



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARINA
ALFA LİPOİK ASİDİN ETKİLERİ**

Nigar GARAYEVA

DANIŞMAN

Doç. Dr. İsmet Burcu TÜRKİYILMAZ MUTLU

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya (F.B.E), Tezli Yüksek Lisans Programı

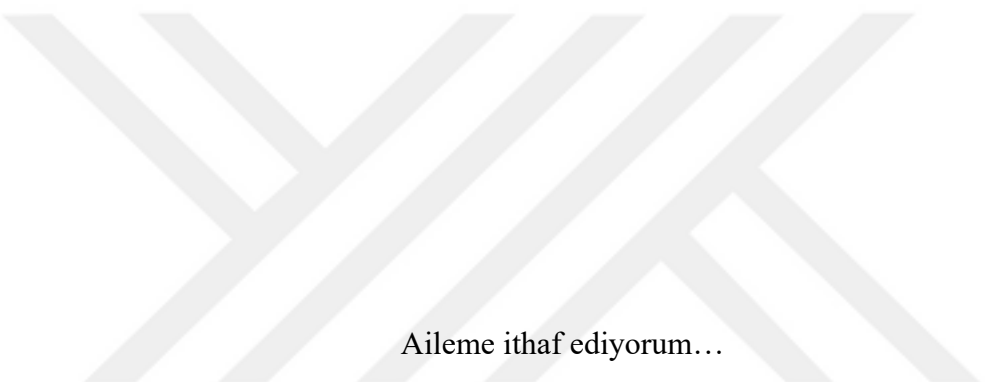
Haziran, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Nigar GARAYEVA tarafından, **Doç. Dr. İsmet Burcu TÜRKYILMAZ MUTLU** danışmanlığında hazırlanan "**Sıçanlarda Valproik Asit ile Oluşturulan Böbrek Hasarına Alfa Lipoik Asidin Etkileri**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **24/06/2024** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Doç. Dr. İsmet Burcu	☒
	TÜRKYILMAZ MUTLU	Kabul
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	☐
	Kimya Anabilim Dalı	Ret
ÜYE	Prof. Dr. Özlem SAÇAN	☒
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	Kabul
	Kimya Anabilim Dalı	☐
		Ret
ÜYE	Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL	☒
	Yıldız Teknik Üniversitesi	Kabul
	Kimya Anabilim Dalı	☐
		Ret



Aileme ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARINA ALFA LİPOİK ASİDİN ETKİLERİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 37344

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım esnasında destek ve emeklerini esirgemeyen, beni yüreklendiren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli danışmanım Doç. Dr. İ. Burcu TÜRKYILMAZ MUTLU'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve birikimi ile her zaman yol gösteren, çok değerli hocam Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, gösterdiği hoşgörü, ilgi ve destek için kıymetli hocam Prof. Dr. Özlem SAÇAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca her zaman ilgi, desteğini esirgemeyen, paylaştıkları bilgi ve deneyimlerden ötürü kıymetli hocalarım Prof. Dr. Sevim TUNALI, Doç. Dr. Bertan Boran BAYRAK, Dr. Öğretim Üyesi Onur ERTİK ve Araş. Gör. Dr. Eda DAĞSUYU'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni destekleyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Çalışmamın deneysel kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Haziran 2024

Nigar GARAYEVA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	3
2.1. BÖBREK	3
2.1.1. Böbrek Mitokondrisinde Homeostazi	4
2.1.2. Mitokondriyal Antioksidan Sistem	5
2.1.3. Böbrek Rahatsızlıkları.....	6
2.2. VALPROİK ASİT	8
2.2.1. Valproik Asit Hakkında Genel Bilgiler.....	8
2.2.2. Terapötik ve Toksik Etkileri Olan Valproik Asit Metabolitleri.....	8
2.2.3. Valproik Asit ile Oluşturulan Toksisite ve Böbrek Üzerindeki Etkileri	13
2.3. OKSİDATİF STRES, BİYOLOJİK SİSTEMLERDE SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR.....	14
2.3.1. Oksidatif Stres	14
2.3.2. Biyolojik Sistemlerdeki Serbest Radikallerin Endojen ve Eksojen Kaynakları	14
2.3.3. Antioksidanlar	15
2.4. ALFA LİPOİK ASİT	15
2.4.1. Alfa Lipoik Asit'in Farmakolojik Özellikleri	16
3. YÖNTEM	19

3.1. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	19
3.2. DENEYLERDE KULLANILAN LABORATUVAR CİHAZLARI	20
3.3. DENEY PROSEDÜRÜ	20
3.4. BÖBREK DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI.....	21
3.4.1. Doku Homojenizatu Hazırlanması.....	21
3.4.2. Miyeloperoksidaz Aktivite Tayini İçin Doku Homojenizatu Hazırlanması	22
3.5. BÖBREK DOKU HOMOJENİZATLARINDA YAPILAN BİYOKİMYASAL PARAMETRELER.....	22
3.6. İNDİRGENMİŞ GLUTATYON TAYİNİ.....	22
3.7. LİPİT PEROKSİDASYONU MİKTARI TAYİNİ.....	23
3.8. KATALAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	24
3.9. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	25
3.10. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ	26
3.11. GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ	27
3.12. GLUTATYON-S-TRANSFERAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ	27
3.13. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ TAYİNİ.....	28
3.14. TOTAL OKSİDAN SEVİYELERİ TAYİNİ.....	29
3.15. İLERİ OKSİDE PROTEİN ÜRÜNLERİ TAYİNİ.....	29
3.16. ARGİNAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	30
3.17. MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ	31
3.18. GLİKOPROTEİN MİKTAR TAYİNLERİ	32
3.18.1. Glikoprotein Miktar Tayinleri İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması	32
3.18.2. Fukoz Miktar Tayini.....	32
3.18.3. Heksoz ve Heksozamin Miktar Tayini.....	33
3.19. KSANTİN OKSİDAZ AKTİVİTE TAYİNİ	34
3.20. SODYUM POTASYUM ATPaz AKTİVİTESİ TAYİNİ	35
3.21. KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	36
3.22. TOTAL PROTEİN TAYİNİ.....	36
3.23. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	37
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR.....	51
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	63
ETİK KURUL İZİN YAZISI	64

KURUM İZNİ YAZILARI.....	65
ÖZGEÇMİŞ	66



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Böbrek dokusunda temel birim olan nefron ve detaylı yapısı	3
Şekil 2.2: Böbrek dokusunda mitokondri homeostazisinin devamlılığı için mPTP'nin düzenlenmesi	4
Şekil 2.3: Mitokondriyal antioksidan sistem ve oksidatif fosforilasyon	6
Şekil 2.4: VPA'nın açık formülü	8
Şekil 2.5: VPA'nın metabolitlerinin terapötik özellik gösterdiği yerler	9
Şekil 2.6: VPA'nın toksik etki gösteren metabolitlerinin meydana getirdiği bazı klinik etkiler	11
Şekil 2.7: ALA ve aktif formu olan dihidrolipoik asit ve ALA'nın izomerleri	15
Şekil 4.1: Tüm deney gruplarına ait böbrek GSH ve LPO değerleri	38
Şekil 4.2: Tüm deney gruplarına ait böbrek CAT ve SOD aktiviteleri	39
Şekil 4.3: Tüm deney gruplarına ait böbrek GPx, GR ve GST aktivite değerleri	39
Şekil 4.4: Tüm deney gruplarına ait böbrek ROT ve TOS değerleri	40
Şekil 4.5: Tüm deney gruplarına ait böbrek AOPP seviyeleri ile arginaz ve MPO aktiviteleri	41
Şekil 4.6: Tüm deney gruplarına ait böbrek fukoz, heksoz ve heksozamin değerleri	42
Şekil 4.7: Tüm deney gruplarına ait böbrek XO, Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz ve CA aktiviteleri	43

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Serum, plazma ve idrarda tespit edilen ve terapötik etkileri olan VPA metabolitleri	10
Tablo 2.2: Serum, plazma ve idrarda tespit edilen ve toksik etkileri olan VPA metabolitleri	12
Tablo 3.1: Kontrol ve deney gruplarına ait deney prosedürü	21

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

M	: Molarite
mL/μL	: Mililitre/Mikrolitre
U/L (mL)	: Enzim ünite birimi
w/v	: Ağırlık/Hacim

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

ALA	: Alfa lipoik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
AOPP	: İleri okside protein ürünleri (advanced oxidized protein product)
CA	: Karbonik anhidraz
CAT	: Katalaz
CoA	: Koenzim A
DCF	: 2',7'-dikloroflorescein
ETS	: Elektron transport sistemi
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
HDAC	: Histon deasetilaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low density lipoprotein)
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehid
mPTP	: Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenağı (mitochondrial permeability transition pore)
MPO	: Miyeloperoksidaz
Na⁺/K⁺-ATPaz	: Sodyum potasyum ATPaz
NAD⁺/NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit (Yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları)
Nf-kB	: Nükleer faktör kappa B
NOS	: Nitrik oksit sentaz

ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyoarbütirik asit
TOS	: Total oksidan seviyesi
VPA	: Valproik asit



ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[SIÇANLARDA VALPROİK ASİT İLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARINA ALFA LİPOİK ASİDİN ETKİLERİ]

[Nigar GARAYEVA]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya (F.B.E), Tezli Yüksek Lisans Programı

[Danışman : Doç. Dr. İsmet Burcu TÜRKYILMAZ MUTLU]

[Valproik asit (VPA) kısa zincirli bir yağ asididir ve epilepsi, migren ve bipolar rahatsızlıkların tedavilerinde etkili olarak kullanılmaktadır. VPA'nın uzun süreli kullanımı, ilacın serbest radikal oluşturma özelliğinden dolayı tehlikelidir. Böbrekler, VPA tedavisi süresince en çok etkilenen organlardan biridir. Alfa lipoik asit (ALA), doğal olarak bulunan bir antioksidan maddedir ve hem suda hem lipitte çözünebilir olması bu maddeyi çok güçlü bir antioksidan yapmaktadır. Bu çalışmada, VPA ile oluşturulan böbrek hasarına karşı ALA'nın koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Sprague-Dawley sıçanlar dört gruba ayrıldı. Grup I; kontrol grubu, Grup II; ALA verilen grup (50 mg/kg, oral yolla), Grup III; VPA verilen grup (500 mg/kg, intraperitoneal yolla), Grup IV; VPA+ALA verilen grup (aynı süre ve dozlarda). Deneysel prosedür 15 gün boyunca uygulandı. 16. gün, tüm hayvanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Böbrek dokuları alındı ve soğuk fizyolojik su ile homojenize edildi. Örnekler santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlarda, VPA uygulanması sonrasında indirgenmiş glutatyon seviyeleri ile antioksidan enzim aktiviteleri, sodyum potasyum ATPaz ve karbonik anhidraz aktivitelerinde azalma meydana gelirken, lipit peroksidasyonu, reaktif oksijen türleri, total oksidan miktarı ve ileri okside protein ürünleri ve glikoprotein seviyeleri ile arginaz, miyeloperoksidaz, ksantin

oksidaz aktivitelerinde artış meydana geldiği belirlendi. ALA, VPA grubunda bu seviye ve aktiviteleri tersine çevrildi. Elde edilen sonuçlara göre, ALA'in VPA ile oluşturulan böbrek hasarını önlediği sonucuna varılabilir.]

Haziran 2024 , [83] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Valproik asit, Alfa lipoik asit, Antioksidanlar, Böbrek]



ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

[EFFECTS OF ALPHA LIPOIC ACID ON VALPROIC ACID INDUCED KIDNEY INJURY IN RATS]

[Nigar GARAYEVA]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Biochemistry Programme

[Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ismet Burcu TURKYILMAZ MUTLU]

[Valproic acid (VPA) is a short branch chained fatty acid and used for an effective treatment of epilepsy, migraine and bipolar disorders. The long-term usage of VPA has become dangerous due to its free radical formation property. The kidneys are one of the most affected organs during VPA treatment. Alpha lipoic acid (ALA) is a naturally existing antioxidant and its dual solubility in aqueous and lipid solvents makes this substance a powerful antioxidant. In this study, it was aimed to investigate the protective effects of ALA on VPA induced kidney damage. The Sprague-Dawley rats were divided into four groups as follows: Group I; control group, Group II; ALA group (given 50 mg/kg ALA, orally), Group III; VPA group (given 500 mg/kg VPA, intraperitoneally), Group IV; VPA+ALA group (received at the same dose and time). The experimental procedure was applied to rats for 15 days. On the 16th day, all rats were sacrificed under anesthesia. The kidney tissues were taken and homogenized with cold 0.9% NaCl. The kidney samples were centrifuged. In collected supernatants, the reduced glutathione levels and antioxidant enzyme activities, sodium potassium ATPase and carbonic anhydrase activities were decreased while lipid peroxidation, reactive oxygen species, total

oxidant status and advanced oxidized protein product and glycoprotein levels, arginase, myeloperoxidase, xanthine oxidase activities were increased after VPA administration. ALA reversed these levels and activities in the VPA group. According to the obtained results, it can be concluded that ALA can prevent VPA induced kidney damage.]

June 2024, [83] pages.

Keywords: [Valproic acid, Alpha lipoic acid, Antioxidants, Kidney]



1. GİRİŞ

Böbrek, boşaltım sisteminde yer alan önemli bir organdır. Bu organın fizyolojik rolü, metabolitlerin atılımı ile su, elektrolit ve asit-baz dengesinin regülasyonudur. Bu düzenleyici fonksiyonu sayesinde de vücutta endokrin fonksiyonların stabil kalmasına yardımcı olmaktadır. Son yıllarda diyabet, hipertansiyon başta olmak üzere pekçok hastalık, tedavilerde kullanılan ilaçların yan etkilerinin oluşması gibi bazı sebeplerden dolayı böbrek hastalıklarında hızlı bir artış meydana gelmiştir (Osborn ve diğ., 2021; Liu ve diğ., 2024). Akut ve kronik böbrek hastalıkları olarak sınıflandırılan bu hastalıklarda, fibrozis ve glomerüler filtrasyon hızının değişmesi ile böbrek dokusunun yapısında ve böbrek fonksiyonlarında geri dönüşümsüz hasarlar meydana gelmektedir. Buna ek olarak, yapılan araştırmalar, çeşitli dış faktörlere maruz kalınmasının da akut/kronik böbrek rahatsızlıklarının oluşumunda rol oynadığını göstermiştir.

Valproik asit (VPA), geniş spektrumlu bir antiepileptik ilaçtır ve başta epilepsi olmak üzere, migren, bipolar rahatsızlıklar ve şizofreni gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. VPA kullanımının birçok doku ve organda yan etki meydana getirmesi, VPA'nın serbest radikal ve oksidatif stres oluşumunu tetiklemesinden de kaynaklanmaktadır. Uluslararası Sağlık Enstitüsü, bu ilacın kullanımı ile meydana gelen yan etkilerin başta karaciğer ve pankreas olmak üzere birçok doku ve organı etkilediğini, anoreksi, kusma, mide bulantısı, koagülasyon problemleri, kabızlık, hafız kaybı, saç dökülmesi gibi farklı semptomların meydana geldiğini bildirmiştir (Safdar ve Ismail, 2023).

Alfa lipoik asit (ALA), hem suda hem de yağda çözünebilen önemli bir antioksidan maddedir. Hem yükseltgenmiş hali olan lipoik asit hem de indirgenmiş hali olan dihidrolipoik asit olarak iki temel formu bulunan ALA'nın, metal kelatlayıcı, C ve E vitaminlerini rejenere ederek antioksidan etki göstermesi ve birçok metabolik yolda sinyal iletim mekanizmasını düzenlemesi gibi çok önemli biyolojik rolleri vardır (Rochette ve diğ., 2015).

Çalışmamızda, VPA ile oluşturulan böbrek hasarı üzerine ALA'nın koruyucu etkileri araştırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, alınan böbrek dokularının fizyolojik su ile hazırlanan homojenizatlarında indirgenmiş glutatyon, lipid peroksidasyonu, ileri okside protein ürünleri, reaktif oksijen türleri, total oksidan ve glikoprotein seviyeleri ile katalaz, süperoksit

dismutaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz, glutatyon-S-transferaz, arginaz, miyeloperoksidaz, ksantin oksidaz, sodyum potasyum ATPaz, karbonik anhidraz gibi enzimlerin aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen biyokimyasal bulgular sonucunda, VPA ile oluşturulan böbrek hasarında ALA'in antioksidan sistemi düzenleyici etkisi sayesinde oksidatif hasarın azaldığı tespit edilmiştir.

