek hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ceren IŞIK

Tarih: 21.10.2022

ÖZET

MARBOFLOKSASİNİN N- ASETİLSİSTEİN İLE BİRLİKTE SIĞIR TRAKEA EPİTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE APOPTOTİK, SİTOTOKSİK VE NEKROTİK ETKİLERİ

Kırıkkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Dr. Ebru YILDIRIM
Ortak Danışman: Prof. Dr. Emine BAYDAN

Ekim 2022, 45 sayfa

Bu çalışma florokinolon grubu bir antibiyotik olan marbofloksasinin N- asetilsistein ile birlikte siğir trakea epitel hücre kültüründe etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı. Bu amaç doğrultusunda siğir trakeasından steril ortamda epitel doku alındı; ve primer hücreler üretildi. Sitotoksikite testi olarak MTT testi kullanıldı. Apoptoz ve nekroz tespiti için ikili boyama yapıldı. Marbofloksasin 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL dozlarında, N-asetilsistein ise 0.1 ve 1mM derişimlerde marbofloksasin ile birlikte uygulandı. Çalışmanın sonunda marbofloksasin + 1mM N-asetilsistein uygulanan hücrelerin, marbofloksasin ve marbofloksasin + 0.1 mM N-asetilsistein uygulanan siğir trakea epitel hücrelerine göre % canlılık değerlerini, uygulanan her dozda istatistiksel olarak arttığı saptandı (p<0.05). Marbofloksasin uygulamalarının apoptoz ve nekroz yüzdeleri karşılaştırıldığında 6.25 ve 3.12 µg/mL dozda hücrelerde nekroz olgusuna rastlanmadı. 100 ve 50 µg/mL marbofloksasin uygulanan siğir trakea hücrelerinde apoptoz ve nekroz yüzde indeksleri arasında istatistiksel olarak nekrozun daha fazla olduğu saptandı (P<0.05). 0.1 ve 1 mM NAC ile beraber 12.5 µg/mL, 6.25 ve 3.12 µg/mL marbofloksasin uygulamasında nekroz olgusuna rastlanmadı. Sonuç olarak iki ilacın beraber kullanımının tedavisel yaklaşımda olumlu olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Epitel hücre, hücre kültürü, marbofloksasin, N-Asetilsistein, siğir, trakea,

ABSTRACT

APOPTOTIC, CYTOTOXIC AND NECROTIC EFFECTS OF MARBOFLOXACIN WITH N-ACETYLCYSTEINE IN BOVINE TRACHEAL EPITHELIAL CELL CULTURE

Kırıkkale University
Graduate School of Health Sciences
Department of Pharmacology and Toxicology
Supervisor: Doç. Dr. Ebru YILDIRIM
Co- Supervisor: Prof. Dr. Emine BAYDAN

October, 2022, 45 pages

This study was carried out to investigate the effects of marbofloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, together with N-acetylcysteine in bovine tracheal epithelial cell culture. For this purpose, epithelial tissue was taken from the bovine trachea, and primary cells were produced. MTT test was used as a cytotoxicity test. Apoptosis and necrosis determined by double staining test. Marbofloxacin was administered at 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 µg/mL doses, and N-acetylcysteine was administered together with marbofloxacin at 0.1 and 1 mM concentrations. At the end of the study, it was determined that the cells treated with marbofloxacin + 1mM N acetylcysteine statistically increased the % viability at each dose compared to the bovine tracheal epithelial cells treated with marbofloxacin and marbofloxacin + 0.1 mM N-acetylcysteine ($p < 0.05$). When the percentages of apoptosis and necrosis of marbofloxacin applications were compared, no necrosis was observed in cells at doses of 6.25 and 3.12 µg/mL. At 100 and 50 µg/mL marbofloxacin it was observed that necrosis was higher than apoptosis ($p < 0.05$). Necrosis was not observed in the administration of 12.5 µg/mL, 6.25 and 3.12 µg/mL marbofloxacin with 0.1 and 1 mM NAC. To conclude it is suggested that the usage of these drugs together may have beneficial effect.

Keywords: Cattle, cell culture, epithelial cell, marbofloxacin, N-Acetylcysteine, trachea

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ebru YILDIRIM' a, ayrıca ikinci danışman hocam Prof. Dr. Emine BAYDAN'a, aldığımız eğitim aşamasındaengin bilgilerini bizimle paylaşan Prof. Dr. Ender YARSAN'a, yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ'ye ve özellikle laboratuvar aşamasında bana her türlü olanağı sağlayan Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK'e, yine laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Esra ARAT'a teşekkür ederim. Ayrıca tüm hayatım boyunca desteklerini hiç eksik etmeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Florokinolonlar	2
1.2. Marbofloksasin	4
1.3. N-Asetilsistein.....	7
1.4. Sığırlarda Solunum Sistemi ve Solunum Yolu Epitelinin Önemi	10
1.5. Apoptoz ve Nekroz	12
1.6. MTT	14
1.7. Çalışmanın Amacı.....	14
2. MATERYAL VE YÖNTEM	16
2.1. Kullanılan İlaç ve Kimyasal Maddeler	16
2.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	17
2.3. Hücre Kültürü İzolasyonu.....	18
2.4. Sitotoksisite Testi (MTT).....	19
2.5. İkili Boyama.....	21
2.6. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler.....	22
3. BULGULAR	23
3.1. MTT Testi Bulguları	23
3.2. İkili Boyama Bulguları	27
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
1.1. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar	13
2.1. Sığır trakeasına uygulanan Marbofloksasin ve NAC'ın IC ₅₀ sonuçları.....	24
3.1. Sığır trakeasına uygulanan marbofloksasin ve NAC'ın % apoptoz ve nekroz sonuçları	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1. Florokinolonların kimyasal şekli.....	3
1.2. Marbofloksasin kimyasal şekli.....	4
1.3. N- asetilsisteinin kimyasal yapısı.....	7
2.1. Sığır trakeası ve epitel doku parçalarının üzerine besi yeri ilave edilmesi	19
2.2. Besi yeri konulduktan 2 saat sonra sığır epitel hücrelerin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri.....	19
3.1. ^{a,b} Farklı harfler arasındaki fark önemlidir.....	23
3.2. Sığır trakea hücresinin görüntüleri.....	24
3.3. Marbofloksasin ile N-Asetilsisteinin sığır trakea hücresine etkilerinin görüntüsü.....	25
3.4. Sığır trakea hücresi PK, DMSO, NAC.....	26
3.5. 3,12 µg/ml -100 µg/ml arası dozlarda marbofloksasin, marbofloksasin + 0.1mM NAC ve marbofloksasin + 1mM NAC' in sığır trakeal epitelyum hücrelerine ait % apoptoz indeksi.....	27
3.6. ^{a,b} : Farklı harfler arasındaki fark önemlidir. 12,5 µg/ml -100 µg/mL arası dozlarda marbofloksasin, marbofloksasin + 0.1mM NAC ve marbofloksasin + 1mM NAC' in sığır trakeal epitel hücrelerine ait % apoptoz indeksi.....	28
3.7. Hoechst ve Propidyum iyodür boyaları kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücresine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntüleri.....	30
3.8. Hoechst ve Propidyum iyodür boyaları kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücresine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntüleri.....	31
3.9. Hoechst ve Propidyum iyodür boyaları kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücresine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntüleri.....	32

SİMGELER DİZİNİ

A	Alfa
B	Beta
μ	Mikro



KISALTMALAR

G	Gram
Ppm	Karışımdaki maddenin milyonda biri
mL	Mililitre
%	Yüzde
KÜBTUAM	Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü
Kg	Kilogram
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
Mg	Miligram
Ph	Hidrojen İyonları Yoğunluğu
NAC	N-Asetilsistein
PK	Pozitif Kontrol
NK	Negatif Kontrol
FITC	Floresan izotiyosiyanat
IC50	%50 inhibitör konsantrasyon
GABA	Gama aminobütirik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
D.İ.	Damar içi
K. İ.	Kas içi
FDA	US Food Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)
GSH	Aktif glutasyon
DNA	Deoksiribo nükleik asit
IBR	Infectious Bovine Rhinotracheitis
TAP	Trakeal antimikrobiyal peptid
TNF	Tümör nekroz faktörü
FasL	Fas ligandı
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür

PI

HepG2

EC₅₀

CACO-2

Propodium iodide

Hepatosellüler karsinom hücre dizisi

Etkili konsantrasyon 50

Caucasian colon adenocarcinoma



1. GİRİŞ

Kinolonlar Gram negatif, Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili, geniş etki spektrumlu, beşeri ve veteriner hekimlikte yaygın şekilde kullanılan bir antibiyotik grubudur (Günel ve Erdem 2014, Paulin vd., 2017). Florokinolon antibiyotikler etkilerini topoizomeraz gen ürünlerini ve dolayısıyla DNA replikasyonunu önleyerek gösterirler (Hawkey, 2003). Şöyle ki bakterilerde topoizomeraz II (DNA jiraz) ve topoizomeraz IV enziminin etkisini önleyerek DNA replikasyonu ve hücre bölünmesini önlerler. Böylece DNA jiraz enzim etkinliğini engelleyerek Gram negatif bakterilere; topoizomeraz IV enzim etkinliğini önleyerek Gram pozitif bakterilere etkinlik gösterirler (Günel ve Erdem, 2014).

Marbofloksasin, florokinolon grubu antibiyotik olup, birçok hayvan türü için kullanılabilen bir antibiyotiktir. Duyarlı bakterilerin yol açtığı deri ve yumuşak doku, kemik ve idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni ve hücre içi organizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılır (Papich, 2021). Marbofloksasinin özellikle sığırların solunum yolu hastalıklarında oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Thomas, Madelenat, Davotve Boismare, 1998). Solunum yolu hastalıkları, buzağuların sağlığını etkileyen, yetiştiricilerin en önemli sorunlarından biri olup birden fazla nedene ve etkene bağlı olarak gelişen bir hastalıktır. Ekonomik olarak da üreticiye sorun oluşturmaktadır (Thomas, Caldow, Borell, ve Davot, 2001).

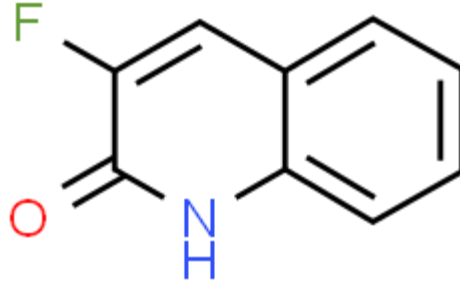
N-Asetilsistein (NAC) tiyol içeren bir bileşik olup yaklaşık 40 yıldır klinik pratikte kullanılmaktadır. NAC, kronik bronşit ve kistik fibroz gibi aşırı mukus salgılanması ile ilişkili, konjestif ve obstrüktif akciğer hastalıklarının tedavisi için kullanılmaktadır (Moldeus ve Cotgreave, 1994).NAC aynı zamanda antioksidan özellikleri olan bir madde olup, c-Jun N-terminal kinaz, p38 MAP kinaz ve redoksa duyarlı aktive edici protein-1 ve çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyen nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörü aktivitelerinin başlamasını inhibe eder. Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz yolunu aktive ederek apoptozu önleyebilir ve hücre canlılığını destekleyebilir; bu belirli dejeneratif hastalıkların tedavisi için faydalıdır (Zafarullah, Li Sylvester ve Ahmad, 2003).

N-asetilsistein mukusun polimerleri arasındaki disülfidril bağlarını parçalar. Mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki göstererek solunum yollarındaki mukusun visko-elastikiyetini azaltır ve akışkan duruma getirir. Bu şekilde bronşiyal sekresyonların atılımını artırır ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının iyileşmesine yardımcı olur. NAC hücre hasarını engeller ve koruyucu bir etki gösterir (Atalay, Odabasoglu ve Halici, 2016).NAC son derece güvenli sağaltım indeksi geniş bir ilaçtır (Bernard, 1991). N-asetilsisteinin ucuz olması, kolay ulaşılabilir olması, solunum yolu hastalıklarında yaygın olarak kullanılabilmesi, yan etkilerinin az olması, yüksek yoğunluğa ulaşabilir olması ve daha az kalıntı bırakması üstün özelliklerinden birkaçıdır (Taha, 2018).

Hastalıkların sağaltımında ilaçlar arasındaki sinerjizmadan faydalanmak avantajlıdır. Antibiyotikler ile NAC'ın beraber kullanımının patojenlere karşı etkinliğini değerlendiren çalışmalar bulunmaktadır (Aiyer vd., 2021; Landini vd., 2016; Monoharan vd., 2020). Marbofloksasin ve NAC'ın beraber kullanımının ne gibi etkiler yaratacağının araştırılması infeksiyöz hastalıkların tedavisi stratejilerine katkı sağlayacaktır.

1.1. Florokinolonlar

Florokinolonlar, bir 1,8-naftiridin olan nalidiksik asidin sentetik florlu analoglarıdır. Bunlar 4-kinolon çekirdeğine sahiptirler (Şekil 1.1) (Brar, Jyoti, Patil ve Patil, 2020). Kinolonlar kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre 2 gruba ayrılırlar. Kimyasal yapılarına göre, monosiklik, bisiklik, trisiklik ve tetrasiklik türevleri olmak üzere biyoyararlanım ve etki özelliklerine göre farklı kuşaklara ayrılır. Biyolojik sınıflandırmada etki spektrumlarına göre de sınıflandırılmaktadırlar. Buna göre Enterobacteriaceae grubu bakterilere etkiyen florokinolonlar dar etki spektrumlu olanlar ve geniş etki spektrumlular olarak ayrılır. Hızlı metabolize olan bileşikler ve yavaş metabolize olanlar olarak ayrılabilir. Florokinolonların yapıları ve klasifikasyonu, antibakteriyel etkinliği, ilacın farmakokinetik özelliklerinin anlamada yardımcı olur (Bryskier ve Chantot, 1995). Veteriner hekimlikte enrofloksasin başta olmak üzere danofloksasin, difloksasin, marbofloksasin ve norfloksasin en sık kullanılan florokinolonlardır (Grobbel vd., 2007).



Şekil 1.1. Florokinolonların kimyasal şekli (Anonim, 2022a)

Florokinolonlar başta Enterobacteriaceae olmak üzere Gram negatif bakterilere iyi etkinlik gösterirler. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus Mirabilis*, Enterobacteriaceae genellikle duyarlı bakterilerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın duyarlılığı değişken olmakla beraber siprofloksasin bu bakteriye karşı en güçlü etkinlik gösteren florokinolondur. Gram pozitif bakterilerin duyarlılığı da farklılıklar gösterebilir. *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus intermedius* genellikle duyarlıdır. Metisiline dirençli türler florokinolonlara da dirençlilik gösterebilir (Papich ve Riviere, 2001).

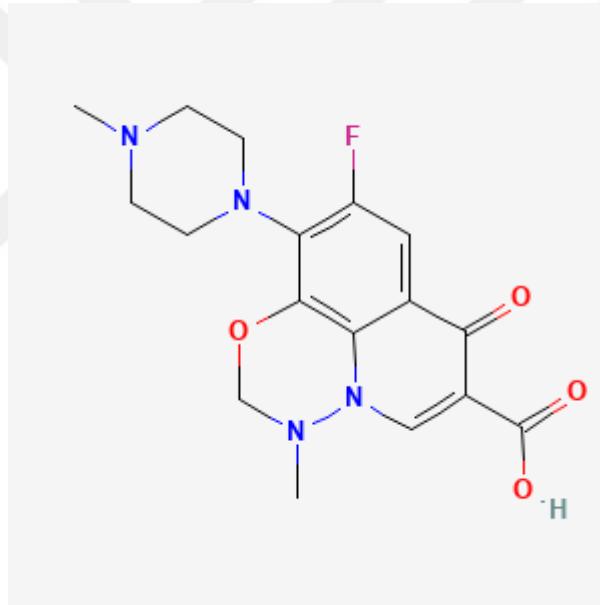
Florokinolonlar ağızdan kullanıldıklarında, monogastrik hayvanlarda hızla emilirler. Enrofloksasin %80-100 arası, siprofloksasin %50-70 arası norfloksasin ise % 40 oranında emilir. İlaç kullanımında gıda alınması ilacın plazma pik konsantrasyona çıkmasını geciktirir; buna karşın pik plazma konsantrasyon düzeyini değiştirmez. Metal iyonları ilacın emilimini olumsuz etkilemektedir. Proteinlere bağlanma düzeyinin düşük olması, yüksek lipid çözünürlüğü, dağılım hacminin büyük olmasına, serebrospinal ve bronşiyal sıvıya, prostat, kemik ve kıkırdak dokuya ilacın iyi geçmesi ile sonuçlanır. Ürogenital ve solunum yolu sekresyonunda ilacın konsantrasyonu plazma düzeyinden çok daha fazladır. Florokinolon grubu ilaçların atılması ilaca göre değişkenlik göstermekle beraber; genellikle böbrek, karaciğer ya da hem böbrek hem de karaciğer yolu ile olmaktadır. Enrofloksasin böbrek yolu ile, difloksasin dışkı ile marbofloksasin hem böbrek hem dışkı yolu ile atılmaktadır. Atılma yarı ömrü yine ilaca göre değişkenlik gösterir ve ortalama 8-12 saattir (Maddison ve Watson, 2002).