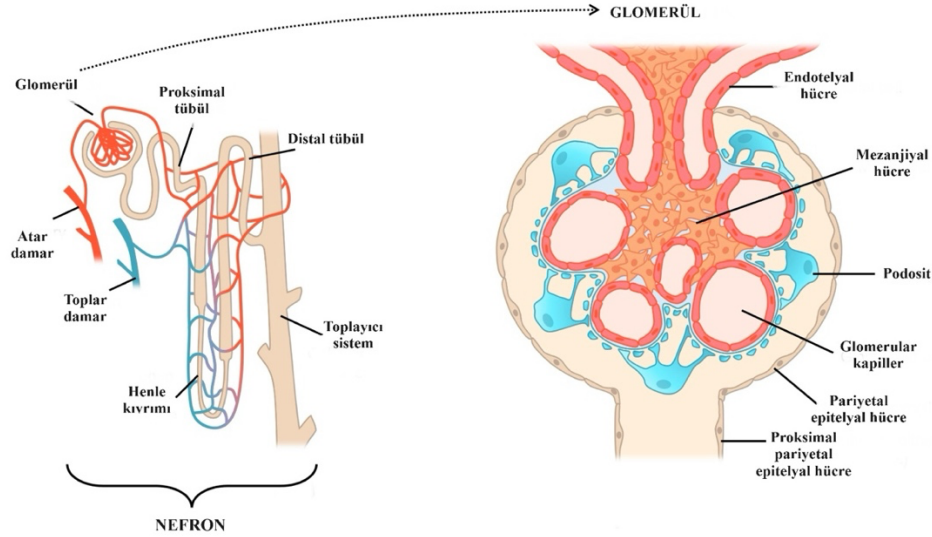


2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. BÖBREK

Böbrek, vücutta enerji ihtiyacı en yüksek olan organlardan biridir ve bu organın dinlenme anında metabolik ihtiyacı beyin ve diğer organlara göre daha fazladır (Wang ve diğ., 2010). Vücutta, kalpten sonra mitokondri sayısı ve oksijen tüketimi en yüksek olan ikinci organ olan böbrek, vücut sıvılarının dengelenmesi, boşaltımdan önce bazı maddelerin yeniden kazanımı veya bazı maddelerin atılımının sağlanması ve kan basıncının düzenlenmesi gibi çeşitli hücresel fonksiyonları ve işlemleri yerine getirmektedir (Pagliarini ve diğ., 2008; Bhargava ve Schnellmann, 2017).

Esas birimi nefron olan böbrek dokusunun detaylı gösterimi Şekil 2.1’de verilmiştir. Nefronlar, endotelial ve mezanjiyal hücreleri, podositleri, pariyetal ve tübüler epitelyal hücreleri içeren yapılardır.



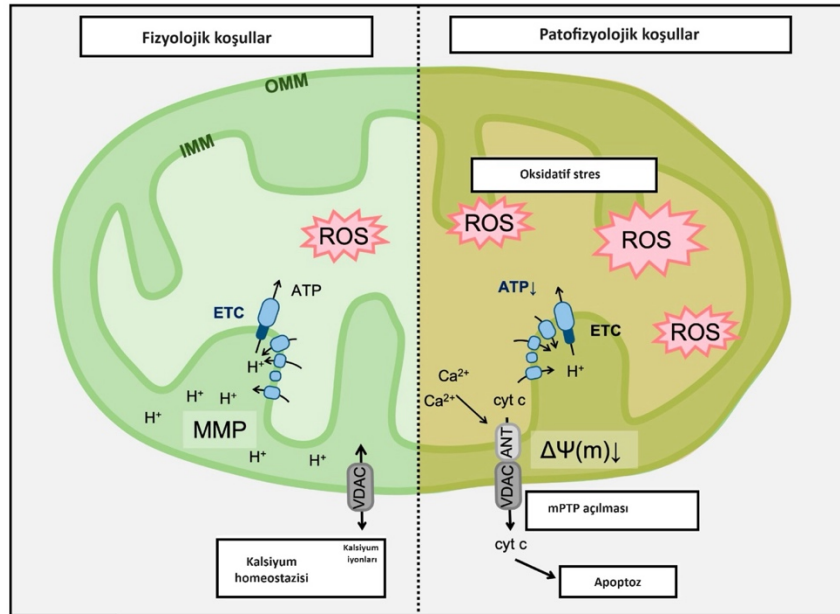
Şekil 2.1: Böbrek dokusunda temel birim olan nefron ve detaylı yapısı
(Ho ve Shirakawa, 2023).

Böbrek dokusunda mitokondri ihtiyacının ve dolayısıyla sayısının fazla olması, bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Gerek çevresel ve beslenme kaynaklı gerekse ilaç

toksitesitesi nedeniyle meydana gelen böbrek hastalıklarının temelinde böbrek mitokondrilerinde meydana gelen metabolik olaylardaki aksamalar yer almaktadır.

2.1.1. Böbrek Mitokondrisinde Homeostazi

Bir mitokondri homeostazisinin sağlıklı bir şekilde ilerlemesinde “mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenağı (mitochondrial permeability transition pore, mPTP)”nin çok önemli bir rolü vardır. Normal fizyolojik koşullarda, mPTP, küçük moleküllerin mitokondriye geçişine izin verir ve mitokondriyal membran potansiyelinin belirli bir dengede kalması için oksidatif fosforilasyon üzerinden ATP sentaz reaksiyonunun devamlılığını sağlar. Mitokondriyal kalsiyum iyonunun (Ca^{2+}) varlığı ve miktarı da mPTP’nin açılması için gereklidir. Fakat, patofizyolojik koşullarda artan oksidatif stres ve aşırı Ca^{2+} seviyeleri, mPTP’nin aşırı derecede açılmasına, daha büyük ve çözünabilir moleküllerin mitokondriye girmesine neden olur. Bu durumda, mitokondriyal membran potansiyeli değişir, oksidatif fosforilasyon mekanizması bozulur. Mitokondriyal sitokrom C’nin sitoplazmaya sızması ile apoptotik hücre ölümü başlamış olur (Halepstrap, 2009; Bernardi ve diğ., 2015). Oksidatif stres ile fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda mitokondride meydana gelen reaksiyonlar ve bu reaksiyonların birbirleriyle olan bağlantıları Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



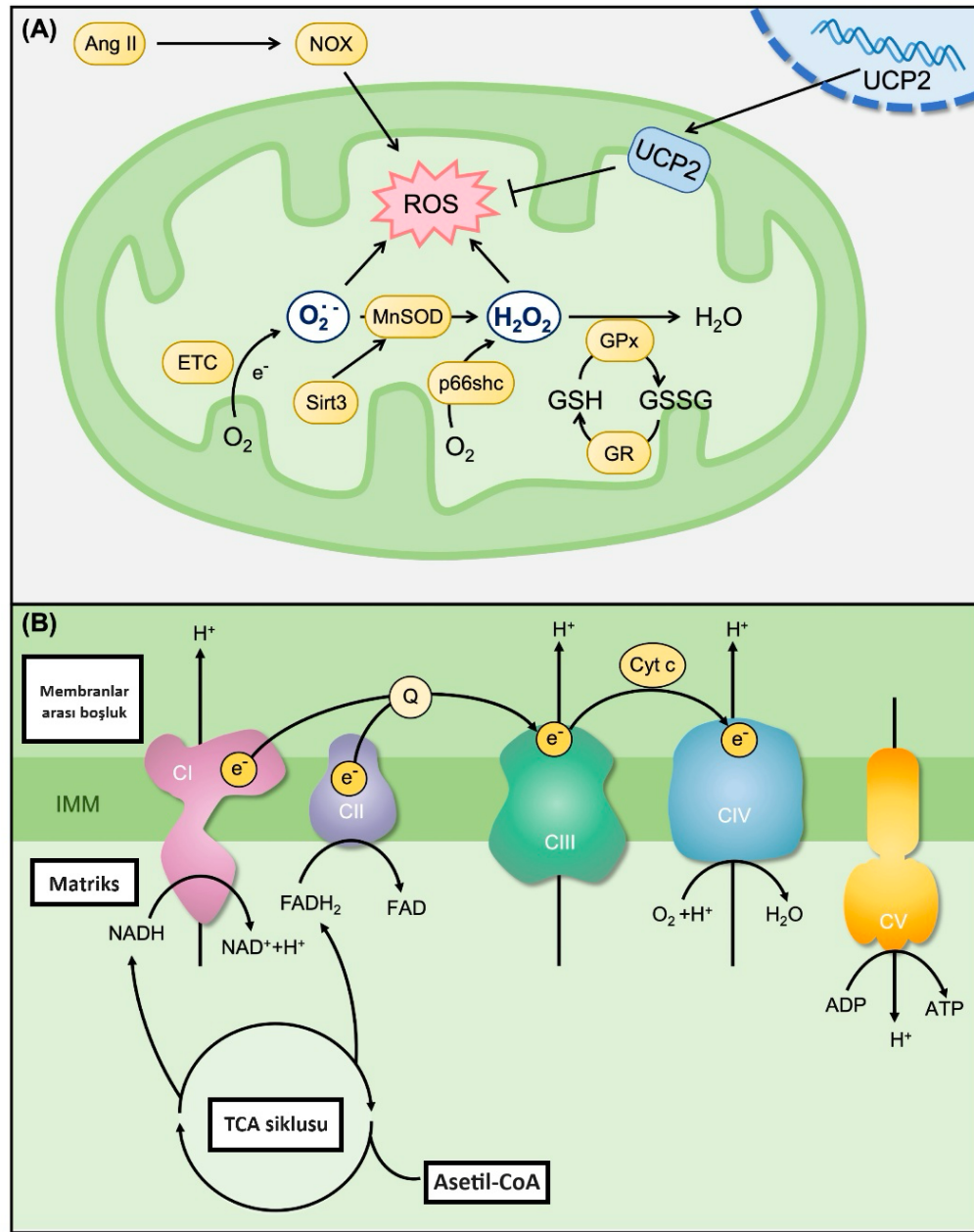
Şekil 2.2: Böbrek dokusunda mitokondri homeostazisinin devamlılığı için mPTP’nin düzenlenmesi
(Ho ve Shirakawa, 2023).

2.1.2. Mitokondriyal Antioksidan Sistem

Hücre içindeki çeşitli reaksiyonlar sonucunda, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşabilmektedir. Bu türlerin miktarının belirli bir dengede tutulması için mitokondri kendi içinde bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Bu savunma sisteminde en önemli antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve süperoksit dismutaz (SOD) bulunmaktadır (Mailloux, 2020).

Mitokondriyal elektron transport sistemi (ETS) ve diğer enzimler tarafından üretilen süperoksit radikali, SOD enzimi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülmektedir (Stöcker ve diğ., 2018). H_2O_2 miktarlarının artması ile hücre hasar oluşumu doğru orantılıdır (Holmström ve Finkel, 2014). H_2O_2 'in oluşumundaki diğer bir kaynak da, NADPH oksidazların artan aktivitesidir. NADPH oksidazın bir izoenzimi olan NADPH oksidaz 4, böbrek dokusunda daha aktiftir. Bu enzimin aktivitesinin artması ile böbrek dokusundaki ROT'nde bir artış meydana geldiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Muñoz ve diğ., 2020).

Mitokondriyal antioksidan sistem ve oksidatif stres arasındaki bağlantı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Mitokondriyal antioksidan sistem ve oksidatif fosforilasyon
(Ho ve Shirakawa, 2023).

2.1.3. Böbrek Rahatsızlıkları

Genel olarak akut ve kronik böbrek rahatsızlıkları olarak ikiye ayrılan bu hastalıklar, nefron kayıpları, inflamasyon ve damar daralması sonucunda meydana gelen endotelial hasar ile karakterizedir. Bu hastalıklarda da temel faktör, mitokondride meydana gelen fonksiyon

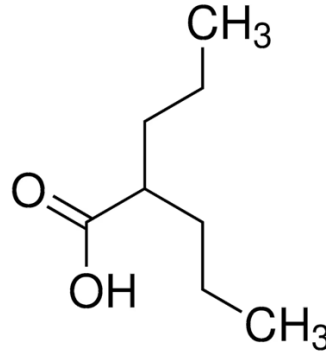
bozukluklarıdır (Ho ve Shirakawa, 2023). Bu rahatsızlıklara neden olan etkenlerden bazıları şu şekilde açıklanabilir:

1. Hava Kirliliği: Karbonmonoksit, karbondioksit, azotdioksit ve küçük partiküllere maruz kalınması sonucunda, kronik böbrek rahatsızlıklarının arttığı tespit edilmiştir. Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda, küçük partiküllere maruziyet sonucunda böbrek proksimal tübüllerinde mitokondriyal ROT miktarlarının arttığı, ATP üretiminin, kompleks IV ve ATP sentaz aktivitelerinin azaldığı ve buna bağlı olarak otofaji ve apoptotik hücre ölümünün arttığı tespit edilmiştir (Mao ve diğ., 2011; Kochi ve diğ., 2020).
2. Ağır Metallere Maruz Kalmak: Böbrekler, ağır metallerin temel olarak biriktiği organlardan biridir. Ağır metaller maruz kalınması sonucunda, SOD, GPx, GR, katalaz (CAT) ve glutatyon-S-transferaz (GST) ve ATPaz aktivitelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun sebepleri de mitokondriyal apoptoz yolunun tetiklenmesi ve ETS aktivitesinde azalma olarak bilinmektedir (Cheraghi ve diğ., 2018; Wang ve diğ., 2020).
3. Fungisit, Herbisit ve İnsektisitler: Bu sınıflara ait olan bazı kimyasal maddelerin böbrek üzerinde oksidatif stres meydana getirdiği, bu oksidatif stresin mitokondriyal biyogenezini azalttığı, otofaji ve inflamasyon süreçlerini hızlandığı, apoptotik ve fibrotik yanıtların oluşumuna neden olduğu literatürde belirtilmektedir (Keshk ve Zahran, 2019).
4. Nanopartiküller: Çok katmanlı olarak üretilen karbon temelli nanopartiküllere maruziyet sonucunda, böbreklerde hücre membranlarının hasara uğradığı, malondialdehit ve ROT türevlerinin miktarında artış olduğu, hücre içi glutatyon seviyelerinin ve mitokondriyal matriks potansiyelinin azaldığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Reddy ve diğ., 2010; Zamani ve diğ., 2021). Ayrıca, altın, gümüş, bakır ve platinyum temelli nanopartiküllerin de genel olarak enerji metabolizmasını olumsuz yönde etkilediği, kaspaz-3 ekspresyonlarını arttırdığı, mitokondride oksidatif stresi arttırdığı da çeşitli araştırmacılar tarafından yayınlanmıştır (Sarkar ve diğ., 2011; Ferreira ve diğ., 2015; Vasanth ve Kurian, 2017; Almeer ve diğ., 2018).

2.2. VALPROİK ASİT

2.2.1. Valproik Asit Hakkında Genel Bilgiler

Valproik asit ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CHCOOH}$, 2-propil valerik asit, VPA, Şekil 2.4), Beverly S. Burton tarafından 1881’de sentez edilmiş kısa zincirli bir yağ asididir. VPA’in tedavi amaçlı olarak ilk kullanım onayı, 1978 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Konseyi tarafından verilmiştir (Peterson ve Naunton, 2005; Romoli ve diğ., 2019). Bu tarihten itibaren VPA, epilepsi (Peterson ve Naunton, 2005), bipolar rahatsızlıklar (Iannaccone ve diğ., 2021), migren (Linde ve diğ., 2013), nöropatik rahatsızlıklar ve şizofreni (Wang ve diğ., 2016; Guo ve diğ., 2021) gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Belirtilen bu hastalıkların tedavisi için VPA’in uzun süreli olarak kullanılması gerekmektedir.



Şekil 2.4: VPA’in açık formülü

(www.sigmaaldrich.com).

Yapılan araştırmalar sonucunda, VPA’in yararlı etkilerinin yanı sıra, uzun süreli kullanımının sonucunda ciddi yan etki ve toksisite oluşturduğu kanıtlanmıştır. Bu ilacın hem yararlı etkilerinin hem de zararlı etkilerinin gerek VPA’in kendisi gerekse vücuttaki bazı metabolitleri tarafından oluşturulduğu tespit edilmiştir.

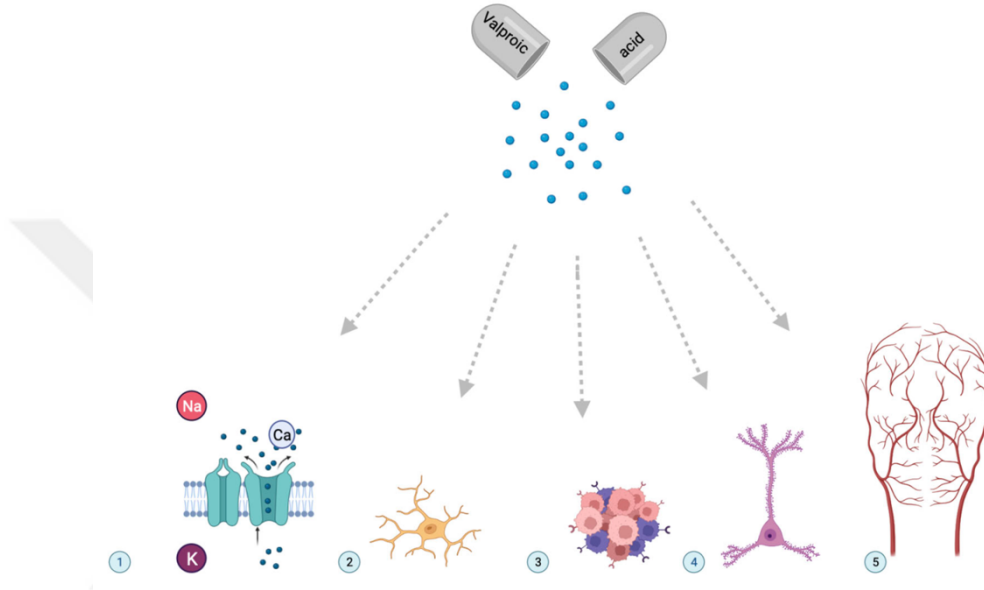
2.2.2. Terapötik ve Toksik Etkileri Olan Valproik Asit Metabolitleri

Metabolit terimi iki şekilde tanımlanmaktadır:

- 1) Vücutta gerek sindirimi gerekse diğer metabolik prosesleri kapsayan metabolik faaliyetler sonucunda oluşan maddelerdir.

- 2) İlaç metabolize edildikten sonra kan dolaşımında kalarak, organ ve dokularda birikerek veya idrarla atılabilecek hale gelecek şekilde vücutta kalabilen maddelerdir.

VPA metabolitlerinin hem terapötik etki hem de toksik etki gösteren bazı metabolitleri mevcuttur. Terapötik etki gösteren ve serum, plazma ile idrarda tespit edilen metabolitler ile bu metabolitlerin vücuttaki çeşitli etki yerleri Şekil 2.5 ve Tablo 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5: VPA’in metabolitlerinin terapötik özellik gösterdiği yerler
(Shnayder ve diğ., 2023).

1. Voltaj-bağımlı sodyum, kalsiyum ve potasyum kanallarının bloke edilmesi, 2. Sinir sistemi üzerinde koruyucu etki, 3. Kanser hücrelerinde sinyal yollarının inhibisyonu, 4. Sinir hücrelerinin yapımının düzenlenmesi, 5. Anjiyo-koruyucu etki.

Tablo 2.1: Serum, plazma ve idrarda tespit edilen ve terapötik etkileri olan VPA metabolitleri (Shnayder ve diğ., 2023).

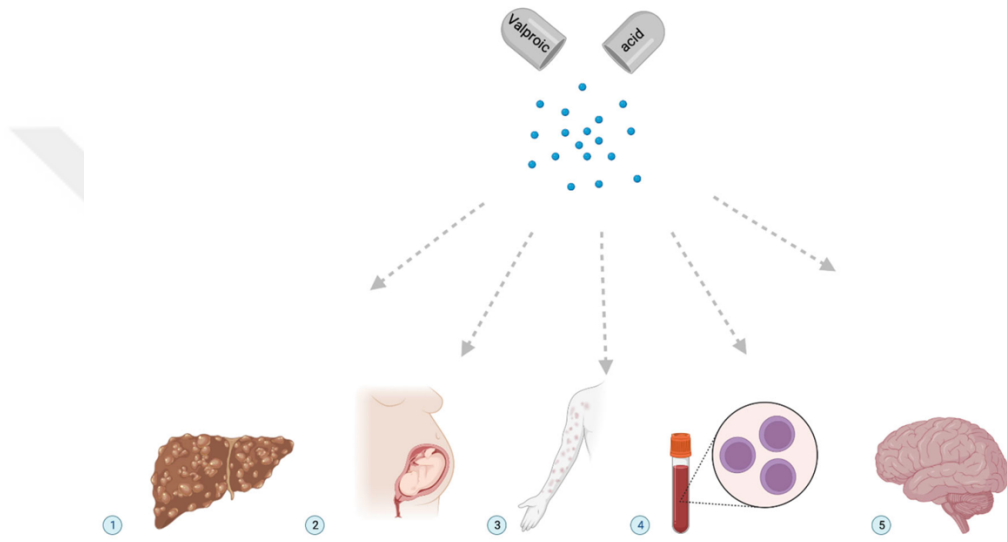
Metabolitin Adı	Klinik Etkisi	Metabolitin Tespit Edildiği Numune
VPA-glukuronid	Terapötik/Nötr Etki	Serum/Plazma/İdrar
2-n-propil-2-pentenoik asit	Terapötik Etki	Serum/Plazma/İdrar
Valproil-CoA	Terapötik Etki	Serum/Plazma
4-en-VPA	Terapötik Etki	Serum/Plazma/İdrar
2-en-VPA	Terapötik Etki	Serum/Plazma/İdrar

VPA ve metabolitlerinin terapötik etkilerinin arasında migren gibi rahatsızlıkların önlenmesi, bazı histon deasetilaz (HDAC) enzimlerini direkt inhibe etmeleri yer almaktadır:

- *Epilepsi tedavisindeki koruyucu etkisi:* VPA gibi antiepileptik ilaçların epilepsi tedavilerindeki temel rolü, membran polarizasyonunda ve iyonik homeostazinin dengeli tutulmasında gerekli olan sodyum, potasyum ve kalsiyum kanalları gibi voltaj kapılı iyon kanallarının aşırı aktivasyonunu engellemektir. Bu şekilde aşırı derecede artmış olan sinir iletim mekanizması da düzenlenmiş olur (Yellen, 2002; White ve diğ., 2007; Stafstrom, 2010).
- *Migren ve bipolar bozuklukları önleyici etkisi:* VPA, beyindeki mikrozomal uzun zincirli yağ asidi açıl-CoA sentetazların yarışmasız inhibitörüdür. Böylece, araşidonil-CoA miktarının azalması ile inflamatuvar özellik gösteren prostaglandin üretimindeki azalma doğru orantılı hale gelir. Buna ek olarak VPA'nın protein kinaz-C inaktivasyonuna sebep olması, miyoinositol-1-fosfat sentetazlar üzerinde de yarışmasız inhibitör etki göstermesi de hem bipolar rahatsızlığının önlenmesinde hem de migrenin önlenmesindeki temel mekanizmalardır (Shaltiel ve diğ., 2007; Parikh ve Silberstein, 2019).
- *HDAC inhibitör etkisi:* Son yıllarda yapılan araştırmalar, HDAC inhibitörlerinin hücre farklılaşmasının ve progresyonunun, gen ekspresyonlarının, ve melanoma hücreleri üzerindeki apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (Chavez ve diğ., 2020). VPA gibi HDAC inhibitörlerinin melanoma hücreleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında hücre farklılaşmasını tetiklediği ve kanser

hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Landreville ve diğ., 2012). Tümör progresyonunu önleyici özelliği ile antineoplastik özellik gösteren ilaçların etkilerinin artmasında da etkisi olduğu söylenebilir (Chavez ve diğ., 2020).

VPA'nın toksik etki göstermesine neden olan ve tespit edilen bazı metabolitler de Şekil 2.6 ve Tablo 2.2'de gösterilmiştir:



Şekil 2.6: VPA'nın toksik etki gösteren metabolilerinin meydana getirdiği bazı klinik etkiler (Shnayder ve diğ., 2023).

1. Hepatotoksisite, 2. Teratogenite, 3. Dermatit, 4. Trombositopeni, 5. Merkezi sinir sisteminde hasar.

Tablo 2.2: Serum, plazma ve idrarda tespit edilen ve toksik etkileri olan VPA metabolitleri (Shnayder ve diğ., 2023)

Metabolitin Adı	Klinik Etkisi	Metabolitin Tespit Edildiği Numune
3-hidroksi VPA	Toksik Etki	Serum/Plazma/İdrar
4-hidroksi VPA	Toksik Etki	Serum/Plazma/İdrar
5-hidroksi VPA	Toksik Etki	Serum/Plazma/İdrar
Valproil CoA	Toksik Etki	Serum/Plazma
Valproil karnitin	Toksik Etki	Serum/Plazma
2-n-propil-4-okso pentanoik asit	Toksik Etki	Serum/Plazma
3-okso-VPA	Toksik Etki	Serum/Plazma/İdrar
2-en-VPA CoA	Toksik Etki	Serum/Plazma/İdrar
3-en-VPA CoA	Toksik Etki	Serum/Plazma/İdrar

VPA ve bazı reaktif metabolitlerinin nükleofilik etkileşimler sayesinde yapısında oksijen, azot ve kükürt atomu bulunduran moleküller ile reaksiyona girdikleri bilinmektedir (Liu ve diğ., 2020). Bu nükleofilik etkileşimler ile karşılardaki molekülleri kovalent olarak bağlayabilir veya okside edebilmektedirler (Jovanović-Stević ve diğ., 2021). Bu durum, VPA'nın çeşitli doku ve organlar üzerinde ciddi yan etki ve toksisite oluşturmaya neden olur. VPA'nın toksik etki meydana getirdiği doku ve organlar şu şekilde sıralanabilir:

- Karaciğer (Abdelkader ve diğ., 2020), akciğer (Oztay ve diğ., 2020), böbrek (Lee ve diğ., 2023), mide (Magaji ve diğ., 2023) ve ince bağırsak (Oktay ve diğ., 2015), testis (Celik ve diğ., 2022), kas (Ertik ve diğ., 2023), lens (Dağsuyu ve diğ., 2023) ve tükürük bezleri (Cergel ve diğ., 2024).

Çeşitli araştırmacılar tarafından yayınlanan bu çalışmalarda VPA toksisitesinin temelinde serbest radikaller ve ROT tarafından oluşturulan hasarlar dikkat çekmektedir.

2.2.3. Valproik Asit ile Oluşturulan Toksisite ve Böbrek Üzerindeki Etkileri

- VPA'nın mitokondriyal beta oksidasyonu inhibe etmektedir. Bu inhibisyonu gerçekleştirmesindeki temel etki, intramitokondriyal Asetil CoA seviyelerini ve karnitin sirkülasyonunu azaltması ile bağlantılıdır (Anguissola ve diğ., 2023). VPA, ATP ve CoA varlığında VPA-CoA oluşturmaktadır ki bu da VPA'nın metabolize edildiği yollardan birisidir. VPA'nın metabolize edildiği diğer bir yol ise sitosolik ω -oksidasyonudur. Bu tip oksidasyonda 4-en-VPA oluşmaktadır. Hem VPA-CoA hem de 4-en-VPA üzerinden VPA- Δ 4-CoA oluşumu, düz zincirli açıl-CoA esterlerinin hidrolizinde büyük bir direncin meydana gelmesini ve dolayısıyla açıl-Co ile Asetil-CoA sentezlerinde de beklenmeyen bir sınırlama oluşmasını tetiklemektedir (Moedas ve diğ., 2024).
- Sitosolik glikoliz ve mitokondriyal beta oksidasyonu arasındaki hücresel iletişim, piruvat dehidrojenaz kompleksindeki işleyiş, Asetil CoA miktarları ve NAD^+/NADH oranları sayesinde düzenlenmektedir. VPA, piruvat/ α -ketoglutarat dehidrojenaz enzim komplekslerinde dihidrolipoamid dehidrojenaz enzimini inhibe etmektedir. Bu inhibisyon hem ATP sentezini hem de NAD^+/NADH oranını negatif olarak etkilemektedir. Buna ek olarak, VPA'nın NAD^+ koenziminin de novo sentezini de olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Duarte ve diğ., 2021).
- Metabolik asidoz gibi durumlarda, toplam renal amonyak oluşumu tetiklenir ve amonyak, tıpkı su gibi akuaporinler vasıtasıyla kolaylıkla membranlardan geçebilir. Amonyak seviyelerinin artması, ortamdaki pH dengesinin değişmesine neden olur. Böyle bir değişim, direkt olarak karaciğer, böbrek ve solunum sistemini direkt olarak olumsuz yönde etkilemektedir (Moedas ve diğ., 2024).
- VPA'nın böbrek fonksiyonları üzerindeki zararlı etkisi, hastalarda hipernatremi, hipokalsemi ve laktik asidoz ile de tanımlanmaktadır.
- Farelere ait böbrek kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada, VPA'nın oksidatif stresi artırmak suretiyle mitokondriye zarar verdiği belirtilmiştir (Lee ve diğ., 2023). VPA'nın

bu etkisinin, böbrek dokusunda lipid peroksidasyonu ve proteinlerin karbonillenme oranlarını artmasına ve indirgenmiş glutatyon seviyelerinin azalmasına, antioksidan enzimlerin aktif merkezlerine bağlanarak bu enzimlerin aktivitelerinin inhibisyonuna neden olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Kiang ve diğ., 2011; Chaudhary ve diğ., 2015). Heidari ve diğ. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, sıçanlara 15 gün süre ile 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozlarında VPA verilmesi ile böbrek dokusunda reaktif oksijen türlerinin arttığı ve bu durumun mitokondriyal depolarizasyonunu olumsuz yönde etkilendiği belirtilmiştir.

- Ayrıca, VPA birikiminin interlökin-6 gibi inflamasyon belirteçlerinin ve apoptoz marker enzimi olan kaspaz-3'ün ekspresyonlarını arttırdığı bildirilmiştir (Lee ve diğ., 2023).

2.3. OKSİDATİF STRES, BİYOLOJİK SİSTEMLERDE SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

2.3.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen ve/veya azot türlerinin oluşumu ve antioksidan savunma sisteminin bu oluşan radikalleri ortamda etkisiz hale getirebilmesi arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelen bir durumdur (Sies, 2015). Çok yüksek miktarlarda oksidatif stres oluşumu, protein, lipit ve nükleik asitlerin yükseltgenmesine neden olur.

Reaktif oksijen ve azot türleri, hidroksil ($\text{OH}\cdot$), peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$) ve süperoksit ($\text{O}_2\cdot^-$), peroksil ve alkoksil ($\text{ROO}\cdot$ ve $\text{RO}\cdot$), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$), karbonat anyonu ($\text{CO}_3\cdot^-$) gibi serbest radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hipokloröz asit (HOCl), peroksi nitrit ($\text{ONOO}\cdot$) gibi radikal yapısında olmayan bileşikleri içermektedir. Bu reaktif türler, oksijenli solunum esnasında oksijenin indirgenme reaksiyonlarının çeşitli sebeplerden dolayı yarım kalması ile de oluşmaktadır (Weidinger ve Kozlov, 2015; Jomova ve diğ., 2024; Kishi ve diğ., 2024).

2.3.2. Biyolojik Sistemlerdeki Serbest Radikallerin Endojen ve Eksojen Kaynakları

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin endojen kaynakları, hücresel ortamda başta mitokondri olmak üzere peroksisomlar ve endoplazmik retikulum gibi organeller ve NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz ve endotelial nitrik oksit sentaz (NOS) gibi enzimlerdir (Jomova ve diğ., 2024).

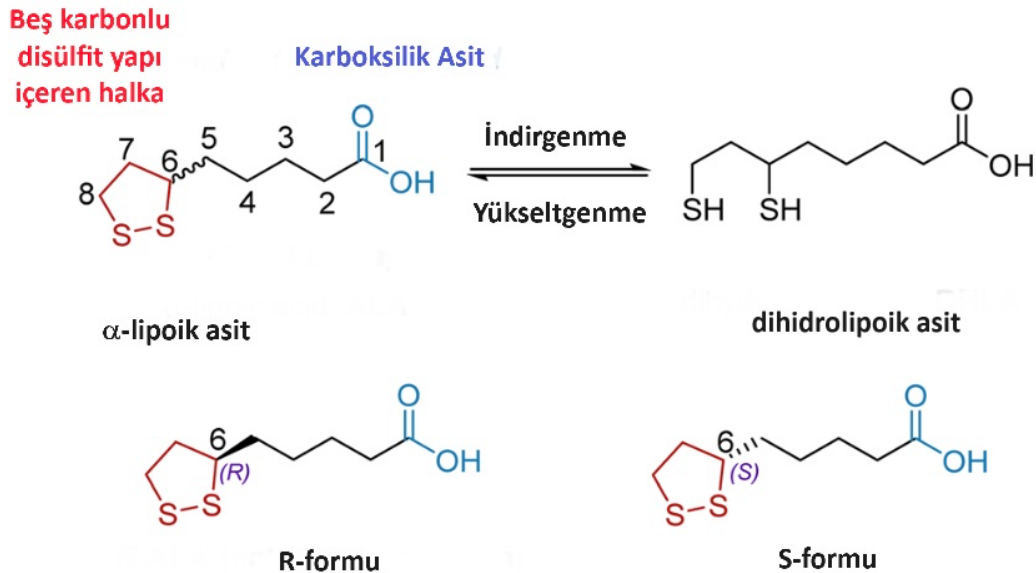
Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin eksojen kaynakları ise, iyonize ve UV radyasyon, sigara ve alkol tüketimi, pestisitler, çeşitli ilaçlardır (Jomova ve diğ., 2024).