Üstün farmakokinetik özellikleri, geniş etki spektrumu gibi birçok önemli etkilerinin yanı sıra florokinolonların yan etkileri de bulunmaktadır. Oral yolla kullanımı sindirim kanalında irkiltiye neden olabilir. Kıkırdak dokunun gelişimini bozabilir.

Sinir sisteminde GABA saliverilmesini azaltarak çarpınmalara neden olabilir (Kaya, 2014). Ayrıca tendinopati, aortopati, nöropati, aritmi, hipoglisemi ve hiperglisemigibi yan etkiler görülebilir. Bu ciddi yan etkiler nadir olmakla beraber büyük önem arz eder (Baggio ve Ananda-Rajah, 2021).

1.2. Marbofloksasin

Marbofloksasin ethanol, dimetilsülfoksid (DMSO) ve dimetil formamid gibi organik çözücülerde çözünen 3. nesil florokinolon antibiyotiktir (Anonim, 2020). 7-fluoro-2-methyl-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-10-oxo-4-oxa-1,2-diazatricyclo[7.3.1.0^{5,13}]trideca-5 (13), 6,8,11-tetraene-11-carboxylic acid yapısındadır. Şekil 1.2’de marbofloksasinin Howard formülasyonuna göre kimyasal yapısı gösterilmiştir (National Center for Biotechnology Information, 2022a).



Şekil 1.2. Marbofloksasin kimyasal şekli

(National Center for Biotechnology Information, 2022a).

Veteriner pratikte sığır, at, köpek ve kedilerde kullanılır. Özellikle solunum yolu hastalıkları ve sığırlarda mastitis olgularında kullanılmaktadır (Kaya, 2014; Paulin vd., 2016). Sığırlarda solunum yolu enfeksiyonları hem üst hem de alt solunum yollarını etkilemektedir. Sığırlarda üst solunum yollarını en çok etkileyen enfeksiyonlar *Pasteurella Multocida*, *Mycoplasma salivarium*, Infeksiyöz bovin rhinotrakeitis ve Parainfluenza 3’dir. Alt solunum yollarını ise en çok etkileyen enfeksiyonlar Adenovirus’ dur (Baskerville, 1981). Marbofloksasin 1997 yılından

itibaren sadece Avrupa' da sığır ve domuz gibi besin değeri olan hayvanlarda solunum sistemi enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları ve gastrointestinal hastalıklarda kullanılması onaylanmıştır. 2000 yılından itibaren ise İngiltere'de sütçü ineklerin *Escherichia coli* ye bağlı akut mastitis olgularında kullanılmaya başlanmıştır (Celani, 2017). Kinolon grubu antibiyotiklerin birçok özelliğini paylaşır. Gram pozitif, Gram negatif ve *Mycoplasma* türlerine etkilidir. (Schneider vd., 2004). Anaerob bakterilere karşı etkinliği diğer kinolon grubu antibiyotiklere göre daha iyidir (Yazar, 2018).

Marbofloksasin köpeklerde ve kedilerde oral uygulamadan sonra gastrointestinal sistemden hızla ve neredeyse tamamen emilir ve köpeklerde biyoyararlanımı %94'tür. Köpeklerde %10-15'i karaciğerde metabolize edilir. Oral dozun yaklaşık %40'ı değişmeden köpeklerin idrarıyla atılır. İlacın %70'i (%85) ve metabolitleri (%15) kedilerin idrarıyla atılır. Geri kalanı safra yoluyla dışkıyla atılır (Perry ve Mitchell, 2019). Süt ineklerinde marbofloksasinin plazma ve süt farmakokinetiği ve mastitis ile izole edilmiş patojenlere karşı farmakodinamik özellikleri değerlendiren bir çalışmada marbofloksasin, süt ineklerine %10 sulu solüsyon olarak kas içi tek dozda veya 3 gün boyunca günde bir kez 2 mg/kg'lık tekrarlayan dozlarda verilmiştir. Marbofloksasin ve metabolitleri olan N-desmetil-marbofloksasin ve N-oksit-marbofloksasin konsantrasyonları kan ve süt örneklerinde araştırılmıştır. İlk uygulamadan sonra sütte maksimum marbofloksasin konsantrasyonu (C_{max}) 1,024 µg/mL olarak saptanmıştır. İlk doz aralığı sırasında eğrinin altındaki alan mililitrede 6,513 µg/saat olarak bulunmuştur. Her iki metabolit de tespit sınırının altında olmakla beraber sütte rastlanmıştır. (Schneider, Vallé, Woehrlé ve Boisramé, 2004). Başka bir çalışmada Kore sığırında marbofloksasinin farmakokinetik parametreleri, 2 mg/kg dozunda damar içi (D.İ.) veya kas içi (K.İ.) uygulamasını takiben çalışılmıştır; D.İ. uygulamanın eğri altında kalan alanı (AUC₀₋₂₄ saat), yarılanma ömrü (t_{1/2}) ve toplam vücut klerensi sırasıyla 6.87 saat/µg/mL, 2.44 saat ve 0.29 l/kg/saat olarak bulunmuş; K.İ. uygulama için karşılık gelen değerler ise 5.07 saat/µg/mL, 2.44 saat ve 0.39 l/kg/saat olarak bulunmuştur (Belew, vd., 2015). Domuzlara tek doz K.İ 2 mg/kg marbofloksasin uygulaması yapmış ve marbofloksasinin bronkoalveolar bölgede iyi dağıldığını göstermiştir. Benzer bir çalışma sığırlarda da yapılmış 2 mg/kg K.İ. tek doz uygulanan marbofloksasin bronkoalveoler bölgeye iyi dağılmıştır (Hayashi vd., 2019). Marbofloksasinin farmakodinamik özelliklerini sığır solunum

yolu patojenleri *Mannheima haemolytica* ve *Pasteurella multocida* için araştıran bir çalışmada, *Mannheima haemolytica* ve *Pasteurella multocida* izolatları için AUC 24 saat/MIC'ler, serumda yapay büyüme ortamına göre daha yüksek çıkmış bu da serum proteinlerine marbofloksasinin bağlanması nedeniyle olduğu dşnlmştir (Llambas vd., 2013). Yapılan bir araştırmada marbofloksasinin kuzuların solunum yolu enfeksiyonlarına karşı günde 2 kez günde bir kez 3,0 mg/kg doz oranında veya 3 kez arka arkaya  gün süreyle 2,0 mg/kg doz oranında etkili olduğu gösterilmiştir (Skoufos vd., 2020). Yine doğal olarak pnömonisi olan yavru keçilerde tek doz marbofloksasinin etkisini araştıran bir çalışmada ilaca bağlı herhangi bir yan etki olmadığı ve marbofloksasinin oldukça etkili olduğu saptanmıştır (Kacar, Batmaz, Yılmaz ve Mecitoğlu, 2018).

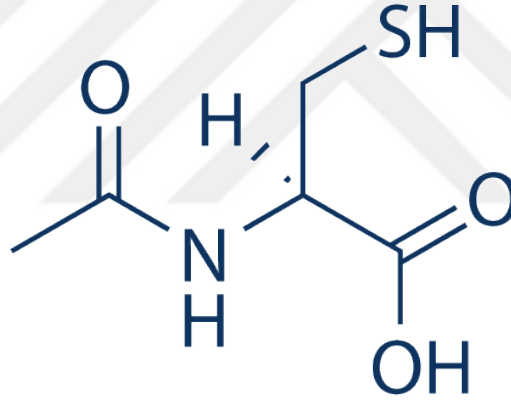
Marbofloksasinin en sık karşılaşılan yan etkileri kusma, ishal ve iştah kaybıdır. Çok ciddi olgularda kıkırdak bozukluklarına da rastlanılmaktadır. Yüksek dozda kedilerde körlük ve göz hasarı da görülmektedir (Gollakner, 2020). Köpeklerde ise kusma anoreksi, su kaybı zayıflama, yüzde şişme, deride kızarıklık, durgunluk gibi yan etkileri oluşabilir (Kaya, 2014). Coşkun vd., (2019) yaptıkları çalışmada 10 merinos tokluya 14 gün boyunca marbofloksasin (10 mg/kg/gün, subkutan) vermişler ve marbofloksasin, troponin I olan kardiyak hasar belirteçlerini rakamsal olarak LDH ve AST düzeylerini artırdığından, istatistiksel olarak anlamlı olarak artırdığını tespit etmişlerdir. Araştırcılar koyunların yüksek dozlarda uzun süreli marbofloksasin ile tedavi edilmesi gerektiğinde kardiyotoksitenin dikkatli alınması gerektiği ifade etmişlerdir. Marbofloksasin, eklem kondropatisine neden olduğundan diğer kinolonlar gibi, ergin olmayan hayvanlarda kullanılmamalıdır. Ayrıca merkezi sinir sistemi bozuklukları olan hayvanlarda da kullanılmamalıdır (Perry ve Mitchell, 2019).

Bakterilerin, enfeksiyonların sebep olduğu hastalıklarda doğru ve ekonomik ilaçların kullanımı sağlanarak olumsuz ekonomik etkilerin en aza düşürülmesi ve hayvan refahının st düzeye çıkarılması için veteriner hekim tarafından uygun görülen tedavide direnç geliştirme riskini en aza düşürecek önlemleri içinde bulunduran bir tedavinin seçilmesi gerekir. Bu sebepten dolayı marbofloksasin tercihler arasında st sıralardadır. Geniş spektrumlu olması, hızlı bakterisidal etkiye sahip olması ve direnç gelişmesinin düşük olmasından kaynaklı florokinolonlar veteriner hekimliğinde

yaygın olarak kullanılan ve tercih edilen antibiyotik grubudur (Feray, Orhan, Duygu ve Kamil, 2018).

1.3. N-Asetilsistein

N-asetilsistein, mukolitik tedavi ve asetaminofenin doz aşımı tedavisi için kullanılan bir antioksidan ve glutasyon indükleyicidir. Asetilsistein, karışık sonuçlarla birlikte çok çeşitli etiket dışı endikasyonlar için de çalışılmıştır. Asetilsistein, 14 Eylül 1963'te FDA onayı almıştır (National Center for Biotechnology Information, 2022b). N-Asetilsistein, birçok çalışmada kullanılan ve kliniklerde de oldukça fazla uygulanan bir antioksidandır. Asetilsistein aynı zamanda bulundurduğu tiyol grubundan dolayı direkt olarak kendisi de antioksidan olarak görev alır. Asetilsistein uzun zamandır asetaminofen toksisitesinde ve çeşitli akciğer hastalıklarında mukolitik olarak anlamlı uygulanmaktadır (Millea, 2009).



Şekil 1.3. N- asetilsisteinin kimyasal yapısı (Anonim, 2022b)

N-asetilsistein, L-sistein amino asidinin asetilenmiş şeklidir (Şekil 1.3) Sülfidril gruplarının bir kaynağı olmakla beraber, hücre içi GSH prekürsörü olarak, detoksifikasyon ve serbest radikalleri yakalama kısmında önemi anlaşılmaktadır. İnsanlarda ise NAC; GSH azalması ya da oksidatif stres gibi olaylarla karakterize edilen HIV enfeksiyonu, kanser, kalp hastalıkları ve sigara kullanımı gibi durumların varlığında yararlı etkileri bulunmaktadır. NAC'ın akut ağır metal zehirlenmelerinde tedavi edici ajan şeklinde kullanılması da farklı bir klinik uygulama alanıdır. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar ve yapılan deneyler bir antioksidan olan NAC'ın, aynı zamanda protein kinaz etkinliğini ve mitojenik yanıtla ilişkili gen ekspresyonunu durdurduğunu göstermektedir. T lenfositleriyle çalışılan bir deneyde,

NAC'ın interlökin (IL) 2 ve IL-12 ile uyarılmış T hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. NAC'ın, 2D6 (T hücresi klonu) hücrelerinde IL-12 aracılı proliferasyona ket vurduğu saptanmıştır. Pankreatik karsinoma hücre hatlarıyla yapılan bir deneyde ise, NAC'ın doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladığını ve intraselüler glutatyon içeriğinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (Van Zandwijk, 1995). N-asetilsistein bir amino asit olan L- sisteinin asetilenen bir türevidir. Konsantrasyona bağlı olarak bir yangı önleyici veya pro-oksidan olarak davranabilir. NAC mukusun polimerleri arasındaki disülfidril bağlarını parçalar. Mukoid sekresyonlar üzerine mukolitik etki göstererek solunum yollarındaki mukusun visko-elastikiyetini azaltır ve akışkan duruma getirir. Bu şekilde bronşiyal sekresyonların atılımını artırır ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının iyileşmesine yardımcı olur. NAC'ın ana etki mekanizmasını hücrelerde glutatyon (GSH) seviyesini arttırarak gösterdiği bildirilmiştir. NAC hücre hasarını engeller ve koruyucu bir etki gösterir (Bavarsad vd. 2014). İlaç oral uygulama sonrasında çok hızlı emilir. N-asetilsistein nispeten düşük toksisiteye sahiptir ve mide bulantısı, kusma, burun kanaması, pruritus ve taşikardi gibi hafif yan etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Afshin vd., 2014).

N-Asetilsistein uygulaması sonrasında G1 fazındaki hücrelerin yüzdesi, kontrol grubunda görülen yüzdeden bariz bir şekilde daha yüksek olarak görülmüş, NAC uygulaması yapılan karsinoma hücrelerinin siklin D1 ekspresyonu, NAC uygulaması yapılmayan hücrelere göre yüksek oranda azalmıştır. Klomifene dayanıklı polikistik over sendromlu hastaların infertilite tedavisinde kullanılmakta olan NAC ile ilgili yapılmış ilk çalışmalar, kanser önleyici olarak uygulanılabileceği ve böbrek yetmezliği hastalarında gentamisinle uyarılmış işitme kaybı profilaksisinde kullanılabileceği önerilmiştir. NAC'ın antimitojenik ve antikarsinojenik özellikleri; antioksidan aktivitesi, intraselüler redükte edilmiş GSH prekürsörü gibi davranma niteliği, detoksifikasyon modülasyonu, DNA tamir edilmesi işlemleri gibi birden çok koruyucu mekanizmayla alakalandırılabilir (Van Zandwijk, 1995).

N-asetilsistein hücrelerde sülfhidril topluluklarının kaynağı olup, OH gibi reaktif oksijen radikalleriyle etkileşime girerek serbest radikalleri temizler (Li vd., 2003). NAC apoptozu engelleyebilmekte, farklı proteinlerin etkinliklerini bir düzene koyarak hücre yaşamına yardımcı olmaktadır. NAC, endotelial disfonksiyonunu düşürmekte, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erozyonu, asetaminofen

detoksifikasyonu ve transplantasyon ihtiyacının uzamasına olanak sağlamaktadır (Foresti vd., 1999). NAC bazı riskli durumlarda karaciğer hasarını önlemekte ve ölüm oranını düşürmektedir (Li vd.,2003).

N-asetilsistein sıçanlarda toksik kadmiyum ile birlikte kullanıldığına da lipid peroksidasyonunu engelleyerek karaciğer hasarını azaltmaktadır (Shaikh vd., 1999). Kokain ile ortaya çıkan karaciğer hasarı oranı da NAC ile düşürülebilir. Karaciğer transplantasyonunda reperfüzyon ile oluşan oksidan zarar da NAC ile önemli seviyede azaltılabilmektedir. Mevcut bilinen etkinlikleriyle NAC, karaciğerde oksidatif strese karşı tedavi edici etki ile transplantasyon hasarı, metal toksisitesi ve fibroz, alkolizm de tedavi edici rolü oynayabilir. Ek olarak alınan NAC karaciğer, akciğer, böbrekler ve kemik iliğinde GSH düzeyini yükselterek yaşlanmayı geciktirici bir özelliğe sahiptir. NAC iyi tolere edilir, iyi emilir, enzimatik bozulmaya dirençlidir (Kennedy ve Rosa, 2000).

N-asetilsisteinin solunum yolu hastalıklarının sağaltımında büyük katkıları bulunmaktadır. Solunum yollarındaki aşırı mukus üretimini azaltarak ayrıca yangıyı önleyerek akciğerlerde virüs ve bakteriler tarafından kolonizasyonun önlenmesine yardımcı olabilir. Sağlıklı solunum yolu fonksiyonunu destekler ve bronşit, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve solunum yolu enfeksiyonlarını önleyebilir ya da tedavi edebilir (Stanton, 2020). Bazı ilaçlarla sinerjistik etkileri de saptanmıştır; Abdel-Wahab, Moussa ve Saad (2017) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, antikanserojen bir ilaç olan cisplatinin böbrekler üzerine olan yan etkilerinin 50 mg/kg NAC uygulaması ile azaldığını, bunun da sinerjistik etkiyi işaret ettiğini belirtmişlerdir. NAC, immünomodülasyon, GSH seviyesinin artırılması ve doğrudan antimikobakteriyel etkiler gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla mikrobakterilere etkili olmaktadır (Dawit, Solomon ve Abay, 2020). Teskey vd. (2018) immün modülasyon sayesinde, izoniazid ve rifampisin subprime seviyelerine NAC eklenmesinin, sağlıklı bireylerde Mycoplasma tuberculosis'i tedavi edebileceğini ortaya koymuşlardır. Planktonik fazda veya biyofilmler halinde yetiştirilen Acinetobacter baumannii suşlarına karşı NAC ile birlikte kolistin potansiyel sinerjizmini araştıran Pollini vd. (2018), kolistin ve NAC kombinasyonlarının tüm kolistine dirençli suşlarla ilgili bir sinerjisini ortaya çıkarırken, kolistine duyarlı suşlarda hiçbir sinerjizm gözlemlenmediğini bildirmişlerdir. De Flora, Agostini, Masiello, Giunciuglio ve Albini (1996), kanser hücreleri enjekte edilen farelerde NAC ve

doksorubisinin kombinasyonunun tümörijenik ve metastatik özelliklerini etkileyip etkilemediğini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada parenteral olarak verilen doksorubisin ve içme suyu ile verilen NAC arasında tümörijenisite ve metastazların önlenmesinde belirgin bir sinerji olduğunu göstermişlerdir. NAC'ın yüksek derişimlerinin (10 ve 50 mM) solunum yolu patojen suşuna karşı antibiyotik aktivitesi üzerine etkisi araştıran bir çalışmada, NAC'ın karbapenemlerden imipenem ve daha az oranda meropenem ve ertapenemden oluşan aktivitesini doza bağı bir şekilde değıştirdiğı, NAC varlığında karbapenemlerin kimyasal olarak kararsızlaştığı gösterilmiştir (Landini vd., 2016).