2.3.3. Antioksidanlar

Biyolojik sistemlerdeki antioksidanların temel rolü, biyolojik moleküllerin oksidasyonunu engellemek ve önlenmektir. Antioksidanlar temel olarak “enzimatik antioksidanlar” ve “enzimatik olmayan ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar” olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz olarak bilinmektedir. Enzimatik olmayan ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar ise glutatyon, C ve E vitaminleri, karotenoidler, flavonoidlerdir (Jomova ve diğ., 2024).

2.4. ALFA LİPOİK ASİT

Alfa lipoik asit (ALA) doğal olarak bulunan ve çok önemli farmakolojik etkileri olan, yapısında kükürt içeren bir yağ asididir. ALA, temel olarak üç temel yapıdan oluşmaktadır. Bunlardan ilki disülfid yapısının yer aldığı beş karbonlu halka (kırmızı renkli), ikincisi C2-C5 zinciri (siyah renkli) ve üçüncüsü ise karboksilik asidin (mavi renkli) yer aldığı kısımdır. ALA’nın indirgen ve yükseltgen formları ile optik izomerleri Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: ALA ve aktif formu olan dihidrolipoik asit ve ALA’nın izomerleri
(Wang ve diğ., 2023).

ALA, tek bir kiral karbon atomuna sahiptir ve bu özelliği sayesinde R ve S olmak üzere iki adet optik izomeri bulunmaktadır. R formu doğal olarak bulunurken, S formu ise çeşitli kimyasal prosesler sonucunda elde edilebilmektedir. Yiyeceklerde bulunan ALA, R formunda ve proteinler ile kovalent bağ oluşturmuş olarak bulunur. Sentetik olarak verilen takviye formlarında ise R ve S formlarının rasemik karışımı bulunmaktadır (Ghibu ve diğ., 2009; Brufani, 2014).

ALA'nın önemli klinik etkileri mevcuttur. Enzimatik kofaktör olması, glukoz, lipid metabolizmalarında aktif olarak rol alması, gen transkripsiyonunu kontrol edebilmesi bu önemli klinik etkilerden bazılarıdır. Antioksidan özellik göstermesinin yanı sıra, antioksidan özellik gösteren maddelerin üretiminin desteklenmesinde ve hücre içine girebilmesinde de önemli rol oynar. ALA, oksidatif strese neden olan ağır metallerin de kan dolaşımından atılımında etkilidir (Packer ve Cadenas, 2010; Goraca ve diğ., 2011; Chen ve diğ., 2012; Maglione ve diğ., 2015).

Reed ve diğ. (1951) tarafından ilk defa amfiptatik bir molekül olarak karaciğerden izole edilen ALA, trikarboksilik asit siklusunda piruvat dehidrojenaz enzim kompleksine ait olan dihidrolipoat açıltransferaz enziminin kofaktörü olarak tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra, ALA'nın alfa keto glutarat dehidrojenaz ve dallanmış zincirli keto asit dehidrojenazların da kofaktörü olduğu da bilinmektedir (Solomonson ve DeBerardinis, 2018).

ALA'nın vücuda alındıktan sonra hızla emilir ve yarılanma süresi, 10-45 dakika arasındadır. Plazma eliminasyon süresi yaklaşık 0.56 saat olarak tarif edilmektedir. ALA'nın %20'si ise konjuge olmadan vücuttan atılmaktadır (Tripathi ve diğ., 2023).

2.4.1. Alfa Lipoik Asit'in Farmakolojik Özellikleri

2.4.1.1. Sitotoksiste Önleyici Etkisi

ALA'nın reaktif oksijen türlerini yakalayabilmesi ve endojen antioksidan sistemin yenilenmesini sağlaması, bazı kanser çeşitlerinde, kanser hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır (Tripathi ve diğ., 2023). Na ve diğ. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, ALA'nın epidermal büyüme faktörü reseptörü ve protein kinaz B yardımıyla, göğüs kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir.

2.4.1.2. Metabolik Hastalıklar ve Obezite

ALA'in kan glukoz ve lipit seviyelerini düşürücü, obeziteyi önleyici etkileri bulunmaktadır (Carrier and Rideout, 2013). Namazi ve diğ. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, ALA'in vücut kitle indeksini düşürücü etkisinin olduğu bildirilmiştir. Özellikle kurkumin ile birlikte alındığı takdirde, adipoz doku oluşumunu ve böylece kilo alımını engelleyici etkisinin olduğu kanıtlanmıştır.

2.4.1.3. Nöroprotektif Etkisi

ALA'in nöroprotektif etkisinin serbest radikal oluşumunu engellemesi, interlökinler ve tümör nekroz faktörü alfa gibi sitokinlerin ekspresyonlarını azaltması, NF-kB gibi transkripsiyon faktörlerini inhibe etmesinden kaynaklandığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2018; Turkyilmaz ve diğ., 2020).

2.4.1.4. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Kardiyovasküler hastalıkların temel sebeplerinden biri, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidatif değişimleridir. Yapılan çalışmalar sonucunda, makrofajların, düz kas hücrelerinin ve monositlerde ROT'ni yakalayıcı olan reseptörlerin sınırsız bir şekilde okside olmuş LDL'yi aldığı belirlenmiş ve bu durumun lipit birikiminin arttığı, aterosklerotik plakların oluşumuna yol açtığı kanıtlanmıştır. ALA'in indirgenmiş formu olan dihidrolipoik asidin (DHHA) LDL oksidasyonunu engellediği, kan lipit seviyelerini azalttığı ve tansiyon düzenlenmesinde etkili olduğu da bildirilmiştir (Wollin ve Jones, 2003).

2.4.1.5. Böbrek Hastalıkları Üzerine Etkileri

Böbrek hastalıkları, hipoksi, ROT ve oksidatif stres, hücrel metabolik değişiklikler, diyabet ve yüksek tansiyon gibi çeşitli sebeplerden dolayı oluşmaktadır (Granata ve diğ., 2015; Zhang ve McCullough, 2016). ALA'in böbrek hastalıklarını önleyici en önemli iki etkisi, oksidatif stresi azaltması ve plazma protein karbonil seviyelerini düşürmesi olarak tanımlanmıştır (Tripathi ve diğ., 2023).

2.4.1.6. COVID-19

Sayiner ve Serakıncı (2021), ALA’ın T-hücrelerinin aktivasyonunu kontrol ettiğini ve SARS-CoV-2 virüsü tarafından oluşturulan sitokin fırtınasının tedavisinde etkin rol oynadığını bildirmiştir. ALA’ın sodyum potasyum ATPaz enziminin aktivitesini arttırarak hücre içi pH dengesini stabilize ettiği ve virüsün girişi için bir engel oluşturduğu Cure ve Cure (2020) tarafından tespit edilmiştir.



3. YÖNTEM

3.1. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

4-Aminoantipirin (Sigma A4382), amonyum molibdat (Merck 1181), 2-amino-4-naftil benzoik asid (Fluka 08751), L-arginin monohidroklörür (Merck 101543), asetilaseton (Fluka 00900), adenozin trifosfat (ATP; Aldrich A26209), asetik asid (Merck 100063), amonyum demir II sülfat (Fluka 1250), benzoik asid (Carlo Erba 302087), n-butanol (Merck 100988), 5,5'-ditiyobis-(2-nitro benzoik asid) (Fluka 43760), demir-III-klorür hekza hidrat (Merck 3946), diasetilmonoksim (Merck 2918), p-dimetilamino benzaldehid (Merck 3057), dipotasyum tartarat (Merck 5160), dipotasyum hidrojen fosfat (Merck 105101), disodyum hidrojen fosfat (Fluka 71642), o-dianisidin dihidroklörür (Sigma D3252), etilendinitriltetraasetik asit (Merck 2604134), fenol (Merck 5559), m-fosforik asid (Carlo Erba 407465), o-fosforik asid (Merck 100563), fosfotungstik asid (Merck 582), fukoz (Sigma D8150), glukozamin hidroklörür (Fluka 49130), glutatyon (Sigma G4251), glutatyon redüktaz (Merck G3664), hidroklorik asid (Merck 100314), hidrojen peroksid (Merck 108600), HEPES (Sigma H3375), kalsiyum klorür (Fluka 21085), ksantin (Sigma X0626), ksilinol orange (Merck 108677), 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (Fluka 24440), lipoik asit (Sigma T5625), lityum sülfat (Riedel de Haën 13029), magnezyum klorür hekzahidrat (Merck 63065), β -nikotinamid adenin dinükleotid (Fluka 43420), okside glutatyon (Sigma G4376), ouabain oktahidrat (Sigma O3125), paraokson etil (Fluka 36186), potasyum dihidrojen fosfat (Riedel de Haën 04243), potasyum klorür (Merck 4935), potasyum iyodür (Mallinckrodt 9688), sodyum bikarbonat (Fluka 71628), sodyum dihidrojen fosfat (Merck 106346), sodyum disülfid (Merck 6357), sodyum sülfid (Merck 6652), sodyum karbonat (Merck 106392), sodyum klorür (Merck 106400), sodyum nitroprussiyat (Riedel de Haën 31444), sodyum piruvat (Merck 260234), sodyum potasyum tartarat (Merck 8085), sodyum sitrat (Merck 6447), 2-tiyobarbütirik asid (Fluka 88481), trikloro asetik asid (Merck 100810), Tris (Merck 108387), 1,1,3,3-tetra etoksi propan (Sigma T9889), valproik asit (Merck 814439), üre (Riedel de Haën 15604).

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN LABORATUVAR CİHAZLARI

Buzdolabı	: Arçelik
Çalkalayıcı Su Banyosu	: Memmert WB 14/WNB 14
Derin dondurucu	: Beko
Destile Su Cihazı	: Brand MonoDest 3000
ELISA Okuyucu	: Biotek ELISA Okuyucu-ELx808
ELISA Okuyucu	: Biotek ELISA Okuyucu-FLx800
Etüv	: Memmert UNB 500
pH Metre	: Hanna pH/ORPvMeter HI 2211
Santrifüj Cihazı	: Denley BS400
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	: Sigma 3000K
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-Visible Mini UV-1240
Terazi	: Radwag XA 60/220/X 4 Haneli Terazi
Terazi	: Radwag AS 220/C/2 5 Haneli Terazi
Vorteks	: Fisons Whirlimixer

3.3. DENEY PROSEDÜRÜ

Bu tez çalışması için kullanılan deney hayvanları, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun "10.2023.mar" numaralı ve 11.04.2023 tarihli etik kurul izni ile alınmıştır. Bu çalışmada, 6 aylık ve 250-350 g ağırlığında dişi Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Tez çalışmamız için oluşturulan deney prosedürü şu şekildedir (Tablo 3.1):

Tablo 3.1: Kontrol ve deney gruplarına ait deney prosedürü

Grup Adı	Deney prosedürünün uygulanması	Deneylerde kullanılacak olan maddelerin dozları ve uygulanma şekli
Kontrol grubu (n=10)	15 gün boyunca zeytinyağı verilen grup	Zeytinyağı, 1 mL, gavaj yöntemi ile
ALA grubu (n=10)	15 gün boyunca ALA verilen grup	ALA (zeytin yağında çözüldü), 50 mg/kg, gavaj yöntemi ile
VPA grubu (n=10)	15 gün boyunca VPA verilen grup	VPA (zeytin yağında çözüldü), 500 mg/kg, intraperitoneal yol ile
VPA+ALA grubu (n=10)	15 gün boyunca, VPA ve ALA verilen grup	ALA, VPA uygulanmasından bir saat önce hayvanlara gavaj yöntemi ile verildi ve bir saat sonra VPA enjeksiyonu yapıldı.

Deney süresinin sonunda tüm hayvanlar, bir gece aç bırakıldı. Deneyin 16. gününde, tüm hayvanlar, anestezi altında sakrifiye edildi.

3.4. BÖBREK DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

3.4.1. Doku Homojenizatu Hazırlanması

Hayvanlardan alınan böbrek dokuları, konsantrasyonları %10 (w/v) olacak şekilde, soğuk serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile homojenize etme işleminden geçirildi. Elde edilen homojenizatlar, soğutmalı santrifüj cihazında +4 °C’de 10000 x g hızında ve 10 dakika boyunca santrifüje edildi. Santrifüjden sonra elde edilen üst fazlar ependorf tüplerine alınarak,

deneylerin yapılacağı güne kadar -80 °C’de saklandı. Deneylerin yapılacağı günden bir gün önce, ependorf tüpleri -20 °C’ye alındı ve ardından +4 °C’de bekletildi.

3.4.2. Miyeloperoksidaz Aktivite Tayini İçin Doku Homojenizatı Hazırlanması

0.1 g böbrek dokusu alındı ve HETAB (50 mM pH 6.0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış) içerisinde, konsantrasyonları %10 (w/v) olacak şekilde soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenizatlar, soğutmalı santrifüj cihazında +4 °C’de 3500 x g hızında ve 30 dakika boyunca santrifüje edildi. Elde edilen süpernatantlar miyeloperoksidaz aktivite tayini için kullanıldı.

3.5. BÖBREK DOKU HOMOJENİZATLARINDA YAPILAN BİYOKİMYASAL PARAMETRELER

Böbrek dokularında, indirgenmiş glutatyon (GSH; Beutler, 1975) ve lipid peroksidasyonu (LPO; Ledwozyw ve diğ., 1986) seviyeleri, katalaz (CAT; Aebi, 1984), süperoksit dismutaz (SOD; Mylroie ve diğ., 1986), glutatyon peroksidaz (GPx; Wendel, 1981), glutatyon redüktaz (GR; Beutler ve diğ., 1971) ve glutatyon-S-transferaz (GST; Habig ve Jakoby, 1981) aktiviteleri, reaktif oksijen türleri (ROT; Zhang ve diğ., 2018) ve total oksidan seviyeleri (TOS; Erel, 2005) ile ileri okside protein ürünleri (AOPP; Witko-Sarsat ve diğ., 1996) miktarları, arginaz (Geyer ve Dabich, 1971) ve miyeloperoksidaz (MPO; Wei ve Frenkel, 1991) aktiviteleri, glikoprotein (fukoz, heksoz ve heksozamin) seviyeleri (Dische ve Shettles, 1948; Winzler, 1955), ksantin oksidaz (XO; Corte ve Stirpe, 1969), sodyum potasyu ATPaz (Ridderstap and Bonting, 1969) ve karbonik anhidraz (CA; Verpoorte ve diğ., 1967) aktiviteleri tayinleri gerçekleştirildi. Tüm dokuların protein değerleri ise Lowry ve diğ. (1951) tarafından geliştirilen metoda göre belirlendi.

3.6. İNDİRGENMİŞ GLUTATYON TAYİNİ

Tüm gruplara ait böbrek dokularında indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarı, Beutler (1975) metoduna göre tayin edildi. Bu metodda, Ellman ayracı’nın tiyol grupları (-SH) ile reaksiyonu sonucunda oluşan renkli ürünün absorbansı, spektrofotometrede 412 nm’de ölçüldü.

GSH tayininde kullanılan çözeltiler

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Beutler (1975) tarafından geliştirilen metodda belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi :

400 µL santrifükat üzerine 600 µL çöktürme çözeltisi ilave edildi. Vortekslenen numuneler, 5 dakika 3000 rpm’de santrifüje edildi. Santrifüj işleminden sonra; kör, numune ve standart tüpleri şu şekilde hazırlandı:

Kör tüpüne 200 µL destile su, örnek tüpüne 200 µL üst faz ve standart tüpüne de 200 µL çalışma standardı tüplere alındı. Ardından tüm tüplere 800 µL sodyum sekonder fosfat çözeltisi ve 100 µL belirtme reaktifi ilave edildikten sonra, tüm tüpler vortekslendi. Belirtme reaktifi ilavesinden itibaren beş dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilen tüplerin absorbansları, spektrofotometrede kör tüpüne karşı 412 nm’de ölçüldü.

Böbrek örneklerinin içerdikleri indirgenmiş glutatyon miktarlarının hesaplanması için aşağıda belirtilen formül kullanıldı :

$$\text{nmol GSH/mg protein} = [(N_{\text{abs}}/S_{\text{abs}}) \times (2.5 \times C_{\text{st}}) \times 10^6]/P$$

N_{abs} : Örnek absorbansı, S_{abs} : standart absorbansı, C_{st} : standart konsantrasyonu, P : her örneğe ait %mg protein değeri.

3.7. LİPİT PEROKSİDASYONU MİKTARI TAYİNİ

Böbrek dokusunda lipit peroksidasyonu (LPO) miktarları, Ledwozyw ve diğ. (1986) tarafından geliştirilen metoduna göre tayin edildi. Bu yöntemde göre, malondialdehid (MDA) gibi lipit peroksidasyon ürünleri, tiyobarbutirik asit (TBA) ile sıcak ortamda reaksiyona girmektedir. Oluşan ürünlerin konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşan pembe-kırmızı rengin absorbansları spektrofotometrede 532 nm’de ölçülerek değerlendirilir.

LPO miktar tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Ledwozyw ve diğ. (1986) tarafından geliştirilen metodda belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi :

Böbrek santrifüгатlarından 0.5 mL alındı ve doku proteinlerinin çöktürölmesi amacıyla 2.5 mL 1.22 M TCA çözeltilisinden ilave edildi. 15 dakikalık bekleme sonucunda kör tüpüne 0.5 mL destile su ve standart tüpüne 0.5 mL çalışma standardı alındı ve bu tüpler de 2.5 mL 1.22 M TCA ile muamele edildi. Tüm tüplere, 0.75 mL TBA çözeltilisi ilave edildikten sonra, tüpler kaynar su banyosunda 30 dakika boyunca bekletildi. Bekleme işleminin ardından tüpler, musluk suyu altında soğutuldu ve tüm tüplere 2 mL n-butanol ilavesi yapıldı. İlavenin ardından vorteks ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminden sonra, tüpler 10 dakika boyunca 3000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüje edildi. Santrifüj sonunda elde edilen organik fazın abosrbansları, 532 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Numunelere ait LPO değerleri, aşağıda belirtilen formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{nmol MDA/mg protein} = [(N_{\text{abs}}/St_{\text{abs}}) \times 4.4]/P$$

N_{abs} : Örnek absorbansı, St_{abs} : standart absorbansı, P : her örneğe ait %mg protein değeri.

3.8. KATALAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Böbrek dokusunda katalaz (CAT) aktivitesi, Aebi (1984) tarafından geliştirilen yöntemle göre tayin edildi. Bu yöntemde, H_2O_2 CAT enzimi ile H_2O 'ya dönüştürölür ve bu esnada meydana gelen absorbans azalması, spektrofotometrik olarak 240 nm'de ölçölür.

CAT aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Aebi (1984) tarafından geliştirilen metotta belirtildiğı gibi hazırlandı.

Tayin Yöntemi :

Kör tüpüne 0.1 mL serum fizyolojik çözeltilisi, örnek tüpüne de 0.1 mL seyreltik doku örneğı alınır. Her iki tüpe de 0.4 mL katalaz tamponu ilave edilerek, numune tüpündeki absorbans değışimi köre karşı 240 nm'de kaydedildi.

Böbrek dokularındaki CAT aktivitesi şu formüle göre hesaplandı:

$$\text{CAT aktivitesi (U/mL)} = (\Delta OD/0.0436) \times (\text{Toplam küvet hacmi/örnek hacmi}) \times f$$

Spesifik aktivite (U/mg protein) = Enzim aktivitesi / mg protein

$\Delta OD = (0. \text{ dakikada ölçülen absorbens değeri}) - (1. \text{ dakikada ölçülen absorbens değeri})$

3.9. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Dokuda SOD aktivitesi Mylroie ve diğ. (1986) tarafından geliştirilen yöntem ile tayin edildi. Riboflavin floresans etkisi ile oluşan süperoksit radikali ortamdaki enzim yardımıyla H_2O_2 'ye dönüşür. H_2O_2 ile oluşan o-dianisidin reaksiyona ile meydana gelen ürünün absorbensı spektrofotometrede 460 nm'de ölçülür.

SOD aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Mylroie ve diğ. (1986) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi:

Kör, numune ve standart tüplerine sırasıyla, 1.35 mL, 1.3 mL ve 1.3 mL olacak şekilde SOD tamponu konuldu. Ardından tüm tüplere 50 μ L o-dianisin ilavesi yapıldı. Örnek tüpüne, 50 μ L doku homojenizatı, standart tüpüne de 50 μ L standart konulduktan sonra tüm tüplere 0.1 mL riboflavin ilavesi gerçekleşti. Örnek ve standart tüplerinin absorbensları, kör tüpüne karşı okundu. İlk kaydedilen değerler 0. dakika olarak kaydedildi. 8 dakika boyunca tüm tüpler, floresans ışığı altında bekletildi. 8 dakika sonunda, köre karşı örnek ve standart absorbensları okundu.

Ölçümler için 460 nm dalga boyu kullanıldı. Örnekler için SOD aktivitesinin hesaplanması için, 8. ve 0. dakikalar arasında elde edilen absorbensların farkı alındı. Bu absorbens farkı, standart eğri grafiğinden elde edilen denkleme yerleştirildi ve örnekler için aktivite değerleri hesaplandı.

Elde edilen aktivite değerleri, örneklerin protein değerlerine oranlanarak spesifik aktiviteleri belirlendi. Spesifik aktivite sonuçları U/mg protein olarak verildi.

3.10. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Dokuda glutatyon peroksidaz aktivitesi (GPx), Wendel (1981) metoduna göre belirlendi. Enzim, H_2O_2 varlığında, indirgenmiş glutatyonun okside glutatyona yükseltgenmesini katalizler ve oluşan ürün, ortamdaki $NADPH+H^+$ ve GR vasıtasıyla tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşür. $NADPH+H^+$ 'ın $NADP^{++}$ 'ya oksidasyonu ile meydana gelen absorbans azalışı 366 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktivitesi bulunur.

GPx aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Wendel (1981) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi:

Kör tüpüne 0.6 mL, örnek tüpüne ise 0.4 mL olacak şekilde GPx tamponu konuldu. Doku homojenizatından 0.2 mL örnek tüpüne ilave edildi. Ardından kör ve örnek tüplerine, 0.1 mL 10 mM GSH, 0.1 mL 2.5 mM NADPH, 0.1 mL GR eklendi. Reaksiyon, ortama 0.1 mL H_2O_2 ilavesi yapıldıktan sonra başladı ve örnek tüplerindeki absorbans azalması 5 dakika boyunca, köre karşı 366 nm'de ölçüldü.

Örneklerin GPx aktivitesi, aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

$$U/L = (\Delta OD/5) \times 803$$

ΔOD : İlk ölçüm ve son ölçüm arasındaki absorbans değişimi

Spesifik aktivite ise aktivite değerinin örneklerin protein değerlerine oranı ile belirlendi. Sonuçlar U/g protein olarak verildi.

3.11. GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Dokuda glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi, Beutler (1971) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde prensip, okside glutatyonun, enzim yardımıyla indirgenmiş glutatyon haline dönüşümü sırasında yükseltgenen NADPH+H⁺ miktarı hesaplanmaktadır. Bu değişim, 340 nm’de absorbans azalması ile takip edilir.

GR aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Beutler (1971) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi:

Kör ve örnek tüplerine sırasıyla 0.9 mL ve 0.87 mL GR tamponu eklendi. Ardından tüm tüplere 50 µL NADPH+H⁺ ve GSSG ilave edildi. Örnek tüplerine 30 µL doku ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. Örneklerdeki absorbans değişimi, köre karşı 5 dakika boyunca 340 nm’de takip edildi. Enzim aktivitesi şu şekilde hesaplandı:

$$\text{Aktivite (U/mL)} = \Delta\text{OD} \times 1.07$$

ΔOD : İlk ölçüm ve son ölçüm arasındaki absorbans değişimi

Spesifik aktivite, hesaplanan enzim aktivitesinin mL başına doku protein değerine oranlanması ile hesaplandı.

3.12. GLUTATYON-S-TRANSFERAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi, Habig ve Jakoby (1981) metoduna göre belirlendi. Yöntem, enzim varlığında indirgenmiş glutatyon ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin konjugasyonu sonucu oluşan glutatyon-2,4-dinitrobenzen isimli ürünün absorbansının 340 nm’de ölçülmesi esasına dayanır.

GST aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Habig ve Jakoby (1981) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin Yöntemi :

Kör tüpüne 0.5 mL destile su ve örnek tüplerine de 0.5 mL doku homojenizatlarından konuldu. Tüm tüplere 1.5 mL GST tamponu, 50 µL GSH ve 50 µL CDNB ilave edildikten sonra son hacim 3 mL'ye destile su ile tamamlandı. Örnek tüplerinin absorbanlarındaki artış, kör tüpündeki absorban değişimine göre kaydedildi. Ölçümler 3 dakika boyunca, spektrofotometrik olarak 340 nm'de gerçekleştirildi. Örneklerdeki GST aktivitesi şu şekilde hesaplandı:

$$\text{Aktivite (U/mL)} = [\Delta\text{OD}/3] \times 0.625 \times f$$

ΔOD : İlk ölçüm ve son ölçüm arasındaki absorban değişimi, f: Seyreltme faktörü

Spesifik GST aktivitesi, hesaplanan enzim aktivite değerinin doku başına mg protein değerlerine bölünmesi ile elde edildi.

3.13. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ TAYİNİ

Reaktif oksijen türleri (ROT) miktarı, 2',7'-dikloroflorosein (DCF) kullanılarak belirlendi. DCF, oksidan miktarına duyarlı ve floresan özellik gösteren bir maddedir. Reaksiyonda kullanılan diasetat formu, ortamdaki ROT miktarına göre oksidasyona uğrayarak DCF'i oluşturur.

ROT tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Zhang ve diğ. (2018) tarafından geliştirilen metodda belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi :

8x12 düzeninde ve spektrofotometrik tayinler için kullanılan bir siyah plate'de hazırlıklar yapıldı. Kör tüpü olarak işaretlenen kuyucuğa 5 µL DMSO, 55 µL ROT tamponu ve 90 µL DCF-diasetat ilave edildi. Örnek tüpü için ise 5 µL doku homojenizatı, 55 µL ROT tamponu ve 90 µL DCF-diasetat konulduktan sonra, tüm kuyucukların eksitasyon değerleri 480 nm'de ve emisyon değerleri ise 535 nm'de ölçüldü. Ölçümler arasındaki beklemler 30 dakika boyunca 37 °C'de yapıldı. Emisyon değerlerinden eksitasyon değerleri çıkartılarak ROT miktarları hesaplandı.

3.14. TOTAL OKSİDAN SEVİYELERİ TAYİNİ

Dokulardaki total oksidan seviyeleri (TOS), Erel (2005) tarafından geliştirilen metoda göre belirlendi. Bu yöntemle göre, ortamdaki oksidan maddeler, ferröz iyonu ferrik iyonla asidik ortamda okside etmektedir ve oluşan ferrik iyon, ksilenol oranj yardımıyla belirlenmektedir.

TOS miktar tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Erel (2005) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin Yöntemi:

8x12 düzeninde bir plate kullanılarak, kör, numune ve standart için kuyucuklar hazırlandı. Reaktif I çözeltisinden kör, numune ve standart kuyucukları için 225 µL alındı ve sırasıyla 35 µL destile su, doku örneği ve standart eklendi. Tüm kuyucuklara 11 µL Reaktif II çözeltisinden konuldu ve plate 10 dakika boyunca 37 °C’de bekletildi. Ardından tüm kuyucukların absorbansı plate okuyucuda 630 nm’de havaya karşı okundu. Çeşitli H₂O₂ konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar ile çizilen standart eğri grafiği yardımı ile doku örneklerine ait TOS miktarı bulundu. Bu TOS miktarları, her örneğin kendi protein değerine oranlanarak g protein başına karşılık gelen H₂O₂ konsantrasyonu hesaplandı.

3.15. İLERİ OKSİDE PROTEİN ÜRÜNLERİ TAYİNİ

Reaktif oksijen türlerinin proteinler üzerine direkt olarak etki etmesi sonucunda, amino asitlerin yan zincirlerinde oksidasyon meydana gelmektedir. Bu yapılar, özellikle tirozin amino asidine etki ederek ditirozinin oluşmasına yol açar. Oluşan bu ürünler, proteinlerin yapısında değişiklikler meydana getirir ve agregasyonlarına yol açar. Bu ürünlere ileri oksidasyon protein ürünleri (advanced oxidized protein products, AOPP) adı verilir. AOPP tayini, Witko-Sarsat ve diğ. (1996) metoduna göre yapılmıştır.

AOPP miktar tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Witko-Sarsat ve diğ. (1996) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin Yöntemi :

Kör ve örnek tüplerine sırasıyla, 2 mL ve 1.6 mL AOPP tamponu konuldu. Örnek tüpüne ¼ oranında seyreltilmiş doku örneği ilave edildikten sonra, tüm tüplere 0.1 mL 1.16 M potasyum iyodür eklendi. Örnekler, sırasıyla 2'şer dakika spektrofotometrede küvetin içinde bekletildi. Tüm tüplere 0.2 mL derişik asetik asit ilave edildikten sonra, oluşan ürünün absorbansı 340 nm'de köre karşı okundu.

Elde edilen absorbanslar, aşağıda belirtilen formülde yerine konularak hesaplandı.

$$\text{AOPP miktarı (nmol/mg protein)} = \left(\frac{\text{Abs}}{261} \times \frac{V_{\text{toplaml}}}{V_{\text{örnek}}} \times f \right) / \text{mg protein}$$

261: Ekstinksiyon katsayısı

3.16. ARGİNAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Arginaz aktivitesi, Geyer ve Dabich (1971) tarafından geliştirilen metoda göre tayin edildi. Diasetil monoksım, asidik reaksiyon koşullarında diasetil ve hidroksilamine hidroliz olduktan sonra, diasetil, asit çözeltisinde üre ile birleşerek, sarı renkli diazini oluşturur. Oluşan bu rengin sabit kalması için ortama tiyosemikarbazid ve demir (II) iyonları ilave edilir.

Arginaz aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Geyer ve Dabich (1971) tarafından geliştirilen metodda belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi:

Arginaz aktivitesinin tayini için, böbrek homojenizatları öncelikle bir ön-inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Bu işlemde, 10 µL doku alındı ve 1 mM MnCl₂ çözeltisi ile 6 mL'ye seyreltildi. Örnek tüpleri bu şekilde, 20 dakika boyunca 65 °C'de bekletildi. Ardından tüpler soğutuldu ve aşağıda belirtilen deneysel prosedür uygulandı.

Örneklerin "Sıfırncı zaman" tüpü için tüplerin hazırlanması :

Kör tüpü : 0.5 mL destile su + 1.5 mL asit ayırıcı + 1 mL renk ayırıcı

Çalışma Standardı tüpü : 0.5 mL çalışma standardı + 1.5 mL asit ayırıcı + 1 mL renk ayırıcı

Sıfırıncı zaman tüpü : 0.15 mL substrat (L-arginin) + 0.2 mL karbonat tamponu + 0.15 mL pre-inkübe örnek + 1.5 mL asit ayırıcı + 1 mL renk ayırıcı

Örneklerin “Deney” tüplerinin hazırlanması :

Deney tüpü : 0.15 mL substrat (L-arginin) + 0.2 mL karbonat tamponu + 0.15 mL pre-inkübe örnek Bu aşamada deney tüpleri, 37 C’de 10 dakika bekletilir.

Tüm tüpler hazırlandıktan sonra 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Soğutma işleminin ardından, örnek (*sıfırıncı zaman* ve *deney* tüpleri) ve standart tüplerin absorbansı, kör tüpüne karşı 520 nm’de ölçülür.

Arginaz aktivitesinin hesaplanması aşağıda belirtilen formüle göre yapılmaktadır :

Aktivite ($\mu\text{mol üre/mL}$) = Faktör x (*Deney absorbansı – Sıfırıncı zaman absorbansı*)

$$\text{Faktör} = \left[\frac{\text{Standart konsantrasyonu} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 6 \times 3.33}{\text{Standart absorbansı}} \right]$$

Arginaz spesifik aktivite değeri, hesaplanan aktivite değerinin dokunun protein değerine oranlanması ile elde edildi.

3.17. MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Böbrek dokusunda miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin tayini Wei ve Frankel (1991) yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde MPO aktivitesi, enzim ve H₂O₂ aracılığı ile yapılan oksidasyon için 4-aminoantipirin/fenol karışımının substrat olarak kullanılması ile tayin edildi.

MPO aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Wei ve Frenkel (1991) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi :

Kör ve numune tüplerine sırasıyla 1.3 mL AAP ve 1.3 mL fenol çözeltilerinden konuldu. Tüpler karıştırıldı ve ardından 1.5 mL H₂O₂ ilave edildi. H₂O₂ ilavesinden sonra, tüpler 3-4 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırıldı ve kör tüpüne 0.3 mL destile su, örnek tüpüne de 0.3

mL doku homojenizatu ilavesi yapıldıktan sonra, tüplerin absorbanası 510 nm’de köre karşı ölçüldü.

MPO aktivitesi aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı.

$$\text{MPO Aktivitesi (U/g doku)} = [(\Delta\text{OD} * 4300)/7100] / \text{g doku}$$

$\Delta\text{OD} = 0.$ ve $5.$ dakikalarda ölçülen absorbanas farkları

3.18. GLİKOPROTEİN MİKTAR TAYİNLERİ

3.18.1. Glikoprotein Miktar Tayinleri İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

0.2 mL % 0.9’luk doku homojenizatu alındı. Üzerine 0.4 mL 2N HCl ve 0.4 mL %1’lik fosfotungstik asit çözeltileri ilave edildi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatıldı ve 4 saat boyunca 100 °C’de etüvde bekletildi. Ardından, hidrolizatlar santrifüj edildi ve her örneğin pH değeri 4N NaOH ile 7.0’a ayarlandı.