Profilaksi, tanı veya tedavi için kullanılan bir ilacın zararlı ve istenmeyen etkileri olarak ifade edilen istenmeyen ilaç reaksiyonları, ilaç dozu, ilaç uygulama yolu, yöntemi ve tedavi zamanı gibi bir dizi farmakolojik ve klinik faktörden etkilenir. Bu istenmeyen etkiler, doz veya uygulama yolu ile ilişkili olabilir. Dozaj ve uygulama yolundaki farklılıklardan orataya çıkan reaksiyonlar klinik semptomlar veya laboratuvar bulguları ile saptanabilir. (Feray, Orhan, Duygu ve Kamil, 2018)

1.4. Sığırlarda Solunum Sistemi ve Solunum Yolu Epitelinin Önemi

Memeli solunum sisteminin yapısal olarak karmaşık bir düzeni bulunmaktadır. Solunum sistemindeki organlar öncelikle oksijenin alınması ve karbondioksidin elimine edilmesi için görev yaparlar. Bunun dışında solunan yabancı cisimlerin uzaklaştırılması, hormonal düzenleme ve ksenobiyotiklerin metabolizması ve atılması ile ilgili görevleri bulunmaktadır (Harkema, Goerge, Hyde, Plopper ve Mariassy, 1991). Solunum sistemi; alt ve üst solunum sistemi olmak üzere ikiye ayrılmakta, üst solunum sisteminde burun ve farenks, alt solunum sisteminde ise larenks, trakea, bronşlar ve bronşiyoller yer almaktadır (König ve Liebich 2007, Akers ve Denbow 2008). Sığırın trakeası eliptik kesitli bir yapıya sahiptir ve dikey çap en geniş olan yeridir. Belirli bir dakika hacminde, sığır attan daha büyük bir trakeal hava hızına sahiptir ve bu da havadaki kirleticilerin göreceli olarak epitelyal dokuyla maruziyetini artırabilir (Veit ve Farrell 1978). Nitekim sığırlarda akciğerlerin anatomisi, onları solunum yolu hastalığına daha yatkın hale getirir. Sığırların diğere türlere göre daha fazla oksijene ihtiyacı vardır. Bu gereksinimi karşılamak için dakikada daha fazla solunum yapmaları gerekir. Bu yüksek hava

akışı, bakteri, virüs ve diğer kirlenmeler gibi patojenlerin akciğer dokusunun derinliklerine girmesine izin verir (FAAST, 2022).

Üst solunum yollarında bulunan trakea kolumnar siliyer hücreler ve goblet hücreleri ile kaplıdır ve tüm türlerde benzer özelliklere sahiptir. Submukozada, epitel yüzeyine mukus salgılayan geniş mukus ve seröz bezleri vardır. Sığırlarda bulaşıcı sığır rinotrakeiti (IBR), kümes hayvanlarında bulaşıcı bronşit ve bulaşıcı laringotrakeitis, kedilerin viral rinotracheitisi, köpeklerin Bordetella bronchiseptica enfeksiyonu ve çocukların boğmaca (Bordetella pertussis) gibi enfeksiyöz hastalıklardan çok etkilenen bir organdır (Baskerville,1981). Hiyalin kıkırdakları birbirine tutunduran ve trakeanın esnek olmasına sebep olan fibroelastik bir bağ dokusu (ligamentum annularia) bulunmaktadır. Memelilerin solunum yolu düz kası, hem kasılma hem de gevşeme özelliklerini bir arada bulundurmaktadır. Bu kas, sempatik ve parasempatik sinir sistemi tarafından innerve edilmektedir. Solunum yolu gözle görülür biçimde daralabilir veya genişleyebilir (Canning ve Fischer, 2001).

Solunum yolu epiteli, bir bariyer oluşturarak, solunum yoluna giren yabancı partikülleri yakalar ve siliyer etki ile bu yabancı partikülleri uzaklaştırır. Böylece hem solunum yolunu hem de kendi bütünlüğünü çevresel toksinlerden ve yaralanmalardan korur. Bu epitel dokunun birincil rolüdür. Solunum yolundaki ana hücre tipleri salgı ve siliyer hücreleridir (Tesfaigzi, 2006).

Trakea, bronşlar ve bronşiyollerdeki yabancı çok katlı kolumnar epitel, daha farklı bir hücre grubu tarafından oluşturulmuştur. Bunlar seröz, nöroendokrin ve müsin salgılayan goblet hücreleri ve çeşitli enzimler, proteaz inhibitörleri, oksidanlar ve antimikrobiyal peptitlerdir. Bu proteinlerin tümü influenza ile ilgili değildir, ancak müsin, b-defensinler ve LL37'nin rolleri vardır (Denney ve Ho, 2018). Diamond vd. (1991) sığır trakeal mukozasının asit özütlerinde güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip bir peptit olduğunu bulmuşlardır. Peptit, bir Escherichia coli suşuna karşı antimikrobiyal aktivite kullanılarak iyon değişimi ve ters fazlı kromatografik fraksiyonlamaların bir kombinasyonu ile izole edilmiş ve bu peptite trakeal antimikrobiyal peptit (TAP) adı verilmiştir. Bu peptitlerin birçoğunun antimikrobiyal aktivite mekanizması, geniş bir antibiyotik aktivite spektrumuna yol açan seçici membran bozulması yoluyla; böylece Gram negatif ve Gram pozitif bakterileri, mantarları ve zarla çevrili virüsleri etkileyebilmektedir. Diamond, Jones ve Bevins (1993) TAP genini, sığır hava yolu mukozasında, özellikle hava yolunu kaplayan

kolumnar epitel hücrelerinde eksprese edilmiştir. TAP'ın geniş bir antimikrobiyal peptit ailesinin üyesi olduğunu belirten araştırmacılar, antimikrobiyal peptitlerin memeli solunum epitelinin konak savunmasının önemli bileşenleri olduğunu öne sürmüşlerdir.

1.5. Apoptoz ve Nekroz

Apoptoz, aktif, programlanmış olarak meydana gelen hücresel parçalanma süreci olarak tanımlanır; kontrollü bir süreçtir. Nekroz, inflamatuvar hücresel içeriğin kontrolsüz salınımı ile çevresel bozulmalardan kaynaklanan pasif, kazara hücre ölümü olarak tanımlanır (Fink ve Cookson, 2005).

Apoptoz, "ölüm reseptörleri" olarak adlandırılan spesifik hücre zarı reseptörlerinin aktivasyonuna ve ayrıca sitokrom C gibi mitokondriyal ürünlerin salınımına yanıt olarak ortaya çıkar. Ölüm reseptörü ailesi, TNF reseptörleri I ve II'yi ve sitotoksik lenfositlerin yüzeyindeki Fas ligandı (FasL) veya FasL'nin çözümlü bir formu (sFasL) tarafından aktive edilen Fas reseptörünü (CD95) içerir. Matris metalloproteinazlar 7 ve 3 (MMP-7, MMP-3) gibi spesifik serin proteinazların etkisiyle hücre zarlarından bölünebilir. Çözümlü FasL ayrıca aktive edilmiş kan monositlerinden salınır, ancak aktive edilmiş alveolar makrofajlardan salındığı görülmemektedir (Martin, Hagimoto, Nakamura ve Matute-Bello, 2005).

Apoptoz, normal hava yolu epitelinde önemli, faydalı bir düzenleyici role sahiptir. Daha önce belirtildiği gibi, bir inflamatuvar yanıtı provoke etmeden hasarlı hücreleri uzaklaştırmak için bir mekanizma sağlar. Ayrıca hücre proliferasyonu ile birlikte epitel hücrelerinin sayısını düzenlemektir. Apoptotik uyarılara yanıtta bölgesel farklılıklar vardır: örneğin bronşiyolar epitel hücreleri, daha büyük bronşlardan veya trakeadan toplananlardan daha duyarlıdır. Yangılı hava yolunu veya hiperplastik veya metaplastik olan bir hava yolunu normale döndürmek için apoptoz gerekir. Bunun meydana geldiği kontrol mekanizmaları hala anlaşılmamıştır. Apoptozun hava yolu inflamasyonu için ne zaman ve nasıl önemli olduğunu anlamak, çeşitli hava yolu hastalıkları için potansiyel terapötik hedefler sunar (White, 2011).

Apoptoza iki sinyal kaskad aracılık eder. Bunlar içsel ve dışsal apoptoz yollarıdır. İçsel apoptoz genellikle hücresel homeostazın bozulması nedeniyle oluşur ve dışsal apoptoz, ölüm reseptörleri yoluyla hücre dışı sinyalleme bir sonucu olarak ortaya

çıkar. İçsel ve dışsal apoptoz benzersiz başlangıç adımlarına sahipken, her ikisi de kaspazlar adı verilen bir dizi sistein proteazın aktivasyonu ile sonuçlanır. “Başlatıcı kaspazlar” (örn., kaspaz 8 veya 9) cellat kaspazlarının (örn., kaspaz 3 veya 7) aktivasyonuna yol açan bir dizi proteolitik adımı başlatır. “Cellat kaspazları” binlerce substratı parçalar ve organellerin enzimatik bozunmasından, DNA parçalanmasından ve karakteristik fosfatidilserin maruziyetinden sorumludur (Sauler, Bazan ve Lee, 2019).

Nekroz hemen hemen her açıdan apoptoz olayından farklı bir hücre ölümüdür. Terim, 'ölü' anlamına gelen Yunanca 'necros' kelimesinden türemiştir. Nekroze olan hücreler, apoptoz geçiren hücreler tarafından sergilenenlerle çok farklı morfolojik ve ultra yapısal özellikler gösterir. Ölüme, hücrenin aşırı şişmesi, çeşitli hücresel organellerin şişmesi, nükleer DNA'nın kümelenmesi ve rastgele bozulması, geniş plazma membran endositozu ve otofaji eşlik eder. Nekroz genellikle pasif bir süreç olarak kabul edilir, çünkü yeni protein sentezi gerektirmez, sadece minimum enerji gereksinimi vardır ve herhangi bir homeostatik mekanizma tarafından düzenlenmez (Syntichaki ve Tavernarakis, 2002). Nekrozun birçok sebebi olabilir bunlar: İskemi, şok veya solunum yetmezliği nedeniyle ortaya çıkan hipoksi, travma, aşırı sıcaklık, radyasyona maruz kalma veya elektrik çarpması gibi harici yaralanmalar, zehirler, bazı ilaçlar, bakteri, virüs veya mantarlar ve otoimmün tepkilerdir (Khalid ve Azimpouran, 2022). Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (Panawala, 2017)

Apoptoz	Nekroz
Programlı hücre ölümüdür.	Prematüre hücre ölümüdür.
Sitoplazmanın küçülmesi ile başlar ve çekirdeğin yoğunlaşması ile devam eder.	Sitoplazma ve mitokondri şişer ve bunu hücrenin parçalanması izler.
Doğal olarak oluşan fizyolojik bir süreçtir.	Patolojik bir süreçtir. Toksin ya da travma gibi dış etkenler sebep olur.
Apoptoz sırasında kromatin toplanır.	Kromatinde hiçbir yapısal değişiklik görülmez.
Kaspaz bağımlı bir yoldur	Kaspaz bağımsız bir yoldur.
Lokalize bir işlevdir. Belli başlı hücreleri yok eder.	Bitişik hücreleri de etkiler.
Genellikle organizmaya zarar vermez.	Organizmaya zarar verir.
Preolitik DNA fragmentasyonu oluşur.	Postolitik DNA digesyonu oluşur.

Solunum epitelinin nekrozu, bronşiolitteki en erken lezyonlardan biridir ve enfeksiyonluştuktan sonraki 24 saat içinde ortaya çıkar. Goblet hücrelerinin proliferasyonu aşırı mukus üretimi ile sonuçlanırken, siliyer olmayan hücrelerle epitel rejenerasyonu sekresyonların eliminasyonunu bozar. Lenfositik infiltrasyon submukozal ödem ile sonuçlanabilir. Enfekte solunum epitel hücreleri tarafından salınan sitokinler ve kemokinler, enfekte solunum yollarına hücresel katılımı artırarak bağışıklık tepkisini güçlendirir. İnterferon ve interlökin (IL)-4, IL-8 ve IL-9, enfekte hastaların solunum salgılarında yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Maraqa, 2021).

Fritsching vd. (2015) yaptıkları çalışmada kistik fibröz benzeri akciğer hastalığı olan farelerde nötrofilik hava yolu inflamasyonunun güçlü bir tetikleyicisi olarak IL-1a salınımı ve IL-1R-miyeloid farklılaşması birincil yanıt gen88 sinyalinin aktivasyonu ile hipoksik epitelyal nekrozu tanımlamışlardır. Ayrıca, kistik fibröz ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalardan mukusla tıkanmış hava yollarında nekrotik epitel hücrelerin arttığını göstererek, bakteriyel enfeksiyondan bağımsız olarak nötrofilik inflamasyonun patogenezinde hipoksik epitelyal nekrozun önemli bir rolü olduğunu saptamışlardır.

1.6. MTT

MTT araştırmaları, bir maddenin sitotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amacı ile yapılır. Hücre temelli MTT çalışmaları uygulama kolaylığı, kullanım güvenliği, yüksek tekrarlanabilirliği ve in vivo deneylerden çıkarılan sonuçlar ile uyum göstermesi sebebiyle toksikoloji laboratuvarlarında hem hücre canlılığı hemde sitotoksikite testlerinde sıkça edilmektedir (Reyhaneh, F., 2016).

1.7. Çalışmanın Amacı

Günümüzde antibiyotik tedavisi, bakteriyel hastalıkların tedavisinde halen en sık başvurulan yöntemdir. Antibiyotik kullanımının getirdiği en büyük sakıncalardan biri dirençliliklerdir. Antibiyotik direncine karşı piyasaya yeni antibiyotik türevleri girmekte ve kullanım sahası bulmaktadır. Marbofloksasin özellikle solunum sistemi, meme hastalıkları için piyasaya sürülmüş florokinolon türevlerinden bir tanesidir. Florokinolon antibiyotikler üstün farmakokinetik özelliklere sahiptirler ve

marbofloksasin bronkoalveoler dokuya iyi geçer. Amerika Birleşik Devletleri'nde sadece kedi ve köpek için kullanım alanı bulsa da, Avrupa ülkelerinde ve ülkemizde sığırdaki kullanılan preparatları vardır. Solunum yolu hastalıklarına oldukça duyarlı olan sığırlarda bakteriyel hastalıklarda antibiyotik kullanımı önem arz eder. Birlikte ilaç kullanımının hastalıkların tedavi süreçlerine yardımcı olduğu bilinmektedir. N-asetilsistein solunum yolu hastalıklarında balgam söktürücü olarak kullanılan ayrıca antioksidan etkisi olduğu bilinen bir maddedir. Ucuz kolay ulaşılabilir oldukça güvenli bir ilaçtır. Yapılan literatür taramalarında marbofloksasin ve N-asetilsisteinin birlikte sığır trakea epitel hücre kültüründe etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı marbofloksasin ve N-asetilsisteinin birlikte kullanılmasının sığır trakea epitel hücreleri üzerine etkisini araştırmaktır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan İlaç ve Kimyasal Maddeler

- Marbofloksasinin, (\geq %98 Saflık; Sigma), DMSO'da çözdürüldü.
- N-Asetilsistein (Sigma), distile suda çözdürüldü
- 1X Tripsin (%0,25), EDTA (%0,05) B solüsyonu (Biological industries, 03-052-1A),
- % 1 penisilin/sStreptomisin Çözeltisi (Penisillin G Sodyum tuzu:10000 Units/ML, Streptomisin Sülfat 10mg/ML, Biological industries, 03-031-1b),
- Fötal sığır serumu (Biological industries, 04-007-1A),
- Dimetilsülfoksid (DMSO) (Sigma),
- 1X Triton(%0,25),EDTA(%0,05) B Solusyonu, Biological Industries BP151-500
- İzopropanol (Sigma),
- MTT (4,5-Dimetiltiyazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolyum, Bromür (Ambresco-Life Science),
- PBS (Phosphate buffer saline, 7.4 pH, 1X), Biological Industries 02-023-1A10010-13
- Fötal Sığır Serumu (FBS), Gibco 10500-064
- PBS (Phosphate buffer saline, 7.4 pH, 1X), Biological Industries 02-023-1A10010-13
- % 1 penisilin/streptomisin çözeltisi (Penisillin GSodyum Tuzu:10000 units/ml, Streptomisin Sülfat 10mg/ml), Biological Industries 03-031-1B
- DMEM (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium 4.5g/L D-Glucose, L-Glutamine (+) Pyruvate, Biological Industries 01-052-1A