3.18.2. Fukoz Miktar Tayini

Dokuda fukoz miktar tayini Dische ve Shettles (1948) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemin esası, karbohidratların asidik ortamda ortamda -SH grupları ile verdiği renk reaksiyonuna dayanmaktadır.

Fukoz miktarı tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Dische ve Shettles (1948) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Tayin yöntemi :

Her örnek için bir örnek ve bir örnek körü tüpü alındı. Örnek ve örnek körü tüplerine 1 mL hidrolizat konulduktan sonra buz banyosu içerisinde tüm tüplere 4.5 mL asit çözeltisi ilave edildi. Tüpler önce, 3 dakika boyunca 22 °C’de ardından 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletildi. Tüm tüpler soğutulduktan sonra, örnek tüplerine 0.1 mL sistein-HCl çözeltisi eklendi.

Standart, kör ve sisteinsiz kör olarak işaretlenen tüplere ise hidrolizat yerine sırasıyla 1 mL standart çözeltisi, 1 mL destile su ve 1.1 mL destile su konuldu. Örnek ve örnek körü için yapılan diğer tüm işlemler, bu tüplere de uygulandı.

Tüpler karıştırıldıktan sonra 1 saat boyunca karanlıkta bekletildi.

Tüm tüplerin absorbansları, havaya karşı 396 ve 430 nm dalga boylarında ölçüldü. Tüm örnekler için, 396 nm’de elde edilen absorbans değerlerinden 430 nm’de ölçülen absorbans değerleri çıkartıldı. Örnek için elde edilen farklardan örnek körü için elde edilen farklar çıkartıldıktan sonra standart eğri grafiği yardımıyla μg fukoz/mL olarak sonuç belirlendi. Bu sonuçlar, her örneğe ait mg protein/mL değerine bölünerek μg fukoz/mg protein olarak sonuç verildi.

3.18.3. Heksoz ve Heksozamin Miktar Tayini

Dokuda heksoz ve heksozamin miktarları tayini, Winzler (1955) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde, dokulardaki heksoz bileşikleri, konsantre sülfat asitli ortamda ve sıcakta orsinol ile muamele edildi. Heksozamin türevleri ise, p-dimetilbenzaldehit ve asetilaseton yardımıyla tayin edildi.

Heksoz ve heksozamin miktarı tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemlerin tayinlerinde kullanılan çözeltiler, Winzler (1955) tarafından geliştirilen metoddan belirtildiği gibi hazırlandı.

Heksoz miktar tayin yöntemi :

Kör tüpüne 200 μL destile su, numune tüpüne 200 μL hidrolizat ve standart tüpüne μL standart konuldu. Tüm tüplere μL orsinol ve 1.6 mL sülfat asidi çözeltisi ilave edildi ve 10 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletildi. Kaynama sürecinden sonra ani olarak soğutulan tüplerin absorbansları, 425 nm’de köre karşı ölçüldü. Elde edilen absorbanslardan yola çıkılarak, numunelerin içerdikleri heksoz bileşiklerinin miktarı, standart eğri grafiği yardımıyla μg glukoz/mL olarak belirlendi. Değerler, protein miktarlarına bölünerek μg glukoz/mg protein üzerinden son sonuç elde edildi.

Heksozamin miktar tayin yöntemi:

Kör tüpüne 0.1 mL asetilaseton çözeltisi, 0.1 mL destile su, numune tüpüne 0.1 mL asetilaseton çözeltisi ve 0.1 mL hidrolizat, standart tüpüne ise 0.1 mL asetilaseton ve glukozamin standardı konulduktan sonra tüm tüpler, 15 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletildi. Bu işlem sonrası soğutulan tüplerin hepsine 0.5 mL %96 etil alkol ve 0.1 mL Ehrlich ayırıcı ilave edildi. Son hacim etil alkol ile 1 mL'ye tamamlandı. Tüm tüpler 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Absorbans ölçümleri 530 nm'de yapıldı. Standart eğri grafiği yardımıyla her bir böbrek hidrolizatındaki heksozamin miktarı µg glukozamin/mL cinsinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlar doku protein miktarı ile oranlanarak µg glukozamin/mg protein şeklinde değerlendirildi.

3.19. KSANTİN OKSİDAZ AKTİVİTE TAYİNİ

Ksantin oksidaz (XO) aktivitesinin tayini, Corte ve Stirpe'nin (1968) geliştirdiği metoda göre tayin edildi. Bu yöntemde reaksiyon sonucu oluşan ürik asidin absorbansı 286 nm dalga boyunda ölçüldü.

XO aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Corte ve Stirpe (1968) tarafından geliştirilen metodda belirtildiği gibi hazırlandı.

XO aktivite tayin yöntemi :

Kör tüpüne 0.88 mL, numune tüpüne de 0.87 mL fosfat tamponu konuldu. Her iki tüpe de 0.033 mL ksantin ve 0.033 mL EDTA ilave edildikten sonra 10 µL doku homojenizatı eklenmesi ile sıfıncı zaman absorbansları 286 nm'de köre karşı okundu. 10 dakika boyunca 24 °C'lik su banyosunda bekletilen tüplerin absorbansları tekrardan ölçüldü.

Ksantin oksidaz aktivitesi şu formüle göre hesaplandı :

$$\text{XO aktivitesi (U/mL)} = ((\text{Abs}_{10. dk} - \text{Abs}_{0. dk})/10)$$

XO spesifik aktivitesi, hesaplanan enzim aktivitesinin doku başına protein değerine bulunması ile hesaplandı.

3.20. SODYUM POTASYUM ATPaz AKTİVİTESİ TAYİNİ

Sodyum potasyum ATPaz (Na^+/K^+ -ATPaz) aktivitesi, Ridderstap ve Bonting (1969) tarafından geliştirilen yöntemle göre belirlendi. Bu yöntemle göre, numunenin ATP ile inkübasyonu sırasında, ATP hidrolizi ile inorganik fosfat açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan bu fosfat miktarının belirlenmesi için, önce total ATPaz tayin edilir. Ardından ouabain varlığında Mg^{2+} -ATPaz tayin edilir. Aradaki fark sayesinde enzim aktivitesi belirlenir.

Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Ridderstap ve Bonting (1969) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi tayin yöntemi :

Tüpler aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı.

Numune körü : 0.75 mL A çözeltisi + 0.6 mL destile su + 0.55 mL ATP çözeltisi

Total ATPaz tüpü : 0.75 mL A çözeltisi + 0.5 mL destile su + 0.55 mL ATP çözeltisi

Mg -ATPaz tüpü : 0.75 mL B çözeltisi + 0.5 mL destile su + 0.55 mL ATP çözeltisi

Hazırlanan tüpler, 37 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Total ATPaz ve Mg -ATPaz tüplerine 0.1 mL doku homojenizatu ilave edildikten sonra, 37 °C’de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Ardından tüm tüplere, buz banyosu içinde 0.1 mL %100 TCA ilave edildi. 10 dakika boyunca buz banyosunda bekletilen tüpler, 3000 rpm’de 10 dakika santrifüje edildi.

Santrifüj sonrası ikinci kısımda ise üst fazda fosfor miktarı tayin edildi :

Numune körü, total ATPaz ve Mg -ATPaz üst fazlarından alınan 0.5 mL tüplere aktarıldı. Standart körüne 0.5 mL %5 TCA, çalışma standardı tüpüne 0.5 mL çalışma standardı konuldu. Ardından tüm tüplere, 0.1 mL amonyum molibdat çözeltisi, 0.04 mL Fiske-Subarrow reaktifi, 0.36 mL destile su ilave edildi. Tüpler karıştırıldıktan sonra, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında beklendi. Total-ATPaz ve Mg -ATPaz tüplerinin absorbansları numune körüne karşı, standart tüplerinin absorbansları ise standart körüne karşı 680 nm’de ölçüldü.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı :

$$\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz aktivitesi } (\mu\text{mol Pi } /(\text{mg protein x h})) = [645 \times A] / [\% \text{ mg protein x 60}]$$

A : standart eğri grafiğinden elde edilen %mg fosfor değeri

3.21. KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Böbrek dokusunda karbonik anhidraz (CA) aktivitesi, Verpoorte ve diğ. (1968) tarafından geliştirilen metoda göre tayin edildi.

CA aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Verpoorte ve diğ. (1968) tarafından geliştirilen metodda belirtildiği gibi hazırlandı.

CA aktivite tayin yöntemi:

Kör ve numune tüplerine sırası ile 1.5 mL ve 1.4 mL olacak şekilde deney tamponu konuldu. Doku homojenizatından 0.1 mL ilave edildikten sonra, hem kör hem de numune tüplerine 1.5 mL substrat eklendi. Numune tüplerinin absorbanı, kör tüpüne karşı 348 nm’de 5 dakika boyunca spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Böbrekte karbonik anhidraz aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{CA Aktivitesi } (U/ml) = \Delta\text{OD} * 1200$$

Aktivite değeri, her numune için belirlenen protein miktarına bölünerek, spesifik aktivite değerleri belirlendi.

3.22. TOTAL PROTEİN TAYİNİ

Dokuda total protein tayini, Lowry ve diğ. (1951) tarafından geliştirilen metoda göre tayin edildi. Bu yöntem, proteinlerin yapısındaki aromatik halka ihtiva eden amino asitlerin folin reaktifi (fosfo molibdo tungstik asit) ile mavi renk vermesi ve fosfo molibdo tungstik asidi indirgemeleri esasına dayanır.

Total protein miktar tayininde kullanılan çözeltiler:

Bu yöntemin tayininde kullanılan çözeltiler, Lowry ve diğ. (1951) tarafından geliştirilen metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

Total protein tayin yöntemi:

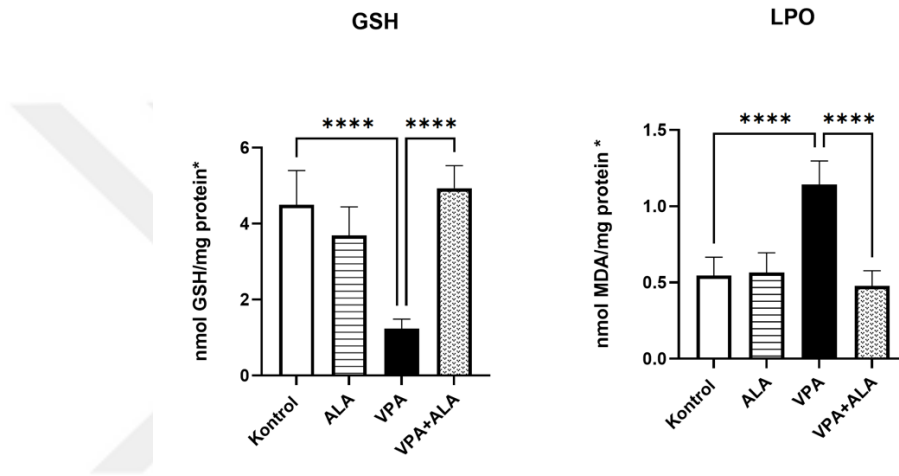
Kör tüpüne 0.5 mL serum fizyolojik, numune tüplerine 0.5 mL seyreltik doku homojenizatı, standart tüplerine ise 0.5 mL standart ilave edildikten sonra tüm tüplere 2.5 mL C reaktifi eklendi. Tüpler karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından bütün tüplere Folin çalışma çözeltisinden 0.25 mL ilave edilerek yine oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Numune ve standart tüplerinin absorbansları, 500 nm’de kör tüpüne karşı okundu. Doku örneklerine ait protein miktarı, standart eğri grafiği çizilerek mg/100 mL olarak hesaplandı.

3.23. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

DeneySEL prosedür uygulaması sonucunda elde edilen tüm biyokimyasal sonuçlar, Graphpad Prism 9.0 istatistik programına göre değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

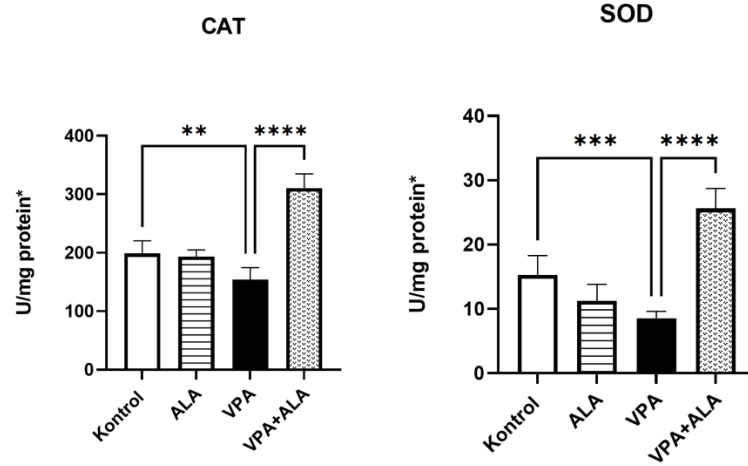
Çalışmamızda, VPA ile oluşturulan böbrek hasarında ALA'in böbrek dokusu üzerine olan koruyucu etkilerini incelemek amacıyla çeşitli biyokimyasal parametrelere bakıldı. Elde edilen sonuçlar, Şekil 4.1-4.7 arasında gösterildi.



Şekil 4.1: Tüm deney gruplarına ait böbrek GSH ve LPO değerleri.

*Ortalama $\pm$ Standart sapma, **** $p < 0.0001$.

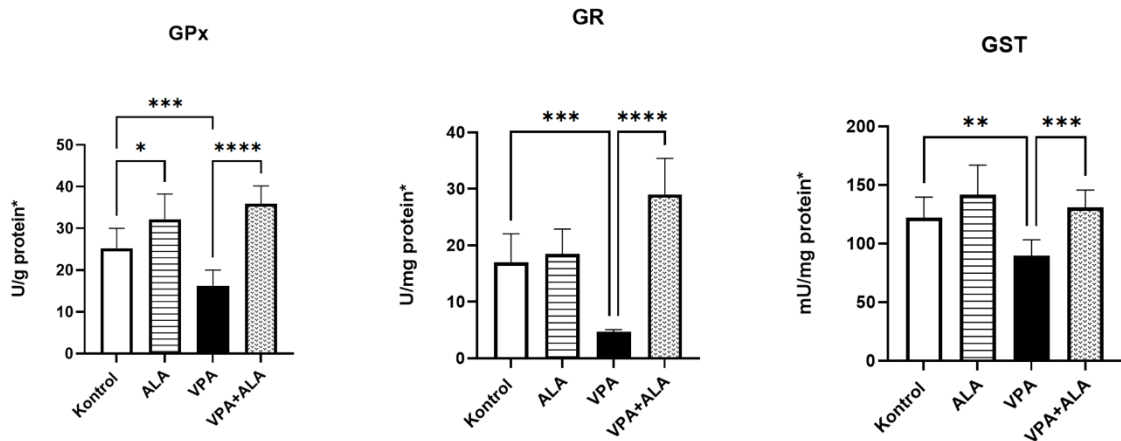
Tüm deney gruplarına ait böbrek GSH ve LPO seviyeleri Şekil 4.1'de verildi. Kontrol grubuna göre, VPA grubuna ait GSH seviyelerinde anlamlı bir azalma görülürken (**** $p < 0.0001$), LPO seviyelerinde ise anlamlı bir artış olduğu belirlendi (**** $p < 0.0001$). VPA grubuna ALA uygulanması ile, GSH ve LPO seviyelerinde sırasıyla, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ve anlamlı bir artış olduğu saptandı (**** $p < 0.0001$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.2: Tüm deney gruplarına ait böbrek CAT ve SOD aktivite değerleri.

*Ortalama $\pm$ Standart sapma, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 4.2’de kontrol ve deney gruplarına ait CAT ve SOD aktivite değerleri gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, VPA grubuna bağlı, CAT ve SOD aktivite değerlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenirken (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), VPA grubuna ALA uygulanması ile anlamlı bir artış olduğu saptandı (**** $p < 0.0001$) (Şekil 4.2).



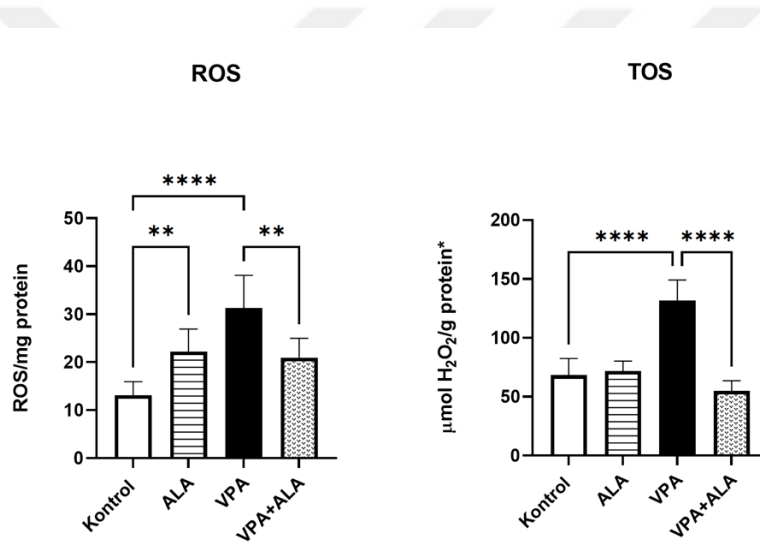
Şekil 4.3: Tüm deney gruplarına ait böbrek GPx, GR ve GST aktivite değerleri.