2.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

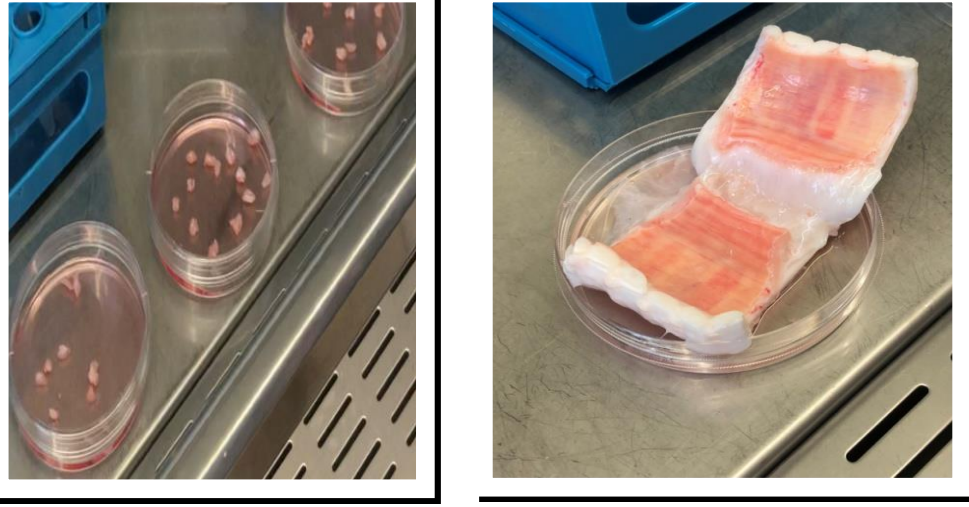
- Otoklav (Nüve OT 23B- Türkiye)
- Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İldam, Türkiye)
- İverted mikroskop (Leica DM6000B, Almanya)
- Otoklav (Nüve OT 23B- Türkiye)
- Vortex (Heidolph- Reax top, Almanya)
- Hücre Kültürü Flaskları (25, 75'lik), Sarstedt
- 96 kuyucuklu hücre kültürü plakası, Sarstedt
- Kriyotüp (Hücre Kültürü için), Sarstedt
- Hemositometri (İnvitrogen-Countess, USA)
- Pipet ucu (10-200 µl'lik sarı ve 100-1000 µl'lik mavi), Italian Spa
- Ependorf tüp (1.5 ml), Lp Italiana
- Steril filtre (0.22 µm), MS®PES Syringe Filte
- Steril Falkon Tüpler (15-50 ml) NEST Scientific
- 48 Kuyucuklu plate (Corning, ABD)
- Filtreli Pipet Uçlar, Sarstedt
- Maske Yerli
- Steril Santrifüj Tüpü (Corning, ABD)
- Nitril Eldiven Yerli
- Laminar Akımlı Kabin Holten.1,8
- 37°C %5 CO2'li Etüv Nüve
- JuLi Hücre Mikroskobu NanoEntek
- SpectraMax i3 Spektrofotometre Molecular Devices (USA)
- Mikropipet 25µL Eppendorf
- Mikropipet 10µL Eppendorf
- Mikropipet 1µL Eppendorf
- Mikropipet 1000µl Eppendorf
- Mikropipet 100µl Eppendorf
- Mikropipet 25µl Eppendorf

2.3. Hücre Kültürü İzolasyonu

Çalışmada Ankara ili sınırları içindeki yerel bir mezbahanedeki kesilen 12-36 aylık, erkek Simental ırkı sığırlardan steril tekniklerle alınan trakeaların üst kısmındaki 1/4lük bölgesi kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarında 3 adet Simental erkek sığır trakeasından alınan epitel dokulardan primer hücreler üretildi.

Steril pens ve makas ile çıkartılan trakea önce %1 batikon-serum fizyolojik solüsyonuna batırıldı, hemen sonrasında da serum fizyolojik içine batırıldı, ve ardından içinde serum fizyolojik solüsyonu bulunan steril cam fanusa aktarıldı. Bu steril fanus, polistiren kutuda buz kasetleri (0 °C) ile birlikte Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda bulunan hücre kültürü laboratuvarına ulaştırıldı. Trakea epitel doku örnekleri; laminar akışlı kabinde antibiyotikli PBS ile yıkandıktan sonra, petrilere konularak steril pens ve bistüri yardımı ile bağ dokusu parçalarından ayrıldı ve steril petri kutularının içine bırakıldı. Trakea epitel dokusundan; epitel hücrelerini izole etmek için örnekler steril bistüri makas ve pens yardımı ile mekanik olarak kazınarak çok küçük parçalara bölündü. Daha sonra bu parçalar; 25 cm²'lik kültür flasklarına yerleştirildi ve üzerine 3 µg/mL besiyeri (%79 DMEM-F2, %20 fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin) ilave edilip etüvde (%5 CO₂/hava, 37°C ve >%90 nem) inkübe edilmek üzere yerleştirildi. Sığır trakeası ve epitel doku parçalarının üzerine besi yeri ilave edilmesi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Birer saat arayla mikroskopta incelenen hücrelerin artarak çoğaldığı gözlemlendi. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. Besi yeri konulduktan 2 saat sonra sığır epitel hücrelerin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Sığır trakeası ve epitel doku parçalarının üzerine besi yeri ilave edilmesi



Şekil 2.2. Besi yeri konulduktan 2 saat sonra sığır epitel hücrelerin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri.

2.4. Sitotoksosite Testi (MTT)

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), hücre canlılığı metabolik aktivite ölçümlerinin elde edilmesine dayanan bir testtir. Test malzemesinin, hücre kültürlerindeki hücre çoğalma derecesi ve hücrelerin morfolojik

nitelikleri üzerinde oluşan etkisinin kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği yöntemdir (Oya, 2020). Tüm sitotoksosite testlerinde, test sisteminin toksik olmayan bir ortam, steril ve tekrar tekrar yapılabilir olması önemlidir.

MTT testi için 96 kuyucuklu plate kullanıldı. Hücre kültürü izolasyonu kısmında anlatıldığı üzere hücreler üretildi. Sığır trakea epitel hücreleri; Juli br hücre sayımı kullanılarak hesaplanan hücreler, her kuyucukta 1×10^5 hücre (100 μ L) olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'e ekildiği saptandı. Hücreler, etüvde (%5 CO₂/hava, 37oC ve >%90 nem) inkübe edildi. Bu inkübasyon sonunda, 96 kuyucuklu platede bulunan hücre vasatları döküldü. 0.1 ve 1 mM N-asetilsistein derişimleri (Mata vd., 2017) üç tekrarlı olacak şekilde belirlenmiş olan hücre kuyucuklarının üzerine uygulandı. Etüve yerleştirildi ve 2 saat inkübe edildi. Hücre kültüründe maksimum ulaşılan dmsö konsantrasyonu % 0.5'dir. Bu DMSO ile daha önceden çözdürölüp %99,5 besi yeri ile sulandırılmaları yapılan 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/ML marbofloksasin dozları (Lidia vd., 2013) hem tek başına hem de N-asetilsistein ile inkübe edilmiş kuyucuklar üzerine uygulandı. Pozitif kontrol grubu olarak; bir kısım hücre kuyucukları üzerine medium uygulaması, negatif kontrol grubu olarak 1 x Triton-X uygulaması yapıldı. Ayrıca da bir kısım kuyucuğa marbofloksasin sulandırılmalarına benzer şekilde hazırlanmış DMSO derişimleri uygulandı. Hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 96 kuyucuklu platede bulunan hücre vasatları atılıp, kuyucuklara 25 μ L MTT (1 mg MTT kit ürünü 1 mL Fenol Red'siz besi yerinde çözdürüldü) çözeltisi eklendi. Hücreler, etüvde (%5 CO₂/hava, 37oC ve >%90 nem) 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 96 kuyucuklu platede bulunan hücre vasatları atılıp, 100 μ L DMSO eklendi ve 96 kuyucuklu plate ışıktan korumalı hale getirilerek 30 dk boyunca vorteksde karıştırıldı. Sonra spectraMax i3 spektrofotometre cihazında 570 nm dalga buyunda okutuldu.

Sitotoksosite değerlendirilmesi ise numune uygulanan hücrelerdeki sitotoksosite % olarak ifade edildi ve uygulanmayan, %100 canlı kabul edilen PK grubu (Maksimal Viabilite, Max V) ile %0 canlı kabul edilen, Triton-X uygulanan NK grubuna (Minimal Viabilite, Min V) göre Sitotoksosite (%) = $[1 - (\text{test} - \text{MinV}) / (\text{MaxV} - \text{MinV})] \times 100$ formülü ile hesaplandı (Ulukaya vd., 2008).Bu hesaplamadan sonra %50 inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerlendirilmesi yapıldı.

2.5. İkili Boyama

İkili boyamada Hoechst ve propodium iodide (PI) boyları kullanılmaktadır. Hücre çekirdeğinin boyanması ile apoptoz ve nekroz hücreleri belirlenir (Çiftçi vd, 2013). Hoechst boyası ile normal hücrelerin çekirdeği DNA' ya bağlanarak hücre çekirdiğine mavi renk verir; apoptoza uğrayan hücreler ise parlak olmaları, çekirdek sınırlarının bozulmasıyla ayırt edilir yani apoptoza maruz kalan hücreler, çekirdeklerinin nükleer parçalanması ve kromatin yoğunlaşmasından dolayı morfolojik değişikliğe uğrar (Çiftçi vd, 2013). Florasan bir boya olan PI boyası ise plazma membran bütünlüğü olmayan nekrotik hücrelerin hücre zarını geçtiği için çekirdeklerinikırmızıya boyarken, normal hücrelerin zarını geçemediği için boyayamaz (Çiftçi vd, 2013).

İkili boyama için Kırıkkale ili sınırları içindeki bir mezbahaneden yine Simental ırkı erkek sığırdan trakea alındı ve Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezine getirilen trakea epitel dokusu yine hücre izolasyonu kısmında anlatıldığı gibi hücreler üretildi ve 24 saat etüvde inkübe edildi. Sığır trakea epitel hücreleri; hemositometri cihazına yerleştirilip hücre sayımı yapıldıktan sonra, her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde 48 kuyucuklu plate'e ekildi. 0.1 ve 1 mM N-asetilsistein derişimleri (Mata vd., 2017) üç tekrarlı olacak şekilde belirlenmiş olan hücre kuyucuklarının üzerine uygulandı. Etüve yerleştirildi ve 2 saat inkübe edildi. Daha önceden DMSO ile çözdürölüp %99,5 besi yeri ile sulandırılmaları yapılan 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ marbofloksasin dozları (Lidia vd., 2013) hem tek başına hem de N-asetilsistein ile inkübe edilmiş kuyucuklar üzerine uygulandı. Pozitif kontrol grubu olarak; bir kısım hücre kuyucukları üzerine medium uygulaması yapıldı. Negatif kontrol grubu olarak medium ve DMSO birlikte uygulandı. 48 kuyucuklu platedeki kuyucuklarda bulunan hücre vasatları atılıp, 70 μL ikili boyama solüsyonu (2 mg/mL Hoechst 33342, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ribonükleaz A, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propodium iodid) eklendi. İkili boyama solüsyonu eklenen plate ışıktan tam korumalı hale getirildi ve yine etüvde 15 dakika inkübe edildi. Etüvde inkübe edilen platenin bu 15 dakikalık inkübasyon sonunda; inverted mikroskopta, DAPI filtresi uygulanarak apoptoza uğrayan hücreler ve FITC filtresi (480-520 nm dalga boyunda) uygulanarak nekroza uğrayan hücrelerin değerlendirmesi yapıldı. Öncelikle tüm hücreler sayıldı. Apoptoza uğramış ve nekroza uğramış hücrelerde sayılarak bu sayıların % değerleri hesaplandı.

2.6. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

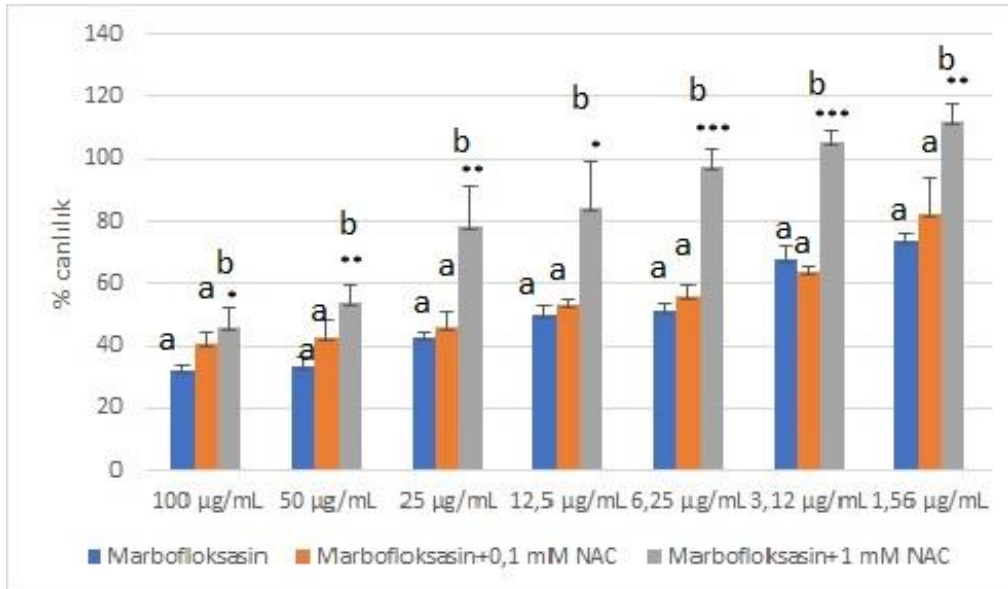
Sitotoksosite için MTT testi; apoptoz ve nekroza uğramış hücrelere ikili boyama yöntemi uygulanmıştır. İkili boyama metodu ve MTT testi en az üç kez tekrarlanarak yapılmıştır.

Sunulan çalışmada %Sitotoksosite Microsoft Excel kullanılarak yapıldı. IC 50 tespiti için test edilen dozların karşılığı olacak yüzde sitotoksosite değerleri ile regresyon eğrisi çizildi. Excel kullanılarak yapılan klasik sigmoid-doz modellemelerine göre en yüksek olan eğri üzerinden IC 50 hesaplaması yapıldı. IC50 değerleri ortalama±standart sapma, elde edilen diğer veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. Sığır trakea epitel hücre kültüründe, marbofloksasin, marbofloksasin + 0.1 mM NAC ve marbofloksasin + 1 mM NAC uygulanan her doz için % canlılık hesaplanmıştır. % canlılıkların karşılaştırılmasında ve ikili boyama yönteminde marbofloksasin, marbofloksasin + 0.1 mM NAC ve marbofloksasin +1mM NAC gruplarının karşılaştırılmasında One Way ANOVA, gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için Duncan testi uygulanmıştır. Yine hücrelerin apoptoz ve nekroz oranları kendi içinde “student t testi” yapılarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde SPSS 15.0 paket programından faydalanılmıştır. $P < 0.05$ değeri önemli olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. MTT Testi Bulguları

Sunulan tez çalışmasında marbofloksasin + 1mM N-asetilsistein uygulanan sığır trakea epitel hücrelerinin, marbofloksasinve marbofloksasin + 0.1 mM N-asetilsistein uygulanan sığır trakea epitel hücrelerine göre % canlılık sonuçlarının, uygulanan her marbofloksasin dozunda istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3.1). 100 µg/mL marbofloksasin dozunda aradaki istatistiksel farkın önemi $P<0.05$ iken 50, 25 ve 1.56 µg/mL uygulanan dozlarda önemlilik $P\leq 0.01$, 6.25 ve 3.12 µg/mL marbofloksasin de ise önemlilik $P<0.001$ olarak bulunmuştur. Sığır trakea hücresinin canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri Şekil 3.2-3-4 de verilmiştir. Sonuç olarak 1 mM NAC inkübasyonu marbofloksasin uygulamasının % canlılığını istatistiksel olarak artırırken, 0,1mM N-asetilsistein istatistiksel olarak marbofloksasin uygulamasının% canlılığı etkilememiştir ($P>0.05$).