*Ortalama $\pm$ Standart sapma, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 4.3'te dört gruba ait GPx, GR ve GST aktiviteleri verilmiştir. Kontrol grubu ile ALA gruplarına ait GPx aktiviteleri karşılaştırıldığında, bu enzim aktivitesinde anlamlı bir artma (* $p < 0.05$) olduğu belirlendi.

Kontrol ve VPA gruplarına ait GPx, GR ve GST aktiviteleri karşılaştırıldığında ise, VPA grubuna ait bu enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği saptandı (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). VPA grubuna ALA uygulanması ile GPx, GR ve GST aktivitelerinde, VPA grubuna göre anlamlı bir artma gözlemlendi (*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) (Şekil 4.3).

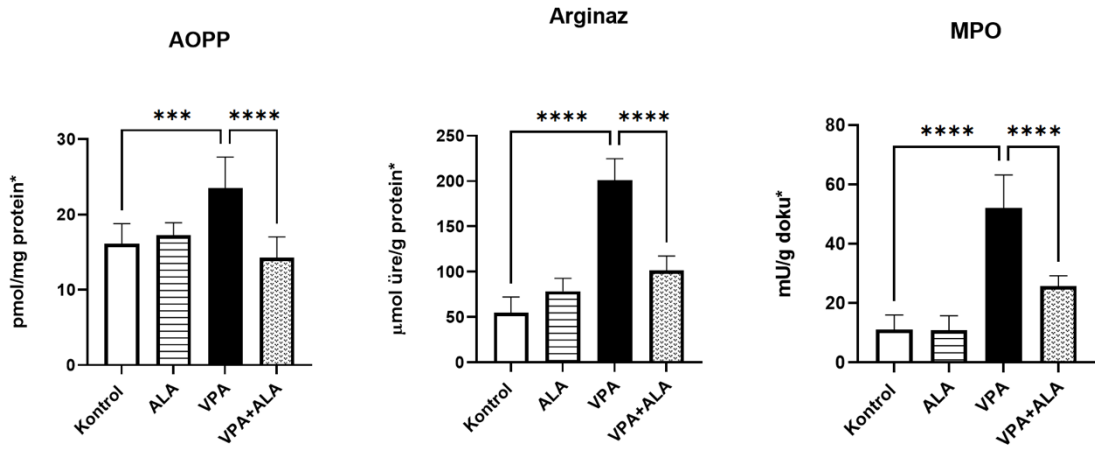
Kontrol ve deney gruplarının ROT ve TOS değerleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Tüm deney gruplarına ait böbrek ROS ve TOS değerleri.

*Ortalama $\pm$ Standart sapma, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

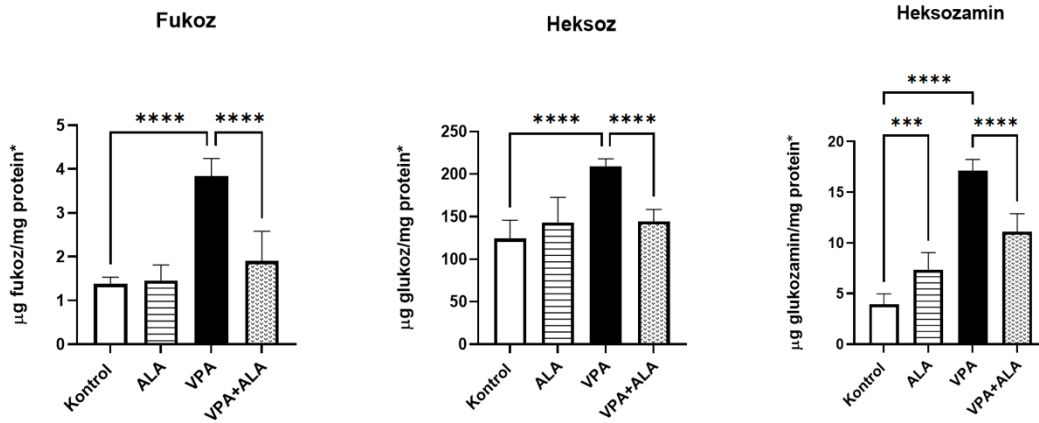
Elde edilen verilere göre, kontrol grubu ALA grubu ile karşılaştırıldığında, ROS değerlerinde anlamlı bir artma gözlemlendi (** $p < 0.01$). ROT ve TOS miktarları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında VPA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (**** $p < 0.0001$). VPA grubuna ALA uygulanması ile bu değerler, anlamlı olarak azaldı (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.5: Tüm deney gruplarına ait böbrek AOPP seviyeleri ile arginaz ve MPO aktiviteleri.

*Ortalama $\pm$ Standart sapma, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

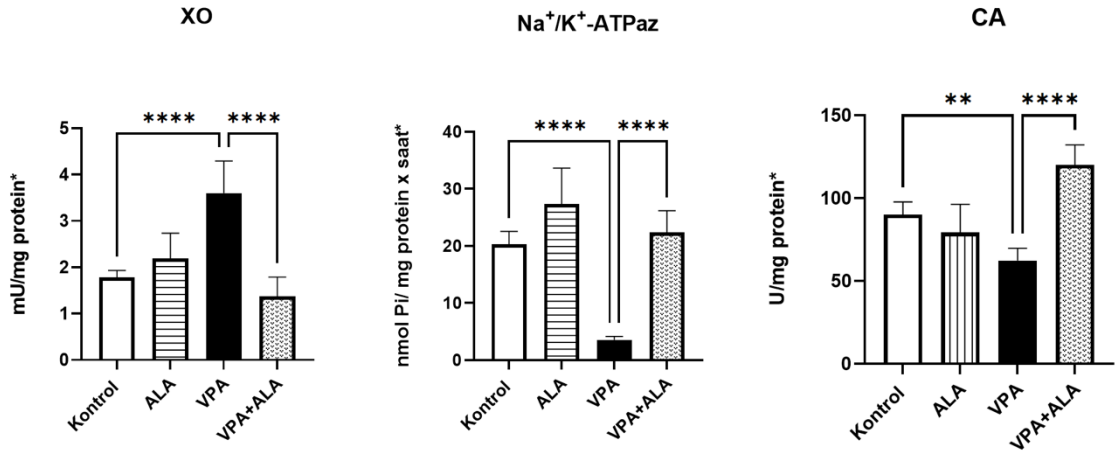
Dört grubun AOPP seviyeleri ile arginaz ve MPO aktiviteleri Şekil 4.5'te belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, AOPP seviyeleri, arginaz ve MPO aktivitelerinde VPA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). VPA grubuna ALA uygulanması bu değerleri ve aktiviteleri tersine çevirdi (**** $p < 0.0001$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.6: Tüm deney gruplarına ait böbrek fukoz, heksoz ve heksozamin değerleri.

*Ortalama $\pm$ Standart sapma, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Şekil 4.6’da tüm deney gruplarına ait Fukoz, Heksoz ve Heksozamin değerleri gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, VPA grubunun fukoz, heksoz ve heksozamin değerlerinde anlamlı bir artış oluşurken (*** $p < 0.0001$), VPA+ALA grubu için bu değerler anlamlı bir şekilde azalmıştır (**** $p < 0.0001$). Heksozamin değerlerinin, ALA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir arttığı tespit edilmiştir (*** $p < 0.0001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.7: Tüm deney gruplarına ait böbrek XO, Na⁺/K⁺-ATPaz ve CA aktiviteleri.

*Ortalama $\pm$ Standart sapma, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Dört gruba ait XO, Na⁺/K⁺-ATPaz ve CA aktiviteleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre, VPA grubuna ait XO aktivitelerinde anlamlı bir artış görülürken (**** $p < 0.0001$), Na⁺/K⁺-ATPaz ve CA aktivitelerinde ise anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$). ALA uygulanan VPA grubuna ait enzim aktiviteleri ise anlamlı şekilde tersine çevrildi (**** $p < 0.0001$) (Şekil 4.7).

5. TARTIŞMA

ALA, doğal olarak bulunan bir ditiyol bileşiğidir. α -keto glutarat dehidrogenaz, dallanmış zincirli amino asit dehidrogenaz ve piruvat dehidrogenaz enzim komplekslerinde kofaktör olarak rol almasından dolayı enerji metabolizmasında da modülatör olarak görev yapmaktadır (Solmonson ve DeBerardinis, 2018; Yang ve diğ., 2019; Zaazaa ve diğ., 2019). Hem hidrofilik hem de lipofilik karakterinden dolayı önemli bir antioksidan madde olan lipoik asit, reaktif azot ve oksijen gibi oksidatif metabolizma ürünlerinin etkisizleştirilmesinde de etkindir (Khalifa ve diğ., 2020).

Çalışmamızda, VPA ile oluşturulan böbrek hasarı üzerine ALA'nın koruyucu etkileri araştırılması hedeflenmiştir. Böbrek doku homojenizatlarında indirgenmiş glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyonu (LPO) seviyeleri ile katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-S-transferaz (GST) aktiviteleri, reaktif oksijen türleri (ROT) ve total oksidan seviyeleri (TOS), ileri okside protein ürünleri seviyeleri (AOPP), arginaz ve miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri, ksantin oksidaz (XO), sodyum potasyum ATPaz (Na^+/K^+ -ATPaz) ve karbonik anhidraz (CA) aktiviteleri, fukoz, heksoz ve heksozamin düzeyleri tayin edilmiştir.

GSH, L- γ -glutamil-L-sisteinilglisin, hücre bileşenlerinde nonprotein yapılı ve tiyol grubu kökenli olan maddelerin büyük bir bölümünü oluşturan bir tripeptittir. Bazı enzimlerin aktiviteleri için vazgeçilmez bir kofaktör olarak da görev yapmaktadır (Veljkovic ve diğ., 2012). Glutatyonun -SH grubu, bu tripeptide kuyvvetli bir nükleofilik karakter sağlar. Kükürt, -2, -1, 0, +2, +4 ve +6 gibi çeşitli oksidasyon basamaklarına sahiptir ve bu özellik, nükleofilik karakter ile redoks kabiliyetinin bir birleşimidir. GSH bu özellik sayesinde, elektronları yakalayabilir ve birçok ilaç, karsinojenler ile aerobik reaksiyonlar sonucunda da meydana gelen sitotoksik reaktif moleküllerini etkisiz hale getirebilir (Dringen ve diğ., 2015; Hernández ve diğ., 2015). Lipid peroksidasyonu reaksiyonları ise, ROT oluşumunun artışının negatif bir sonucudur ve hücre membranı yapısı ile fonksiyonlarının geri dönüşümsüz olarak hasar aldığı bir göstergesidir. Tiyobarbütirik asit-reaktif ürünleri, bu reaksiyonlar sonucunda

oluşan son ürünlerdir ve lipid peroksidasyonu seviyeleri için bir belirteç olarak kabul edilir (Veljkovic ve diğ., 2012).

Bazı araştırmacılar, VPA'nın artan konsantrasyonlarının GSH seviyeleri ile ortamdaki antioksidan kapasitede önemli bir azalma meydana geldiğini, bu azalmanın da GLUT1, GLUT4 ve Nrf2 ekspresyonlarının azalmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir (Heidari ve diğ., 2018; Arslan ve diğ., 2023). Buna ek olarak VPA'nın LPO seviyelerinde artma meydana getirmesinin, indirgenmiş glutatyon seviyelerindeki azalma neticesinde membranlardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile ilişkili olduğu literatürde belirtilmektedir (Khodayar ve diğ., 2021). Çalışmamızda, VPA uygulanan sıçanlara ait böbrek dokularında, kontrol grubuna göre GSH seviyelerinin azaldığı, LPO seviyelerinin ise artış gösterdiği belirlendi. ALA'nın glutatyon gibi endojen antioksidanları rejenere edebilme özelliğinin olduğu ve GSH seviyelerini çeşitli dokularda arttırdığı bilinmektedir (Öztaylan ve diğ., 2022; Tong ve diğ., 2022). Çalışmamızda VPA grubuna lipoik asit verilmesi ile GSH seviyelerinde artma olduğu saptandı. ALA'nın GSH üzerinde meydana getirdiği bu artışın LPO seviyelerinin de azalması yönünde etki ettiği ve böbrek üzerinde koruyucu etki gösterdiği öne sürülebilir.

Reaktif oksijen türleri, hem serbest radikal hem de serbest radikal kaynaklı olmayan oksijenlenmiş moleküllerden oluşan zararlı maddelerdir. Bu moleküller, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), singlet oksijen ($1/2 O_2$) ve hidroksil radikali olmakla beraber reaktif azot, demir, bakır ve kükürt kaynaklı yapılar da reaktif türlerden sayılmaktadır (Halliwell ve diğ., 1992; Riley, 1994). Oksidatif stres ve redoks dengesindeki bozulmaların sonucunda oluşan bu reaktif türler, birçok doku ve organda hasar oluşmasına sebep olmaktadır. Vücutta bu negatif etkilerin ortamdaki kaldırılması için gerek enzimatik gerekse enzimatik olmayan antioksidanlara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda CAT, SOD, GPx ve GR gibi enzimatik antioksidanların aktiviteleri tayin edilmiştir. CAT, SOD ve GPx'in serbest radikal kaynaklı olarak oluşan hücre hasarında koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Singal ve diğ., 2000). SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir ve burada oluşan hidrojen peroksit, CAT ve GPx tarafından detoksifiye edilmektedir (Yen ve diğ., 1996; Maritim ve diğ., 2003). GR ise, yükseltgenmiş glutatyonun indirgenmiş glutatyonla rejenerasyonunu katalizleyen enzimdir (Ahmadpoor ve diğ., 2009). Çalışmamızda CAT, SOD, GPx ve GR aktivitelerinin VPA uygulanması ile azaldığı tespit edildi. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, VPA tarafından oluşumu tetiklenen serbest radikallerin miktarının arttığı ve buna bağlı olarak enzim aktivitelerinde azalma meydana geldiği öne sürülebilir.

Sonuçlarımız çeşitli dokular üzerinde VPA toksisitesinin araştırıldığı çalışmaların bulguları ile uyumludur (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2016; Oztay ve diğ., 2020). VPA grubuna ALA uygulanması ile VPA grubuna ait böbrek CAT, SOD, GPx ve GR aktivitelerinde artış gözlemlendi. ALA'nın böbrek hücreleri üzerindeki bu koruyucu etkisinin, literatürde de belirtildiği üzere ortamdaki oksidatif stresi azaltması ve antioksidan kapasiteyi arttırması ile gerçekleştiği öne sürülebilir (Kamt ve diğ., 2023).

Böbrekteki transport ve ksenobiyotik metabolizması, zehirsizleştirme ve potansiyel olarak toksik ksenobiyotiklerin atılımı açısından çok önemli bir rol oynamaktadır. Böbrekteki yüksek kan akış hızı ve böbreğin bazı maddeleri konsantre edebilme yeteneği, böbreğin sistemik sirkülasyonda bulunan ksenobiyotik ve bu özellikteki maddelere maruz kalmasına neden olur (Dekant, 2001). GST, potansiyel olarak karsinojen ve farmakolojik olarak aktif bazı bileşiklerin, glutatyonun yapısındaki tiyol grubu ile konjugasyonunu katalizleyen enzimdir. Bu konjugasyon sayesinde bu maddeler, suda çözünebilir bileşikler haline gelirken toksisiteyi azalır ve idrar ile atılımı kolaylaştırılmış olur (Hayes ve Strange, 2000; Simic ve diğ., 2009). Çeşitli böbrek rahatsızlıklarında bu enzimin gerek ekspresyonunun gerekse aktivitesinin değiştiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Simic ve diğ., 2009; Susantitaphong ve diğ., 2013). Çalışmamızda VPA uygulanan deney grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GST aktivitelerinin azaldığı belirlendi. Aktivitedeki bu azalma, VPA'nın meydana getirmiş olduğu oksidatif stres nedeniyle GSH seviyelerindeki azalma ile ilişkilendirilebilir. GST aktiviteleri, VPA ve lipoik asit uygulanan grupta ise, VPA grubuna göre bir artış gösterdi. Lipoik asidin glutatyon seviyelerini yükseltmede önemli rol oynadığı literatürde belirtilmiştir (Arivazhagan ve diğ., 2001). Sonuçlarımız bu bulgularla uyumludur.