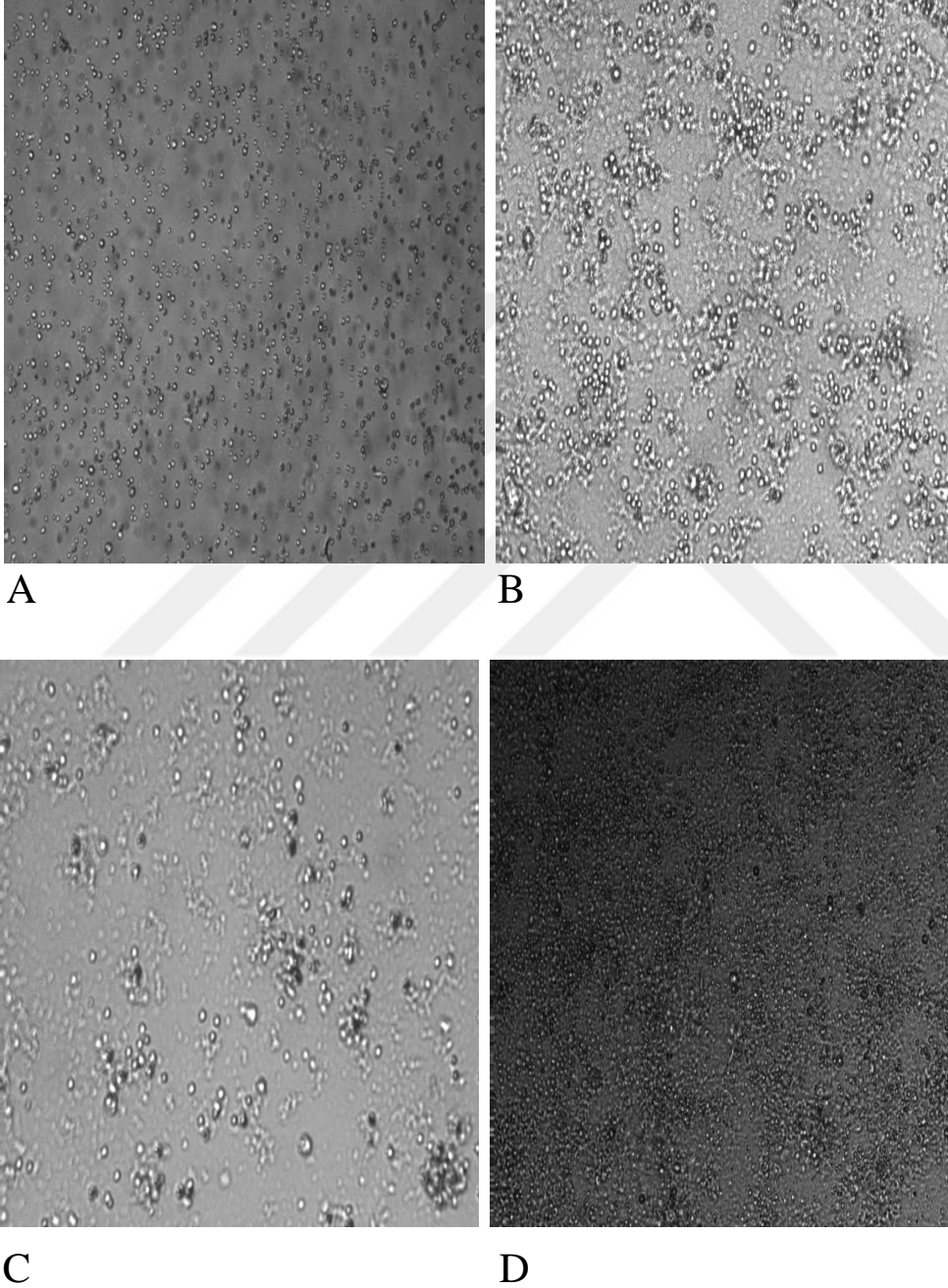
Şekil 3.1. ^{a,b} Farklı harfler arasındaki fark önemlidir

1,56 µg/ml -100 µg/ml arası dozlarda marbofloksasin, marbofloksasin + 0.1mM NAC ve marbofloksasin + 1mM NAC' ın sığır trakeal epitelyum hücrelerine ait % canlılık. *: $P<0.05$, **: $P\leq 0.01$, ***: $P<0.001$

Çizelge 2.1. Sığır trakeasına uygulanan Marbofloksasin ve NAC' ın IC₅₀ sonuçları

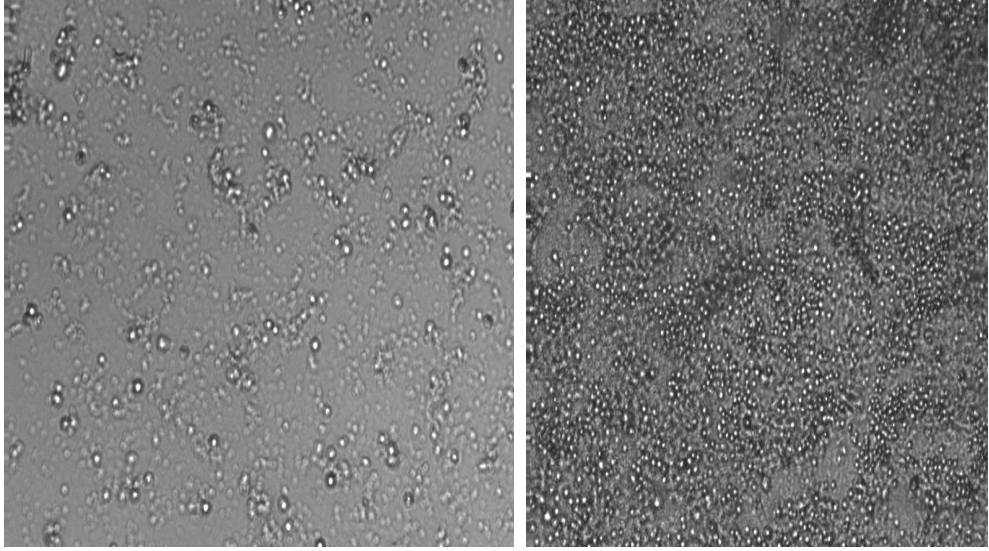
	IC ₅₀
Marb	11,02±0,63
Marb + NAC 0,1mM	17,05±1,35
Marb + NAC 1mM	67,51±0,59

Marb: Marbofloksasin, NAC: N- Asetilsistein, veriler ortalama ±standart sapma şeklinde verilmiştir.



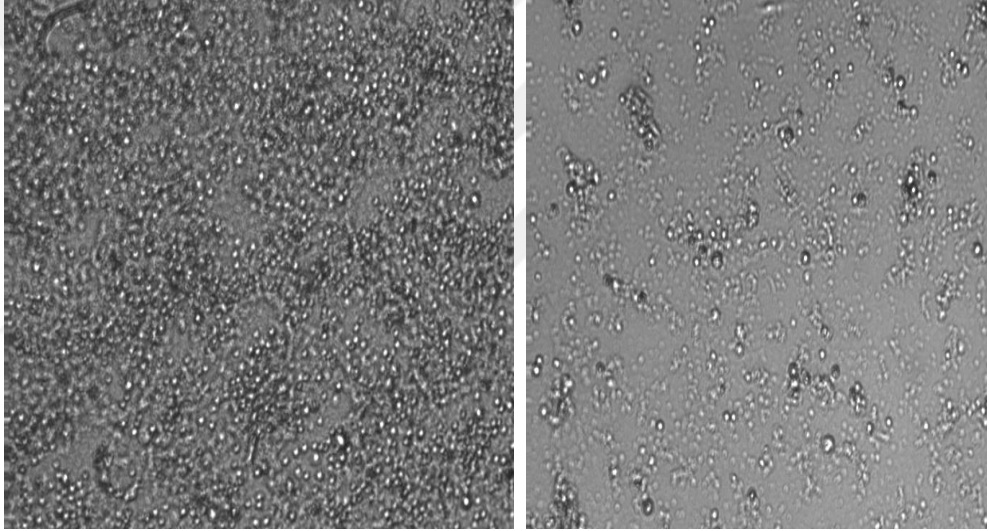
Şekil 3.2. Sığır trakea hücresinin görüntüleri

A.Sığır trakea hücresinin 24 saat inkübasyonunun Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüsü, B. Marbofloksasinin 3,12 µg/mL konsantrasyonunun sığır trakea hücresinin görüntüsü, C. Marbofloksasinin 0,78 µg/mL konsantrasyonunun sığır trakea hücresinin görüntüsü, D.Marbofloksasinin 100 µg/mL konsantrasyonunun sığır trakea hücresinin görüntüsü.



A

B

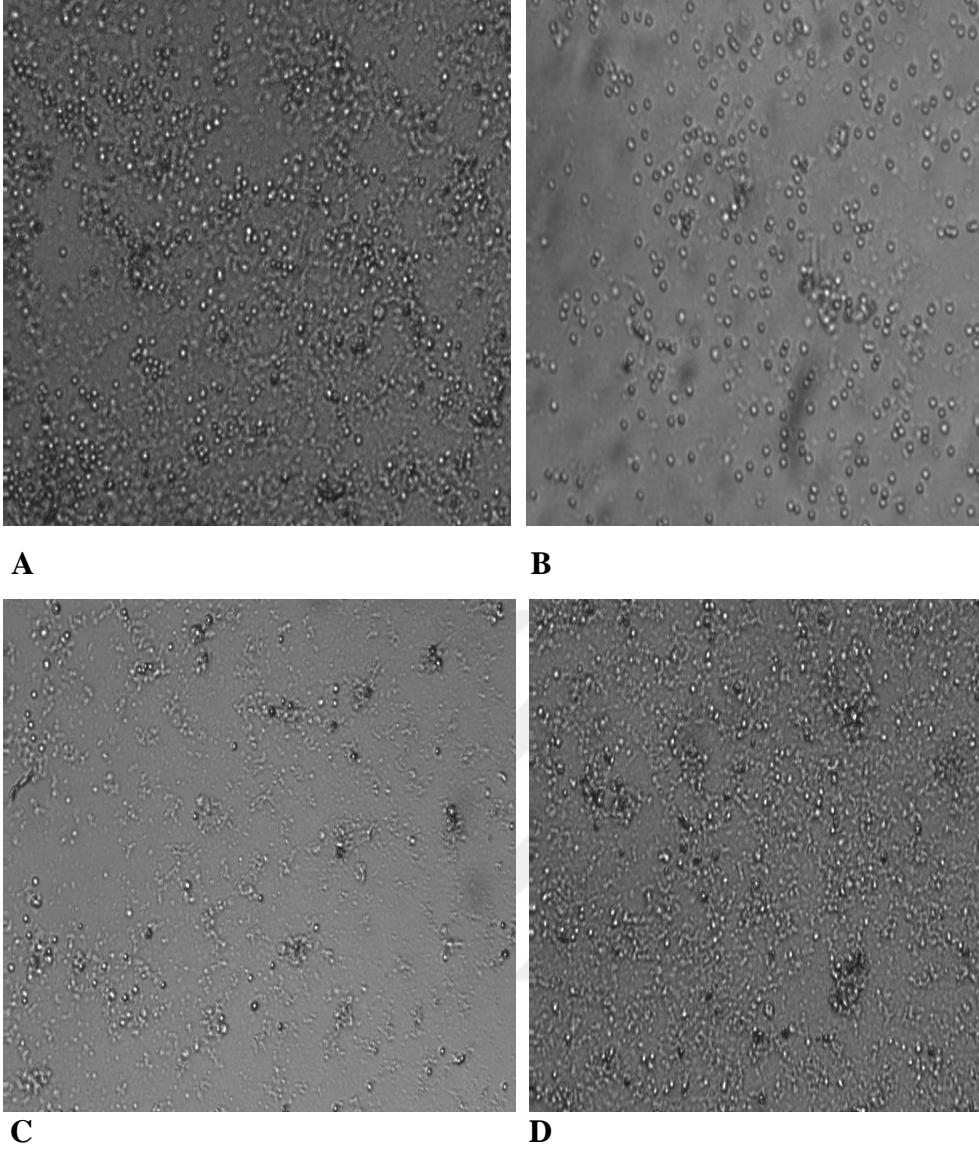


C

D

Şekil 3.3. Marbofloksasin ile N-Asetilsisteinin sığır trakea hücresine etkilerinin görüntüsü

Marbofloksasin ile N-Asetilsistein konsantrasyonlarının birlikte uygulandığı sığır trakea hücresine etkilerinin 24 saat inkübasyonu sonucundaki Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A. Marbofloksasinin 100 µg/mL + NAC 1mM konsantrasyonlarının sığır trakea hücresine etkilerinin görüntüsü, B. Marbofloksasinin 50µg/mL + NAC 0,1mM konsantrasyonlarının sığır trakea hücresine etkilerinin görüntüsü, C. Marbofloksasinin 25µg/mL + NAC 0,1mM konsantrasyonlarının sığır trakea hücresine etkilerinin görüntüsü, D. Marbofloksasinin 50 µg/mL + NAC 0,1mM konsantrasyonlarının sığır trakea hücresine etkilerinin görüntüsü

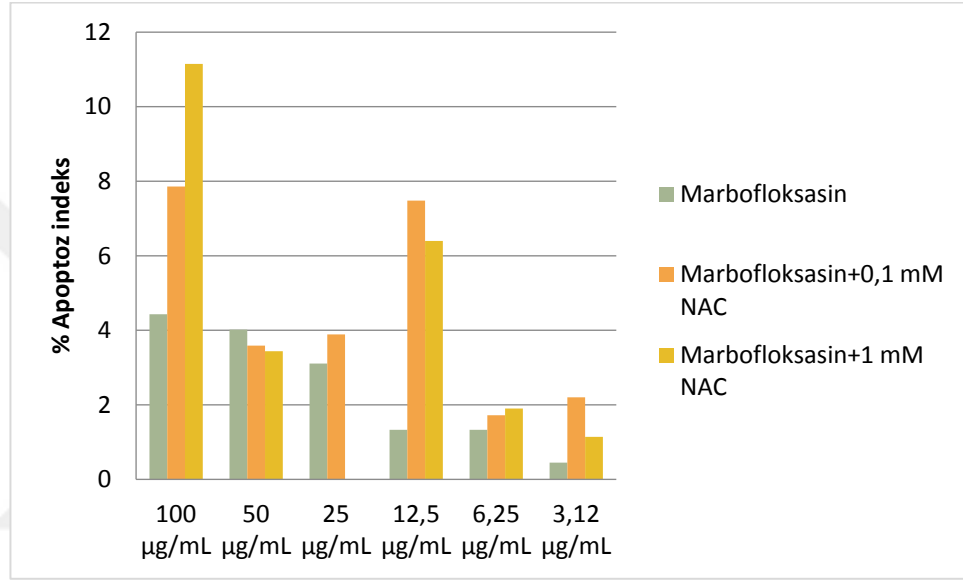


Şekil 3.4. Sığır trakea hücresi PK, DMSO, NAC

A. Sığır trakea hücresi pozitif kontrol Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüsü, B. Sadece DMSO (% 0,5lik konsantrasyonu)'nun uygulandığı sığır trakea hücresine etkisinin görüntüsü, C. N-Asetilsisteinin 0,1mM konsantrasyonunun sığır trakea hücresine etkilerinin 24 saat inkübasyonu sonucundaki görüntüsü, D. N-Asetilsisteinin 1mM konsantrasyonunun sığır trakea hücresine etkisinin 24 saat inkübasyonu sonucundaki görüntüsü

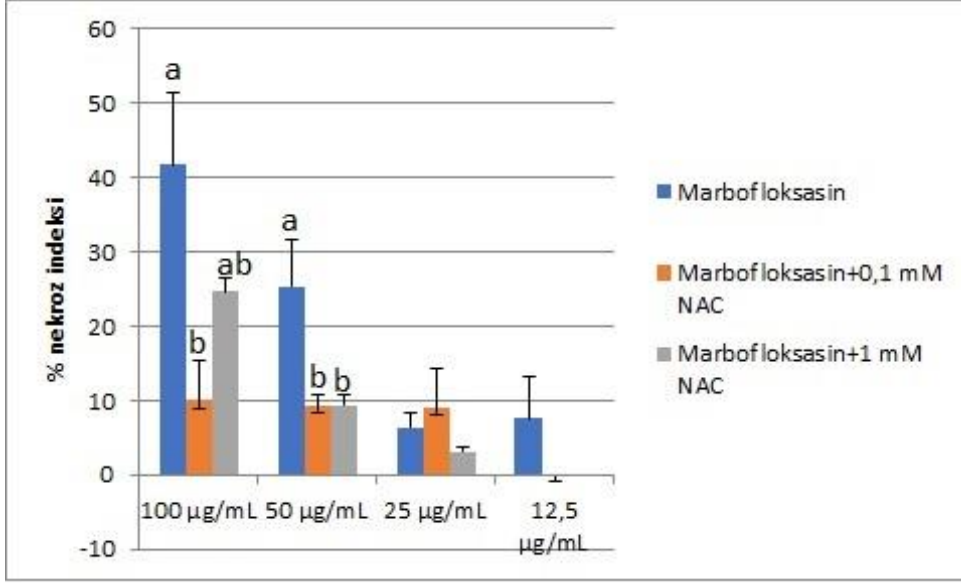
3.2. İkili Boyama Bulguları

Sunulan çalışmada ikili boyama sonuçlarının apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesi her doz kendi arasında karşılaştırılmış ve gruplar (Marbofloksasin, marbofloksasin+0,1 mM NAC ve marbofloksasin+ 1mM NAC) arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Şekil 3.5’de 3,12 $\mu\text{g/mL}$ -100 $\mu\text{g/mL}$ arası dozlarda marbofloksasin, marbofloksasin + 0.1mM NAC ve marbofloksasin + 1mM NAC’ın siğir trakeal epitelyum hücrelerine ait% apoptoz indeksi sunulmuştur.



Şekil 3.5. 3,12 $\mu\text{g/ml}$ -100 $\mu\text{g/ml}$ arası dozlarda marbofloksasin, marbofloksasin + 0.1mM NAC ve marbofloksasin + 1mM NAC’ ın siğir trakeal epitelyum hücrelerine ait % apoptoz indeksi.

Nekroza uğramış hücrelerin yüzdeleri karşılaştırıldığında ise 100 $\mu\text{g/mL}$ marbofloksasin + 0.1 mM NAC istatistiksel olarak ($P<0,05$), 100 $\mu\text{g/mL}$ marbofloksasin + 1 mM NAC ise sayısal olarak nekrotik indeksi 100 $\mu\text{g/mL}$ marbofloksasine göre azaltmıştır. 50 $\mu\text{g/mL}$ marbofloksasin + 0,1 mM NAC ve 50 $\mu\text{g/mL}$ marbofloksasin + 1 mM NAC istatistiksel olarak nekrotik indeksi 50 $\mu\text{g/mL}$ marbofloksasine göre azaltmıştır ($P<0,05$) (Şekil 3.6).



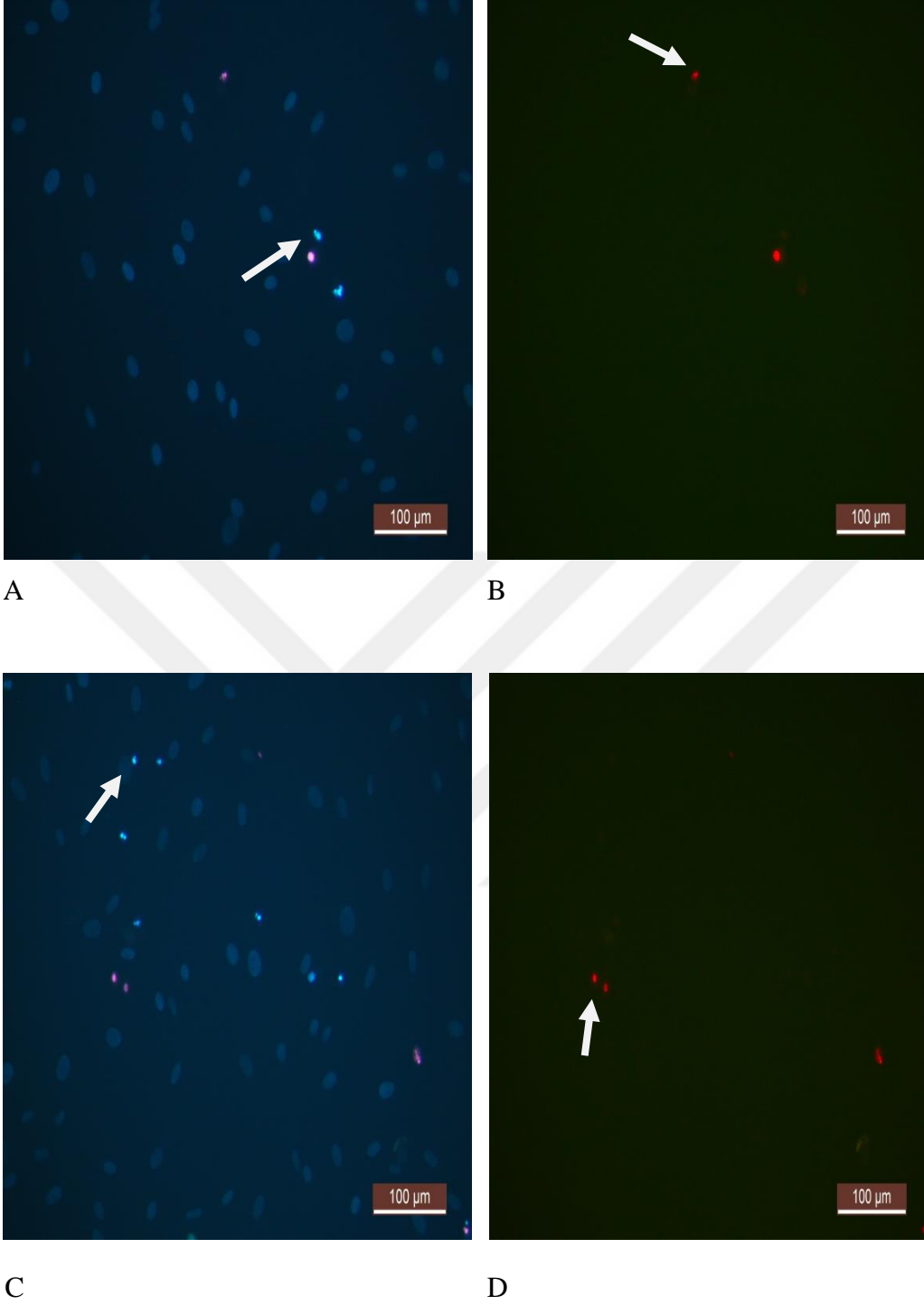
Şekil 3.6. ^{a,b}: Farklı harfler arasındaki fark önemlidir. 12,5 µg/ml -100 µg/mL arası dozlarda marbofloxasin, marbofloxasin + 0.1mM NAC ve marbofloxasin + 1mM NAC' ın sığır trakeal epitel hücrelerine ait % apoptoz indeksi

Marbofloxasin uygulamalarının apoptoz ve nekroz yüzdeleri karşılaştırıldığında 6.25 ve 3.12 µg/mL dozda hücrelerde nekroz olgusuna rastlanmamıştır. 100 ve 50µg/mL marbofloxasin uygulanan sığır trakea hücrelerinde apoptoz ve nekroz yüzde indeksleri arasında istatistiksel olarak nekrozun daha fazla olduğu saptanmıştır (P<0,05). 0.1 ve 1 mM NAC ile beraber 12.5 µg/mL, 6.25 ve 3.12 µg/mL marbofloxasin uygulamasında nekroz olgusuna rastlanmamıştır. Bazı apoptoz ve nekroz hücrelerinin Inverted Microbu ile çekilmiş görüntüleri Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9' de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak marbofloxasin 100µg/mL+NAC 1 mM, marbofloxasin 50µg/mL+ NAC 1 mM, marbofloxasin 25µg/mL+ NAC 1 mM uygulamalarında % nekroz indeksi, % apoptoz indeksinden büyük olarak bulunmuştur (P<0,05). Farklı olarak Marb 12.5 µg/mL+ NAC 1 mM uygulamasında (P<0,05) ve Marb 6.25µg/mL+ NAC 1 mM uygulamasında (P<0,01) % apoptotik indeks nekrotik indeksten istatistiksel olarak büyük olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Sığır trakeasına uygulanan marbofloksasin ve NAC' ın % apoptoz ve nekroz sonuçları

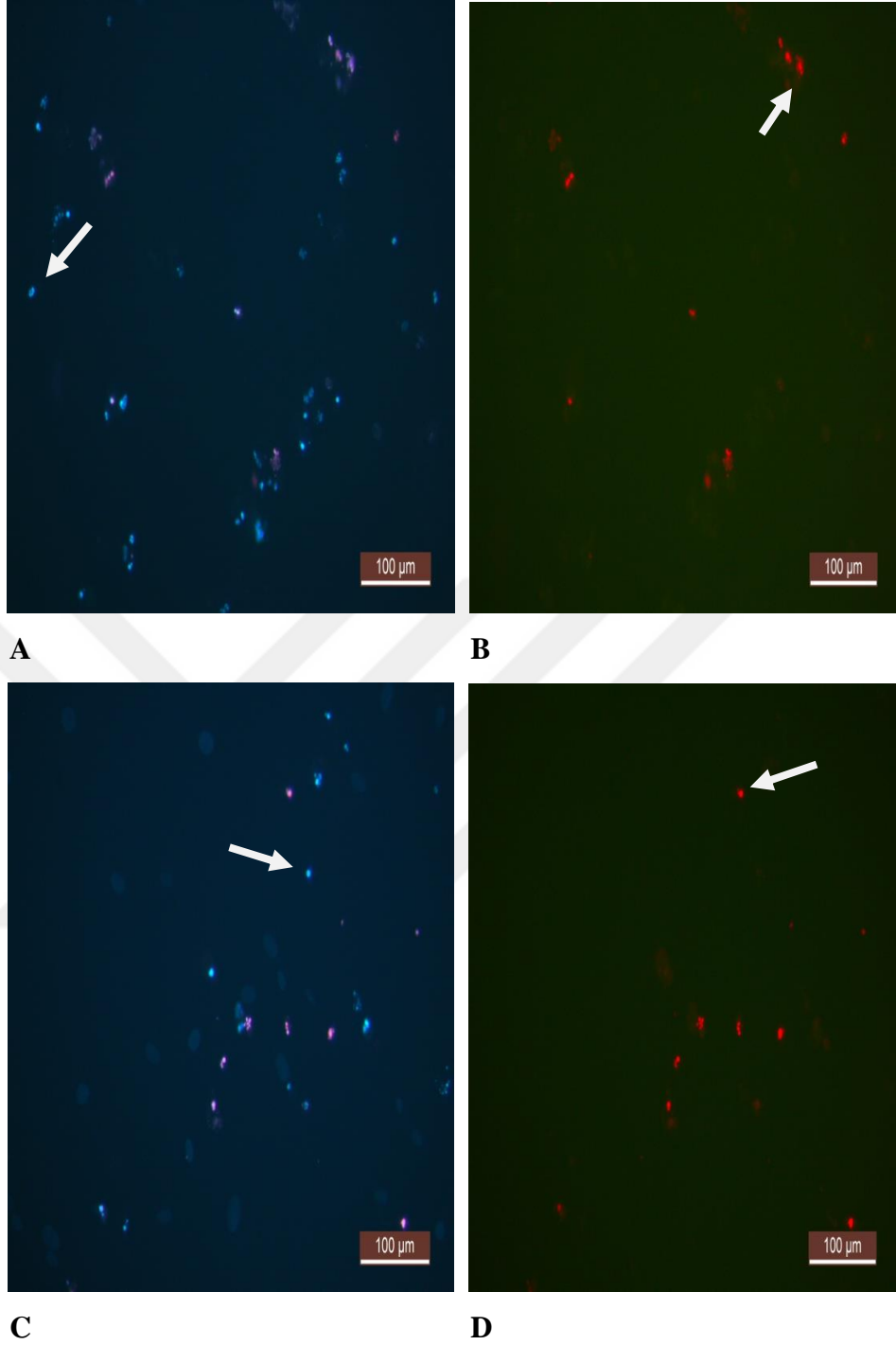
Uygulama	Apoptoz%	Nekroz%
Marb 100µg/mL	4,43±3,15	41,75±9,75*
Marb50µg/mL	4,02±1,28	25,29±6,31*
Marb25µg/mL	3,11±0,59	6,44±1,94
Marb12,5µg/mL	1,33±1,33	7,56±5,53
Marb6,25µg/mL	1,33±0,33	0
Marb 3,12 µg/mL	0,45±0,45	0
NAC 0,1 mM	0,55±0,55	0,55±0,55
NAC 1 mM	0	0
Marb 100µg/mL+ NAC 0,1 mM	7,86±2,81	9,97±5,4
Marb 100µg/mL+NAC 1 mM	11,15±2,57	24,72±1,81**
Marb50µg/mL+ NAC 0,1 mM	3,59±1,60	9,29±1,38
Marb50µg/mL+ NAC 1 mM	3,44±1,07	9,30±1,61*
Marb25µg/mL+ NAC 0,1 mM	3,89±3,02	9,05±5,35
Marb25µg/mL+ NAC 1 mM	0	3,17±0,44*
Marb12,5µg/mL+ NAC0,1 mM	7,48±3,32	0
Marb12,5µg/mL+ NAC 1 mM	6,40±1,68*	0
Marb6,25µg/mL+ NAC0,1 mM	1,72±0,55	0
Marb 6,25µg/mL+ NAC 1 mM	1,90±0,06**	0
Marb 3,12µg/mL+ NAC0,1 mM	2,20±0,78	0
Marb 3,12µg/mL+ NAC 1 mM	1,14±0,59	0
Pozitif Kontrol	100	100
Negatif Kontrol	0,67±0,67	0

Marb: Marbofloksasin, NAC: N Asetilsistein, *:P<0.05, **:P≤0.01 Aynı satırlar arasındaki fark önemlidir.



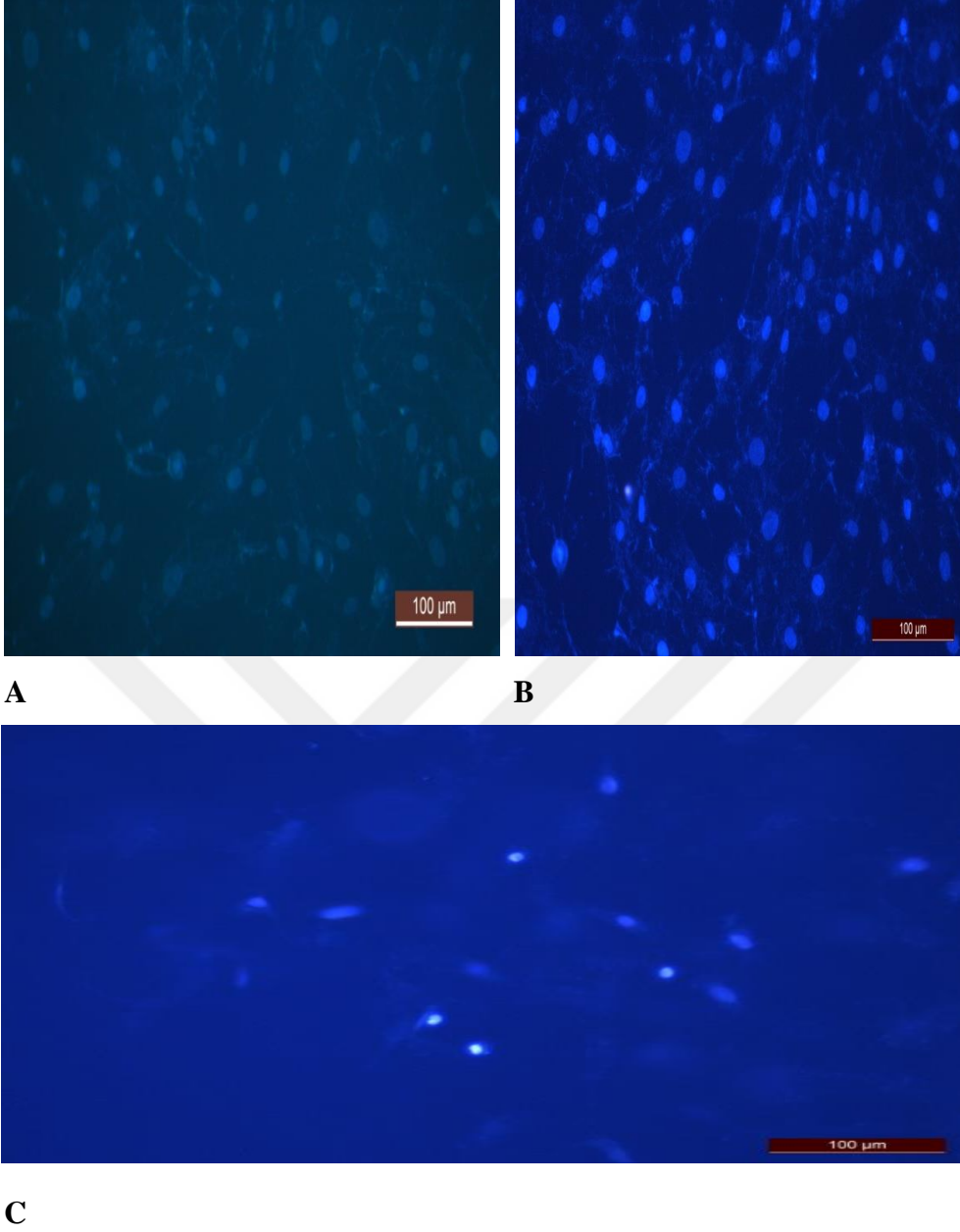
Şekil 3.7. Hoechst ve Propidyum iyodür boyları kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntüleri

Hoechst ve Propidyum iyodür boyları kullanılarak yapılan Marbofloksasin ve N-Asetilsisteinin farklı dozlarının birlikte uygulandıktan sonra ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerinin Leica DM6000 İnvrted Mikroskopta 20X büyütmede çekilmiş görüntüleri verilmiştir. Oklar nekroz ve apoptoza uğramış hücreleri göstermektedir. A. Marbofloksasin 50 µg/mL + NAC 0.1mM dozlarında apoptotik hücrelerin görüntüleri, B. Marbofloksasin 50 µg/mL + NAC 0,1 mM dozlarında nekrotik hücrelerin görüntüleri, C. Marbofloksasin 50 µg/mL + NAC 1 mM dozlarında apoptotik hücrelerin görüntüleri, D. Marbofloksasin 50 µg/mL +NAC 1 mM dozlarında nekrotik hücrelerin görüntüleri.



Şekil 3.8. Hoechst ve Propidyum iyodür boyaarı kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntüleri

Hoechst ve Propidyum iyodür boyaarı kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerinin Leica DM6000 İverted Mikroskopta 20X büyütmede çekilmiş görüntüleri verilmiştir. Oklar nekroz ve apoptoza uğramış sağlıklı hücreleri göstermektedir. A. Marbofloksasine ait 100 µg/mL konsantrasyonda apoptotik hücrelerin görüntüleri, B. Marbofloksasine ait 100 µg/mL konsantrasyonda nekrotik hücrelerin görüntüleri, C. Sığır trakea hücrelerinde Marbofloksasine ait 100 µg/mL konsantrasyonu ile N-Asetilsisteine ait 1mM konsantrasyonunun birlikte uygulandığında apoptotik hücrelerin görüntüleri, D. Marbofloksasine ait 100 µg/mL konsantrasyonu ile N-Asetilsisteine ait 1mM konsantrasyonunun birlikte uygulandığında nekrotik hücrelerin görüntüleri.



Şekil 3.9. Hoechst ve Propidyum iyodür boyaarı kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntüleri

Hoechst ve Propidyum iyodür boyaarı kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen sığır trakea hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücrelerin Leica DM6000 İverted Mikroskopta 20X büyütmede çekilmiş görüntüleri verilmiştir. A. N-Asetilsisteine ait 0,1 mM konsantrasyonunda apoptotik hücrelerin görüntüleri, B. Negatif kontrol grubunda hücrelerin görüntüleri. C. Pozitif kontrol grubunda apoptotik hücrelerin görüntüleri.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında florokinolon grubu bir antibiyotik olan marbofloksasinin, NAC ile birlikte sığır trakea epitel primer hücre kültüründe apoptotik, nekrotik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Beşeri ve veteriner hekimlikte antibiyotik sağaltımının temel amacı hastalık kaynağı olan patojenlerin yok edilmesidir. Bununla birlikte, antimikrobiyal sağaltımda direnç riskinin en aza indirilmesi gerekir. Bu amaçla kullanılan antimikrobiyal maddeler arasında veteriner sahada kullanılan florokinolonlar da bulunmaktadır (Kroemer, Galland, Guerin-Faublee, Giboin, ve Woehrle-Fontaine, 2012). Kinolon grubu antibiyotikler Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerden kaynaklı enfeksiyonların sağaltımında kullanılan geniş etki spektrumlu antibiyotik olmalarının yanında yan etkilerinin kıyasla az olmalarından dolayı sahada sıklıkla kullanılmaktadırlar (Günel ve Erdem, 2014). Florokinolon antibiyotikler doku ve hücrelerde dağılımı iyi olan ilaçlardır. Öyle ki makrofaj ve nötrofillerde hücre içi konsantrasyonları, plazma konsantrasyonlarının 4-10 katı olduğu saptanmıştır (Papich ve Riviere, 2001).

Sığır solunum yolu hastalıkları ve mastitis olguları, dünya çapında sığırlarda antimikrobiyal madde kullanımının iki ana nedenidir. ABD'de antibiyotik tedavisinin en yaygın nedeni solunum yolu hastalıklarıdır (Stokstad vd. 2020). Yapılan bir çalışmada, sığır solunum yolu hastalığı olan 231 sığıra 10 mg/kg marbofloksasin tek doz Kİ uygulamasının sağaltımda etkili ve güvenli olduğu saptanmıştır (Grandemange, Fournel, Giboin, ve Woehrlé, 2012). Hayashi vd., (2012) Kİ 2 mg/kg tek doz marbofloksasinin buzağılarda bronkoalveolar bölgede iyi dağıldığını göstermişlerdir.

Hücre canlılığı, birim numunedeki sağlıklı hücre sayısı olarak tanımlanır. Hücre canlılığının ölçülmesi, tüm hücre kültürü formları için önemlidir (Kamioğlu, Sarı, Özdal ve Çapanoğlu, 2020). Hücrelerin canlılık seviyeleri ve çoğalma oranları, hücre sağlığının indikatörleridir. Fiziksel ve kimyasal maddeler hücre sağlığını ve metabolizmasını etkileyebilir. Bu maddeler hücre zarlarının yıkımı, protein sentezinin engellenmesi, reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma,

polideoksinükleotid uzamasının inhibisyonu, enzimatik reaksiyonlar gibi farklı mekanizmalarla hücrelerde toksisiteye neden olabilir (Aslantürk, 2018). Hücre proliferasyonu hücrelerin bölünmesi sonucu gerçekleşen bir olay olup, proliferasyon hızı kanser gibi bazı hastalıkların tespitinde önemlidir (Terzioğlu, Keskin ve Demirel, 2013).

Enrofloksasin, siprofloksasin, difloksasin, sarafloksasin, danofloksasin, norfloksasin ve marbofloksasinin sitotoksik potansiyelini fare fibroblastları Balb/c 3T3 ve insan hepatoma HepG2 hücre hatları kullanılarak araştıran bir çalışmada; hücreler, 0,78 ila 100 µg/mL arasında değişen sekiz farklı konsantrasyondaki florokinolonlara 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Marbofloksasinin fare fibroblastları Balb/c 3T3 deki MTT sonuçlarına bakıldığında 24 saat sonundaki etkili sitotoksik konsantrasyon (EC)₅₀ değeri 19.6 ± 2.4 µg/mL, 48 saat sonunda 16.2 ± 7.4 µg/mL, 72 saat sonra ise 8.2 ± 1.1 µg/mL olarak saptanmıştır. İnsan hepatoma HepG2 hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmada ise 24 ve 48 saat sonunda EC₅₀ değeri saptanamamış 72 saat sonunda ise bu değer 85.0 ± 8.2 µg/mL olarak bulunmuştur (Lidia, Maria ve Sylwia, 2013). Ferreira, Myiagi, Nogales, Campos ve Lage-Marques (2010) insan dişeti fibroblast hücre kültüründe farklı inkübasyon zamanlarının (24, 48, 72 ve 96 saat)ve konsantrasyonlarda (5, 50, 150 ve 300 mg/L) siprofloksasin, klindamisin ve metronidazolün etkilerini değerlendirmek için MTT testi ile sitotoksik etkiyi çalışmış ve sitotoksik etkinin doza bağımlı olduğunu ve hücre canlılığının ilk 24 saate en yüksek olduğunu göstermişlerdir. Sunulan tez çalışmasında ise 24 saat sonunda marbofloksasin inhibitör konsantrasyonunun (IC)₅₀ marbofloksasin için 11,02±0,63 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak hücre canlılığı doza bağımlılık göstermiştir. Holtom vd. (1999) MC3T3-E1 osteoblast benzeri hücre kültüründe levofloksasin, siprofloksasin ve travafloksasin florokinolonların büyüme ve hücre dışı matris minerilazasyonu üzerine inhibitör etkilerini araştırmışlar ve levofloksasinin 48 ve 72 saatte IC₅₀ değeri 80 µg/mL, siprofloksasin için 40 µg/mL, travofloksasinin ise 0,5 µg/mL olarak bulunmuştur. Siprofloksasinin beş farklı hücre hattı üzerindeki antikanser etkisini kontrol etmek için yapılan bir araştırmada siprofloksasin 10-1000 µg/mL doz aralığında insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı A549, insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2, insan ve fare melanom hattı (A375.S2 ve B16) ve sıçan glioblastoma hattı C6 üzerinde denenmiştir. MTT testi sonucunda

siprofloksasin, konsantrasyona ve zamana bağılı bir şekilde A549 hücrelerinin morfolojik değişikliklerine ve canlılığının azalmasına neden olmuştur. A375.S2 ve B16 hücre hatlarında siprofloksasinin sitotoksitesi gözlemlenmiştir, ancak A375.S2 ve B16 kültürlerinden tüm hücreleri yok edilememiştir. HepG2 hattı siprofloksasine duyarlı bulunmuş, ancak bu etki konsantrasyon ve inkübasyon süresinden bağımsız olarak gelişmiştir. C6 hücreleri siprofloksasine duyarsız olarak saptanmıştır (Kloskowski vd., 2011). Bu çalışmalar, hücre kültürü farklılıklarının, inkübasyon zamanı konsantrasyon ve madde farklılıklarının da hücre canlılığı üzerinde farklı sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir.

Hava yolu epitel hücrelerinde apoptoz, LPS'ye veya alerjen maruziyetine yanıtta majör yaralanmalara bağılı olarak ortaya çıkabilecek hava yolu epitelindeki hiperplastik değişikliklerden sonra hücre sayılarını azaltmada işlev gören önemli bir mekanizmadır (Tesfaigzi, 2006). Marbofloksasinin iyileştirici etkisi, Leishmania infantum promastigotları ve köpek monosit türevli makrofajların varlığında in vitro olarak değerlendiren bir çalışmada Leishmania promastigotlarının ve hücre içi amastigotların marbofloksasin tarafından öldürülmesinin doza bağımlı olduğu gözlemlenmiştir. 500 µg/mL marbofloksasin ile köpeklerle enfekte makrofajların 48 saat boyunca başarılı tedavisinin mümkün olduğunu saptanmıştır. Çalışmada marbofloksasinin in vitro olarak enfekte makrofajlarda 500 µg/mL'de toksik olmadığı ve hiçbir hücre apoptoz oluşturmadığı saptanmıştır (Vouldoukis vd. 2006). Sunulan çalışmada ise 3.12 - 100 µg/mL marbofloksasin uygulamalarında (100 µg/mL'de % 4.43±3.15) apoptoz oluşumu gözlenmiştir. Deneysel hücre kültürünün farklı olması, inkübasyon süresi (24 saat) ve pasajlamadaki farklılıkların bu sonuçlardaki farklılığa neden olabileceği düşünülmüştür. Tümör nekroz faktörü/reseptörünün (TNF/TNFR1) sinyal yolunun marbofloksasin kaynaklı kondrositlerin erken apoptozunda yer alıp almadığını araştırmak için köpek juvenil kondrositleri 0, 20, 50 ve 100 µg/mL marbofloksasin ile tedavi eden bir çalışmada kondrositlerin 2, 8 ve 24 saatteki apoptoz oranlarının konsantrasyona ve zamana bağılı bir şekilde önemli ölçüde arttığını göstermiştir. 20–100 µg/mL marbofloksasin ile tedavi edilen köpek kondrositlerinde TNF/TNFR1 sinyal yollarındaki apoptoz ile ilişkili faktörlerin mRNA seviyeleri ve TNFα ve TNFR1 protein seviyeleri artarken TNFR1 gen susturma kondrosit apoptozunu önemli ölçüde azaltmış, 8 saatte 100 µg/mL

marbofloksasin tedavisinden sonra TNF/TNFR1 aşağı akış sinyal moleküllerinin mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği saptanmıştır (Li vd., 2019).

Birhanu, Park, Lee, Hossain ve Park (2018), Caco-2 and RAW 264.7 hücrelerinde metil gallatın tek başına veya marbofloksasinin ile kombinasyon halinde konakçı hücrelerde bakteri tutunmasını, girişini ve hücre içi sağkalımını önlemede in vitro etkileri olduğunu bildirmişlerdir.

Sistein ön ilacı NAC farmakolojik bir antioksidan ve hücre koruyucu olarak çok yaygın kullanılmaktadır. NAC'dan türetilen sisteinin hidrojen sülfür üretmek için kükürttten arındırıldığını ve bunun da ağırlıklı olarak mitokondri içinde sülfan kükürt türlerine oksitlendiğini gösteren bir çalışmada, 3-merkaptopiruvat kükürttransferaz ve sülfid:kinon oksidoredüktaz tarafından üretilen sülfan kükürt türlerinin, NAC tarafından oluşturulan antioksidatif ve hücre koruyucu etkilerin gerçek araçları olma olasılığını gösteren kanıtlar sunulmuştur (Ezeriņa, Takano, Hanaoka, Urano ve Dick, 2018). Hava yolu enfeksiyonlarında biyofilm oluşumu hem akut hem de kronik olaylarda rastlanır ve sistemik antibiyotiklerle eradike edilmesindeki zorluktan dolayı başka ilaçların kullanılması yararlı olabilir. İn vitro çalışmalar NAC'ın iyi antibakteriyel özelliklere ve biyofilm oluşumuna müdahale etme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir (Blasi vd., 2016). Son ve Bae (2021) otitis eksternalı köpeklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı farklı antimikrobiyal maddelerle NAC'ın in vitro sinerjistik etkinliğini değerlendirmiş ve NAC tek başına antimikrobiyal ve antibiyofilm yetenekleri gösterse bile NAC ve enrofloksasin, polimiksin B ve gentamisin antibiyotiklerin kombinasyonu, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı önemli bir sinerjistik etki göstermediğini belirtmiştir. Kolistin ve NAC'ı *Stenotrophomonas maltophilia*'a karşı kullanan bir çalışmada NAC'ın kolistin direnci geliştirme mekanizmasını önleyerek sinerjizma oluşturduğunu göstermişlerdir (Ciacci vd., 2019). Bu çalışmalar NAC'ın antibiyotiklerle birlikte kullanımının antibiyotik çeşidine bağlı olarak farklı etkinliklere yol açtığını işaret etmektedir.

Sunulan tez çalışmasında 1mM NAC marbofloksasinde % canlılığı tek başına marbofloksasin kullanımına göre arttırmıştır. Ayrıca NAC'ın tek başına 0.1 mM uygulanmasında %0.55 nekroz, %0.55 apoptoz, 1mM ise ne apoptoz ne de nekroz olgusuna rastlanılmamıştır. 100µg/mL marbofloksasin + 0.1 mM NAC istatistiksel olarak 100 µg/mL marbofloksasin + 1 mM NAC ise sayısal olarak nekrotik indeksi

100 µg/mL marbofloksasine göre azaltmıştır. 50 µg/ml marbofloksasin + 0,1 mM NAC ve 50 µg/mL marbofloksasin + 1 mM NAC istatistiksel olarak nekrotik indeksi 50 µg/mL marbofloksasine göre azaltmıştır. Antibiyotiklerle NAC'ın beraber kullanımı ile farklı görüşlerden yola çıkılarak yapılan bir çalışmada NAC farklı antibiyotiklerin aktivitesi üzerindeki modüle edici etkisi, *Pseudomonas aeruginosa*'da incelenmiştir. Araştırmacılar raporların aksine, yalnızca imipenem aktivitesinin NAC'den açıkça etkilendiğini belirtmişlerdir (Rodríguez-Beltrána vd., 2015). Teskey vd (2018), NAC tedavisinin hiperaktif hücresel yangıyı durduğu ve TNF-α seviyelerini modüle ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar NAC/GSH takviyesinin, sitokin modülasyonu yoluyla *Mycoplasma tuberculosis*'e doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerine yardımcı olabileceğini vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda bakteriyel etkinlik denenmemiştir ancak NAC ve marbofloksasin beraber trakea epitelinde hücre canlılığını artırarak faydalı olabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir.

Sonuç olarak antibiyotikler profilaktik, cerrahi öncesi ve sonrası ya da bakteriyel nedenli hastalıklarda kullanım yeri bulan çok önemli bir ilaç grubudur. Bu grup içinde geniş spektrumlu olması ile daha çok tercih edilen florokinolon grubu antibiyotikler ve birçok sentetik türevi veteriner hekimlikte ve beşeri hekimlikte sık sık kullanılan ilaçlardır. Marbofloksasin florokinolon grubu bir antibiyotik olup, solunum yolu enfeksiyonlarında veteriner pratikte kullanılmakta olan bir ilaçtır.

Akılcı ilaç kullanımı, hem ekonomik hem de tedavi yönünden çok önemli başarılar sağlamaktadır. Kombine ilaç kullanımı ile sinerjizma, yan etkilerin azaltılması ve hastanın hastalığı rahat ve kolay atlatması sağlanabilmektedir. Özellikle NAC ile antibiyotiklerin beraber kullanılmasının getireceği sonuçları doğru saptamak klinikte başarılı tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Sunulan tez çalışmasında marbofloksasin ile NAC'ın beraber kullanılması hücre canlılığını artırmıştır. Bunun yanı sıra nekroz olgusunun da azalmasına kısmen yardımcı olmuştur. Bu sonuçlar marbofloksasin ve NAC'ın beraber kullanımının oldukça faydalı olduğunu işaret etmektedir.

Marbofloksasin ve NAC'ın beraber kullanılmasında oluşturacağı etkinin bakteri popülasyonuna etkisinin de ayrıca değerlendirilmesi, in vitro çalışmalar yanında in vivo çalışmalarla da sonuçların desteklenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahab WM, Moussa FI, Saad NA. (2017). Synergistic protective effect of N-acetylcysteine and taurine against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Des Devel Ther.* 20;11:901-908.
- Aiyer, A.; Visser, S.K.; Bye, P.; Britton, W.J.; Whiteley, G.S.; Glasbey, T.; Kriel, F.H.; Farrell, J.; Das, T.; Manos, J. (2021). Effect of N-Acetylcysteine in Combination with Antibiotics on the Biofilms of Three Cystic Fibrosis Pathogens of Emerging Importance. *Antibiotics*, 10, 1176.
- Aliabadi, F.S. ve Lees, P. (2002). Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *J Vet Pharmacol Ther.*;25(3):161-74.
- Anonim (2022a). Fluoroquinolone. İndirilme: www.chemspider.com. İndirilme tarihi: 30.06.2022.
- Anonim (2022b). N Acetylcysteine. <https://www.selleckchem.com>. İndirilme tarihi: 28.06.2022.
- Aslantürk, Ö.S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, Genotoxicity- A predictable Risk to our Actual World, Ed. M. Larramendy, Intech Open, London, p: 1-17.
- Reyhaneh, F., Batul, H., Nader Ale İ., Sekaran. M., (2016). Sitotoksosite ve kanserin 35 yıllık araştırma tarihi: Kantitatif ve kalitatif bir analiz. *Asya Pac J Kanser Önceki*.2016;17(7):3139-45. ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27509942 sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123918604000033
- Atalay, F. , Odabasoglu, F., Halici, M (2016). N-Acetylcysteine Has Both Gastro-Protective And Anti Inflammatory Effects İn Experimental Rat Models: Its Gastro-Protective Effect İs Related to its İn Vivo and İn Vitro Antioxidant Properties. *J Cell Biochem.* 117(2): 308-319.
- Baggio, D. ve Ananda-Rajah, M.R. (2021). Fluoroquinolone antibiotics and adverse events. *Aust Prescr.*,44(5):161-164.
- Baskerville, A. (1981). Mechanisms of infection in the respiratory tract. *N Z Vet J.*;29(12):235-8.
- Beckmann, J., Takizawa, H., Romberger, D., Illig, M., Claassen, L., K. Rickard, K., Rennard, S. (1991). Serum-Free Culture Of Fractionated Bovine Bronchial Epithelial Cells, *Invitro Cell Dev Biol*, 28a: 39-46.
- Belew S, Kim JY, Hossain MA, Park JY, Lee SJ, Park YS, Suh JW, Kim JC, Park SC. (2015). Pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Hanwoo, Korean native cattle. *J Vet Med Sci.* 77(3):327-9.

- Bernard, G.R. (1991). N-Acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. , 91(3-suppl-S3), 0-. doi:10.1016/0002-9343(91)90284-5
- Birhanu, B.T., Park, N.H., Lee, S.J. Hossain A ve Park SC (2018). Inhibition of *Salmonella* Typhimurium adhesion, invasion, and intracellular survival via treatment with methyl gallate alone and in combination with marbofloxacin. *Vet Res* **49**, 101.
- Blasi, F., Clive Page C., Rossolini G.M., Pallecchi L., Matera M. G., Rogliani P., Cazzola M (2016). The effect of N-acetylcysteine on biofilms: Implications for the treatment of respiratory tract infections. *Respiratory Medicine* 117, 190e197.
- Brar, R.K., Jyoti, U., Patil, R.K. ve Patil, H.C. (2020). Fluoroquinolone antibiotics: An overview. *Adesh Univ J Med Sci Res*;2(1):26-30.
- Coşkun, D. ; Dik, B. ; Korkmaz, Y. ; Canbar, R. ; Er, A. ; Yazar, E. (2019). Marbofloksasinin kardiyotoksik etkilerinin araştırılması. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 35,,2,,56-61
- Ciacci, N., Boncompagni, S., Valzano, F., Cariani, L., Aliberti, S., Blasi, F., Pollini, S., Rossolini, G.M., ve Pallecchi. L. (2019). In Vitro Synergism of Colistin and N-acetylcysteine against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antibiotics* (Basel). 25;8(3):101.
- Dawit, A., Solomon, E. ve Abay, M. (2020). N-Acetyl Cysteine as an Adjunct in the Treatment of Tuberculosis. *Tuberculosis Research and Treatment*, vol. 2020, Article ID 5907839, 11 pages.
- De Flora, S., Agostini, F.D., Masiello, L., Giunciuglio, D. and Albini, A. (1996), Synergism between N-acetylcysteine and doxorubicin in the prevention of tumorigenicity and metastasis in murine models. *Int. J. Cancer*, 67: 842-848.
- Denney, L ve Ho L-P. (2018). The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection, *Biomedical Journal*,41, 4, 218-233,
- Diamond, G., Jones, D.E. ve Bevins, C.L. (1993). Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;90(10):4596-600.
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W.L. ve Bevins, C.L. (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1;88(9):3952-6.
- Ezeriņa D, Takano Y, Hanaoka K, Urano Y, Dick TP. (2018). N-Acetyl Cysteine Functions as a Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H₂S and Sulfane Sulfur Production. *Cell Chem Biol*. 19;25(4):447-459.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.01.011.
- FAAST (2022). Bovine respiratory diseases in feedlots. İndirilme: What is Causing Bovine Respiratory Disease? - Farmed Animal Antimicrobial Stewardship Initiative Blog Archive » Farmed Animal Antimicrobial Stewardship Initiative (amstewardship.ca) İndirilme tarihi: 29.06.2022.
- Ferreira, M.B., Myiagi, S., Nogales, C.G., Campos, M.S., ve Lage-Marques, J.L. (2010). Time- and concentration-dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. *J Appl Oral Sci*.;18(3):259-63.

- Feray A, Orhan Ç, Duygu D. Ç, Kamil Ü, (2018) . Farklı dozlardaki marbofloksasinin koyunlarda biyokimyasal ve hematolojik parametreler üzerine etkileri, Eurasian J Vet Sci,2018,34,2,71-76
- Fink SL, Cookson BT. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.*;73(4):1907-16.
- Fritzsching, B., Zhou-Suckow, Z., Trojanek, J.B., Schubert, S.C., Schatterny, J., Hirtz, S., Agrawal, R., Muley, T., Kahn, N., Sticht, C., Gunkel, N., Welte, T., Randell, S.H., L ¨anger, F., Schnabel, P., Herth, F.J.F., ve Mall, M.A (2015). Hypoxic Epithelial Necrosis Triggers Neutrophilic Inflammation via IL-1 Receptor Signaling in Cystic Fibrosis Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191, 8, 902-913.
- Grandemange, E. ; Fournel, S. ; Giboin, H. ; Woehrlé, F. Efficacy of a single injection of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2012 Vol.163 No.6 pp.287-294
- Gnal, E., Erdem H. (2014). Kinolonlar. *İç Hastalıkları Dergisi*, 21: 69-85.
- Hayashi J, Otomaru K, Hirata M, Ishikawa S, Ikedo T, Horinouchi C, Kuramae T, Tsumagari K, Hobo S. (2019). Distribution of marbofloxacin in the bronchoalveolar region in healthy calves. *J Vet Med Sci*. 81(5):730-733.
- Hayashi J, Otomaru K, Hirata M, Ishikawa S, Ikedo T, Horinouchi C, Kuramae T, Tsumagari K, Hobo S. (2019). Distribution of marbofloxacin in the bronchoalveolar region in healthy calves. *J Vet Med Sci*. 31;81(5):730-733. doi: 10.1292/jvms.18-0761.
- Holtom, P.D., Pavkovic, S.A., Bravos, P.D., Patzakis, M.J., Shepherd, L.E., Frenkel, B. (2000). Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin on osteoblastic cells in vitro. *J Orthop Res*. 18(5):721-7.
- Ijiri, M., Ishikawa, S., Jibiki, Y., Miyazawa, M., Senokuchi, A. ve Hobo. S. (2020). Distribution of marbofloxacin within the bronchoalveolar region of healthy pigs. *J Vet Med Sci*. 19;82(8):1080-1083.
- Llambas, J., Potter, T., Cheng, Z., Rycroft, A., Fishwick, J. ve Lees, P. (2013). Pharmacodynamics of marbofloxacin for calf pneumonia pathogens. *Res Vet Sci.*;94(3):675-81.
- Kacar, Y., Batmaz, H., Yılmaz, Ö.E. ve Mecitoğlu, Z. (2018). Comparing clinical effects of marbofloxacin and gamithromycin in goat kids with pneumonia. *J S Afr Vet Assoc.*,20;89(0):e1-e5.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays, *Food Frontiers*, 1:332–349.
- Kelly, G.S. 1998. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alt Med Rev*. 3 (2) 114-127 Kennedy, R., Rosa, S. 2000. N-Acetyl-L-Cysteine .www.medicallibrary.net/content/view/138/45
- Khalid, N ve Azimpouran, M. (2022). Necrosis. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. İndirilme: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>

- Kloskowski, T., Gurtowska, N., Nowak, M., Joachimiak, R., Bajek, A., Olkowska, J. ve Drewa T (2011). The influence of ciprofloxacin on viability of A549, HepG2, A375.S2, B16 and C6 cell lines in vitro. *Acta Pol Pharm.* 68(6):859-65.
- Kroemer, S., Galland, D., Guerin-Fauble, V., Giboin, H., ve Woehrle-Fontaine, F. (2012). Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Veterinary Record*, 170, 53.
- Landini G, Di Maggio T, Sergio F, Docquier JD, Rossolini GM, Pallecchi L. (2016). Effect of High N-Acetylcysteine Concentrations on Antibiotic Activity against a Large Collection of Respiratory Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 21;60(12):7513-7517.
- Li, Q., Ding, Y., Gao, Y., Zhang, F., Zhu, H. Ve Ding, M. (2019). Effects of TNFR1 gene silencing on early apoptosis of marbofloxacin-treated chondrocytes from juvenile dogs, *Toxicology*, 422, 53-59
- Li, WQ., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell MolLife Sci.*; 60: 6-20.
- Lidia R, Maria M, T.Sylwia S. (2013). Influence Of Fluoroquinolones On Viability Of balb/C 3t3 And Hepg2 Cells. *Bull Vet Inst Pulawy*, 57, 599-606.
- Manoharan, A., Das, T., Whiteley, G.S., Glasbey, T., Kriel, F.H., Manos, J. (2020). The effect of N-acetylcysteine in a combined antibiofilm treatment against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75, 7, 1787–1798,
- Maraq, N.F. (2021). Bronchiolitis. İndirilme: <https://emedicine.medscape.com>
İndirilme tarihi: 28.06.2022
- Martin TR, Hagimoto N, Nakamura M, Matute-Bello G. (2005). Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(3):214-20.
- Mata, M., Sarrion, I., Armengot, M., Carda, C., Martinez, I., Melero, J., Cortijo, J. (2017). Respiratory Syncytial Virus Inhibits Ciliogenesis In Differentiated Normal Human Bronchial Epithelial Cells: Effectiveness Of N-Acetylcysteine. *Plosone*.(10):E48037.
- Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician* 2009;80:265-269.
- Moldeus, P. ve Cotgreave IA (1994). N-Acetylcysteine. In: *Methods in Enzymology*. Vol: 234, Academic Press, p. 482-492
- Mosier, D. (2014). Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Anim. Health Res. Rev.* 15(2):166-168.
- National Center for Biotechnology Information (2022a). PubChem Compound Summary for CID 60651, Marbofloxacin. İndirilme

- tarihi:30.Haziran.2022from,https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Marbofloxacin.
- National Center for Biotechnology Information (2022b). PubChem Compound Summary for CID 12035, Acetylcysteine. İndirilme Tarihi Haziran28,2022İndirilme:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetylcysteine.
- Oya A, (2020) T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Danışman Pedodonti Anabilim Dalı Pedodonti Programı, İstanbul
- Panawala L (2017). Difference between apoptosis and necrosis. İndirilme: <http://pediaa.com/differencebetweenapoptosisandnecrosis> İndirilme Tarihi: 28.06.2022.
- Papich, M.G. (2021). Marbofloxacin. In Papich Handbook of Veterinary Drugs %th Ediyion), Ed: Papich M.G.,W.B. Saunders,2021, s.: 548-550,
- Papich, MG ve Riviere JE (2001). Fluoroquilone antimicrobial drugs. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Ed. Adams, HR, Blackwell Publishing,Iowa,s.: 898-946.
- Perry, S.M., ve Mitchell M.A. (2019). Antibiotic Therapy,Editor(s): Stephen J. Divers, Scott J. Stahl,Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery (Third Edition),W.B. Saunders, s.: 1139-1154.e2
- Pollini, S., Boncompagni, S., Di Maggio, T., Di Pilato, V., Spanu,T., Fiori, B. Blasi, F., Aliberti, S., Sergio, F., Maria Rossolini, G., ve Lucia Pallecchi, L. (2018). In vitro synergism of colistin in combination with N-acetylcysteine against *Acinetobacter baumannii* grown in planktonic phase and in biofilms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, 9, 2388–2395,
- Rodríguez-Beltrána, J., Cabot, G., Valenciaa, EY, Costasa,C, German Boud, G., Antonio Oliver A., ve Jesús Blázquez, J(2015). N-Acetylcysteine Selectively Antagonizes the Activity of Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* by an OprD-Mediated Mechanism, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 6, 3246-3251
- Sauler, M., Bazan, I.S. ve Lee, P.J. (2019). Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. *Annu Rev Physiol*. 10;81:375-402.
- Schneider M, Vallé M, Woehrlé F, Boisramé B. (2004). Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administrations and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. *J Dairy Sci*. 87(1):202-11. doi:
- Schwalfenberg GK. N-Acetylcysteine: A Review of Clinical Usefulness (an Old Drug with New Tricks). *J Nutr Metab*. 2021 Jun 9;2021:9949453. doi: 10.1155/2021/9949453. PMID: 34221501; PMCID: PMC8211525.
- Skoufos, J.,Christodoulopoulos, G., Fragkou, I. A., Tzora, A., Gougoulis, D.A., Orfanou, D. C., Tsiolaki, K. ve G.C. Fthenakis, G.C. (2007). Efficacy of marbofloxacin against respiratory infections of lambs, *Small Ruminant Research*, 71, 1–3.
- Son, Y., ve Bae, S. (2021, June 30). In vitro efficacy of N-acetylcysteine in combination with antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* in canine otitis externa. *Korean Journal of Veterinary Research*. The Korean

- Stanton, R (2020). Protect your respiratory tract during winter season. Life Extension, Winter 2020-2021 Edition, 46-55.
- Stokstad, M., Klem, T.B., Myrme³, M., OmaVS, Toftaker, I., ØsteråsO. and Ane NødtvedtN. (2020). Using Biosecurity Measures to Combat Respiratory Disease in Cattle: The Norwegian Control Program for Bovine Respiratory Syncytial Virus and Bovine Coronavirus Front. Vet. Sci.,<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00167>
- Syntichaki, P ve Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos EMBO Rep;3(7):604-9.
- Taha S, (2018). ‘Sıçan İnfirior Epigastrik Ada Flebi Venöz İskemi Modelinde Pentoksifilin ve N-Asetilsistein’in Tek ve Birlikte Kullanılarak İskemik Hasarın Değerlendirilmesi’ T. Cİstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Estetik Cerrahi ABD, İstanbul.
- Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü., Yanıkkaya Demirel, G.(2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli TicariProliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. Turk J Immunol, 1(3):74-89.
- Tesfaigzi Y. (2006). Roles of apoptosis in airway epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol. 34(5):537-47. doi: 10.1165/rcmb.2006-0014OC.
- Teskey G.,Cao,R., Islamoglu H., Medina,A., Prasad, C., Prasad, R., Sathananthan, A., Fraix, M., Subbian, S., Zhong, L., Venketaraman,V. (2018). The Synergistic Effects of the Glutathione Precursor, NAC and First-Line Antibiotics in the Granulomatous Response Against Mycobacterium tuberculosis. Frontiers in Immunology, 9, 1664-3224
- Thomas, E. ; Madelenat, A. ; Davot, J. L. ; Boisrame, B. Efficacité et innocuité comparées de la marbofloxacin et de l'oxytétracycline dans le traitement des maladies respiratoires des jeunes bovins. Recueil de Médecine Vétérinaire 1998 Vol.174 No.1/2 pp.21-27 ref.31
- Thomas, E., Caldow, G. L., Borell, D., Davot, J. L. (2001). A field comparison of the efficacy and tolerance of marbofoxacin in the treatment of bovine respiratory disease. J. vet. Pharmacol. Therap. 24, 353±358
- Veit, H.P. ve Farrell, R.L. (1978). The anatomy and physiology of the bovine respiratory system relating to pulmonary disease. Cornell Vet. 68(4):555-81
- Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrlé F (2006). Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. Veterinary Parasitology, 135 (2): 137-146.
- Ulukaya, E., Özdikicioğlu, F., Yıldıztepe Oral, A. ve Demirci, M. (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. Toxicology in Vitro. 22: 232-239.<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.08.006>.
- White S. R. (2011). Apoptosis and the airway epithelium. J Allergy (Cairo). 2011;2011:948406. doi: 10.1155/2011/948406.

Yaşar Ş. (2020). Sığırlarda Tulatromisin Ve Gamitromisinin Trakea Düz Kas Kasılması İle Trakea Epitel Hücreleri Üzerine Apoptotik, Nekrotik Ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması.” Türkiye Cumhuriyeti, Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.

Yıldız, C. (2020) “Endometrium kanser hücre kültüründe bevacizumab (vegf monoklonal antikoru) adlı maddenin tek başına ve klasik kemoterapötiklerle kombine etkilerinin incelenmesi” T.C Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta uzmanlık tezi, Eskişehir

Zafarullah, M., Li, W., Sylvester, J. Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 60, 6–20 (2003). <https://doi.org/10.1007/s000180300001>

Zandwijk, W. N. N-acetyl cysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. J Cell Biochem Suppl. 1995, 22: 24-32.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı :
Soyadı :
Doğum yeri ve tarihi :
Uyruğu :
Medeni durum :
E-mail :
İletişim :

II. Eğitim :

III. Ünvanlar :

IV. Mesleki Deneyim :

V. Üye Olduğu Bilimsel Kurumlar :

VI. Bilimsel İlgi Alanları :

VII. Bilimsel Etkinlikler :

Aldığı burslar :

Projeler :

Seminerler :

Yayınlar : Işık, C. (2022). Hemşireler Arası İletişimde Sorunlar ve Çözüm Odaklı Yaklaşım. Ghiasee, A. Editör. Sağlık Yönetiminde İletişim. 1. Baskı. 2022. p.85-96. (Kitap Bölümü