Çalışmamızda, VPA uygulanan sıçanların böbrek dokularında tespit edilen CAT, SOD, GPx, GR ve GST aktivitelerindeki azalmaların temel sebebi, VPA tarafından oluşturulan oksidatif strestir. Anabilim Dalı'mızda VPA toksisitesi üzerine yapılan farklı çalışmalarda da bu enzim aktivitelerindeki değişikliklerin oksidatif stres ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Bayrak ve diğ., 2021; Dağsuyu ve diğ., 2023). Bu çalışmada, kontrol ve deney hayvanlarının böbrek dokularında ROT ve TOS seviyeleri incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, ROT ve TOS seviyeleri VPA grubuna ait böbrek dokularında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi. ROT ve TOS seviyelerindeki artış, VPA tarafından oksidatif stresin oluşturulduğunun bir göstergesidir. ALA'nın antioksidan özelliği sayesinde böbrek hasarlarında ROT oluşumunu önlediği, GSH rejenere ettiği (El-Beshbishy ve diğ., 2011) ve LPO ürünlerinden

malondialdehidin miktarını azalttığı (Çelik ve Ozkaya, 2002), GST aktivitelerini de arttırdığı (Haidari ve diğ., 2021) literatürde belirtilmektedir. Çalışmamızda ALA'nın bu etkisi, VPA+ALA uygulanan sıçanların böbrek ROT ve TOS değerlerinde azalma olacak şekilde belirlenmiştir.

AOPP, oksidatif stresin artmasıyla oluşan protein oksidasyon ürünleridir. Bu ürünler, ditirozin gibi protein oksidasyonu sonucunda oluşan ürünlerin yanı sıra, pentosidin gibi bir protein glikasyon ürünü ve neopterin gibi makrofaj aktivasyonu ile oluşan ürünler ile de etkileşime girmektedir (Witko-Sarsat ve diğ., 1996; 1998). AOPP, vücutta serbest radikal reaksiyonları ile meydana gelen hidrojen peroksit ile AOPP-hipoklorik asit (HOCl) yapısını oluşturarak NF- κ B aktivasyonu yoluyla inflamasyon oluşumunu tetikleyebilir (Guo ve diğ., 2008; Zheng ve diğ., 2013). Bu negatif etki böbrek tübüler epitelyal hücrelerini de olumsuz etkilemektedir (Cao ve diğ., 2013). MPO, nötrofillerde bulunan ve hem grubu içeren bir enzimdir. Hidrojen peroksidin hipoklorik aside dönüşümünü katalizleyen bir enzim olup, oksidatif stres durumlarında aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Kisic ve diğ., 2016). AOPP seviyeleri ve MPO aktivitesinin birbiriyle ilişkili oldukları bazı araştırmacılar tarafından literatürde belirtilmiştir. Witko-Sarsat ve diğ. (2003) yaptıkları bir araştırmada insan serum albümininin MPO tarafından oluşturulan HOCl gibi bir anyon ile reaksiyona girip okside protein ürünü oluşturduğunu rapor etmiştir. Buna ek olarak AOPP seviyelerinin kronik böbrek rahatsızlıklarında (Yang ve diğ., 2017), böbrek fibrozu (Li ve diğ., 2007) ve tip-I diyabet hastalarında görülen böbrek komplikasyonları (Mohammedi ve diğ., 2014) gibi durumlarda arttığı, MPO aktivitelerinin de iskemi-reperfüzyon, dejeneratif ve immünolojik glomerular böbrek hastalıklarında (Malle ve diğ., 2003) yükseldiği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Çalışmamızda AOPP seviyeleri ve MPO aktiviteleri, VPA ile böbrek hasarı oluşturulan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış gösterdi. ALA ve indirgenmiş versiyonu olan dihidrolipoik asidin, hem serbest radikal miktarının azaltılmasında hem de albüminin 34. pozisyonundaki sistein amino asidinin oksidasyonunu önlemekte önemli etkisinin olduğu literatürde bildirilmiştir (Atukeren ve diğ., 2010). ALA'nın protein oksidasyonunu da önleyici etkisi olduğu, çalışmamızda AOPP seviyelerinin ve MPO aktivitelerinin VPA+ALA grubunda azalması ile kanıtlanmıştır.

Arginaz, üre siklusunun son basamağında L-argininini L-ornitin ile üreye çeviren ve kofaktörü mangan olan bir enzimdir. Arginaz inhibisyonu ile böbrek protein ekspresyonlarının düzeldiği, histolojik değişikliklerin azaldığı ve lipid peroksidasyon ürünlerinin konsantrasyonlarının azaldığı You ve diğ. (2015) tarafından yayınlanmıştır. Arginaz aktivitesinin oksidatif stres ile de bağlantılı olduğu bilinmektedir (Yang ve Ming, 2013). Çalışmamızda, VPA verilen grupta

arginaz aktivitesinin arttığı ve bu gruba ALA verilmesi ile enzim aktivitesinin azaldığı tespit edildi. Enzim aktivitesindeki bu azalma, lipoik asidin oksidatif hasarı önleyici etkisinden kaynaklandığı öne sürülebilir.

XO, sitosolde bulunan ve purinlerin yıkımında rol oynayan oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir. Bazı araştırmacılar, ksantin oksidazın purin substratlarını (hipoksantin ve ksantin) moleküler oksijen varlığında ürik asit, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksitde dönüştürdüğünü, bu dönüşümün de serbest radikal oluşumunu tetikleyerek oksidatif stres ve inflamasyon miktarını arttırdığını belirtmişlerdir (Schmidt ve diğ., 2019; Al-Shehri ve diğ., 2020). Ayrıca meydana gelen ürik asit miktarının artmasının da böbrek rahatsızlıklarında rol oynadığı bilinmektedir (Ejaz ve diğ., 2020). Çalışmamızda XO aktivitesi, VPA verilen grupta artış göstermiştir. Bu gruba ait XO aktiviteleri ise ALA uygulanması ile azalmıştır. Yapısında kükürt bulunan ve sentezlenen yeni bileşiklerin, ksantin oksidaz üzerinde çok güçlü inhibitör etki gösterdiği Özerkan ve diğ. (2019) ve Song ve diğ. (2016) tarafından literatürde belirtilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda ALA'nın bu koruyucu etkisinin ve XO üzerindeki inhibitör etkisinin yapısındaki kükürten kaynakladığı sonucuna varılabilir.

Sodyum potasyum ATPaz, α ve β alt birimlerine sahip bir heterodimerik protein yapısında bir enzimdir. ATP'nin hidrolizi ile 3 adet sodyum iyonunun hücre dışına çıkışı ve 2 adet potasyum iyonunun hücre içine girişini sağlayan bu enzim, iyonların transmembran gradientini oluşturmalarına da yardımcı olur. Bu enzimin aktivitesi, hem böbrek hem de farklı dokularda gerek VPA gerekse diğer toksik maddelerden kaynaklı oluşan oksidatif stres koşulları altında azalmaktadır (Xu ve diğ., 2010; Koroglu-Aydın ve diğ., 2021). Bu çalışmada, VPA ile böbrek hasarı oluşturulan grupta sodyum potasyum ATPaz aktivitesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır. VPA+ALA grubunda ise ALA varlığında, enzimatik antioksidanların aktivitelerinin de düzelmesi ile oksidatif stresin azaldığı, dolayısıyla sodyum potasyum ATPaz aktivitelerinin de bu duruma bağlı olarak arttığı öne sürülebilir.

Vücutta asit-baz dengesinin dengeli bir şekilde sürdürülmesi, böbrek ve akciğerler tarafından kontrol edilmektedir. CA, çinko içeren bir metaloenzimdir ve birçok doku ve organda bulunmaktadır. Böbrekte bulunan karbonik anhidraz, hidrojen iyonu ve bikarbonat anyonunun atılım/geri emilim mekanizmasında hayati rol oynamaktadır (Dobyan ve Bulger, 1982; Wagner ve diğ., 2019). CA inhibe olduğu takdirde, böbrekteki oksijen tüketimi ve bikarbonat anyonu

emilimi azalmakta ve dolayısıyla hidrojen iyonu konsantrasyonu artarak hücre içi pH seviyesi düşmektedir (Swenson, 2000). Bu tez çalışmasında, VPA uygulanan deney grubuna ait böbrek dokularında, CA aktivitelerinin azaldığı tespit edildi. Bu gruba ALA uygulanması ile CA aktivitelerinde artış meydana geldiği gözlemlendi. Elde ettiğimiz bu sonuca göre, lipoik asidin hücre içi pH değerinin dengelenmesi üzerinde koruyucu etki gösterdiği öne sürülebilir.

Glikoproteinler, hücre membranında, intraselüler matrikste ve hücre içi organellerin membranında bulunan karbohidrat birimleri ile bağlanmış olan protein yapıdaki makromoleküllerdir ve hayvan hücrelerinin temel komponenti olarak bilinirler (Zachariah ve Basu, 1993; Saravanan ve diğ., 2010). Membran transportunda, hücre farklılaşmasında ve tanınmasında, makromoleküllerin sekresyonunda ve absorpsiyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Mittal ve diğ., 1996). Oksidatif stresin olduğu toksisite durumlarında, membran yapısının etkilendiği bilinmektedir (Stanely Mainzen Prince ve Kannan, 2006; Ertik ve diğ., 2023, Magaji ve diğ., 2023). Çalışmamızda VPA ile oluşturulan böbrek hasarında lipid peroksidasyonunun artması, GSH seviyeleri ve GSH bağımlı enzimlerin aktivitelerinin de azalması, membran yapısının da hasar gördüğü hakkında bilgi vermektedir. VPA grubuna ait böbrek fukoz, heksoz ve heksozamin seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi. VPA grubuna ALA uygulanması ile bu değerler tersine çevrildi. Yapısında kükürt bulunduran bazı bileşiklerin doku glikoprotein seviyeleri üzerinde koruyucu etkisi olduğu Saravanan ve diğ. (2010) ve Turkyilmaz ve Yanardag (2016) tarafından bildirilmiştir. ALA'nın bu etkisinin antioksidan özelliğinin yanı sıra yapısında kükürt ihtiva etmesinden dolayı, membran bütünlüğünü sağlayıcı ve buna bağlı olarak dokudaki serbest glikoprotein seviyelerini azaltıcı etkisi olduğu öne sürülebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, VPA ile oluşturulan böbrek hasarına ALA'nın koruyucu etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Böbrek dokularında yapılan biyokimyasal deneyler sonucunda, VPA'nın GSH seviyelerini, enzimatik antioksidan aktivitelerini, Na^+/K^+ -ATPaz ve CA aktivitelerini azaltarak ve LPO, ROT, TOS, AOPP ve glikoprotein miktarları ile arginaz, MPO ve XO aktivitelerini arttırarak oksidatif hasar oluşturduğu belirlenmiştir. VPA grubuna ALA verilmesi ile bu oksidatif stres belirleyici seviye ve enzim aktivitelerinde düzelme meydana geldiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ALA'nın VPA ile oluşturulan böbrek hasarı üzerinde koruyucu etki gösterdiği öne sürülebilir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1984, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Abdelkader, N.F., Elyamany, M., Gad, A.M., Assaf, N., Fawzy, H.M., Elesawy, W.H., 2020, Ellagic acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats, *Journal of Pharmacological Sciences*, 143, 23-29.
- Ahmadpoor, P., Eftekhari, E., Nourooz-Zadeh, J., Servat, H., Makhdoomi, K., Ghafari, A., 2009, Glutathione, glutathione-related enzymes, and total antioxidant capacity in patients on maintenance dialysis, *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 3, 22-27.
- Almeer, R.S., Ali, D., Alarifi, S., Alkahtani, S., Almansour, M., 2018, Green platinum nanoparticles interaction with HEK293 cells: Cellular toxicity, apoptosis, and genetic damage, *Dose Response*, 16, 1-11.
- Al-Shehri, S.S., Duley, J.A., Bansal, N., 2020, Xanthine oxidase- lactoperoxidase system and innate immunity: biochemical actions and physiological roles, *Redox Biology*, 34, 101524.
- Anguissola, G., Leu, D., Simonetti, G.D., Simonetti, B.G., Lava, S.A.G., Milani, G.P., Bianchetti, M.G., Scoglio, M., 2023, Kidney tubular injury induced by valproic acid: Systematic literature review, *Pediatric Nephrology*, 38, 1725-1731.
- Arivazhagan, P., Ramanathan, K., Panneerselvam, C., 2001, Effect of DL-alpha-lipoic acid on glutathione metabolic enzymes in aged rats, *Experimental Gerontology*, 37, 81-87.
- Arslan, M.A., Tunçel, Ö.K., Bilgici, B., Karaustaoğlu, A., Gümrükçüoğlu, T.İ., 2023, Increased levels of lipid and protein oxidation in rat prefrontal cortex after treatment by lithium, valproic acid, and olanzapine, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396, 2721-2728.
- Atukeren, P., Aydin, S., Uslu, E., Gumustas, M.K., Cakatay, U., 2010, Redox homeostasis of albumin in relation to alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3, 206-213.
- Bayrak, B.B., Yilmaz, S., Hacıhasanoglu Cakmak, N., Yanardag, R., 2021, The effects of edaravone, a free-radical scavenger in lung injury induced by valproic acid demonstrated via different biochemical parameters, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35, e22847.
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., Lippe, G., 2015, The Mitochondrial permeability transition pore: Channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology, *Physiological Reviews*, 95, 1111–1155.
- Beutler, E., 1971, Red cell metabolism, *A Manual of Biochemical Methods*, 12th Academic Press, London, 68-80.

- Beutler, E., 1975, Glutathione in red cell metabolism, *A Manual of Biochemical Methods*, 2 nd Ed. New York, Grune and Stratton, 112-114.
- Bhargava, P., Schnellmann, R.G., 2017, Mitochondrial energetics in the kidney, *Nature Reviews Nephrology*, 13, 629–646.
- Brufani, M., 2014, Acido α -lipoico farmaco o integratore. Una panoramica sulla farmacocinetica, le formulazioni disponibili e le evidenze cliniche nelle complicanze del diabete, *Progress in Nutrition*, 16, 62–74.
- Cao, W., Xu, J., Zhou, Z.M., Wang, G.B., Hou, F.F., Nie, J., 2013, Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway, *Antioxidants and Redox Signaling*, 18, 19–35.
- Carrier, B., Rideout, T.C., 2013, Anti-obesity and lipid-lowering properties of alpha-lipoic acid, *Journal of Human Nutrition and Food Science*, 1, 1008.
- Cergel, E., Tuzuner, B.A., Turkyilmaz, I.B., Oktay, S., Magaji, U.F., Sacan, O., Yanardag, R., Yarat, A., 2024, Reversal of valproate-induced major salivary gland changes by *Moringa oleifera* extract in rats, *Chemistry and Biodiversity*, e202301959, <https://doi.org/10.1002/cbdv.202301959>
- Chavez, A., Quesenberry, C.P. Jr, Darbinian, J., Asgari, M.M., 2020, Association of valproic acid use, a potent histone deacetylase inhibitor, and melanoma risk, *Journal of Investigative Dermatology*, 140, 2353-2358.
- Chaudhary, S., Ganjoo, P., Raiusddin, S., Parvez, S., 2015, Nephroprotective activities of quercetin with potential relevance to oxidative stress induced by valproic acid, *Protoplasma*, 252, 209-217.
- Chen, W.L., Kang, C.H., Wang, S.G., Lee, H.M., 2012, α -Lipoic acid regulates lipid metabolism through induction of sirtuin 1 (SIRT1) and activation of AMP-activated protein kinase, *Diabetologia*, 55, 1824–1835.
- Cheraghi, G., Hajiabedi, E., Niaghi, B., Nazari, F., Naserzadeh, P., Hosseini, M.J., 2018, High doses of sodium tungstate can promote mitochondrial dysfunction and oxidative stress in isolated mitochondria, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33, e22266.
- Corte, E.D., Stirpe, F., 1968, Regulation of xanthine oxidase in rat liver: modifications of the enzyme activity of rat liver supernatant on the storage at 20 degrees, *The Biochemical Journal*, 108, 349-351.
- Cure, E., Cure, M.C., 2020, Alpha-lipoic acid may protect patients with diabetes against COVID-19 infection, *Medical Hypotheses*, 143, 110185.
- Celik, C., Bayrak, B.B., Hacıhasanoglu Cakmak, N., Yanardag, R., 2022, Protective effect of edaravone on rat testis after valproic acid treatment, *Journal of Research in Pharmacy*, 26, 52-62.
- Çelik, S., Ozkaya, A., 2002, Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative

- stress induced by H₂O₂, *Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 547–552.
- Dağsuyu, E., Magaji, U.M., Saçan, Ö., Yanardağ, R., 2023, Moringa oleifera ethanolic extract prevents oxidative damage on lens caused sodium valproate used in epilepsy treatment, *European Journal of Biology*, 82, 289-295.
- Dekant, W., 2001, Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation, *Toxicology Letters*, 124, 21-36.
- Dische, Z., Shettles, L.B., 1948, A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination, *Journal of Biological Chemistry*, 175, 593-603.
- Dobyan, D.C., Bulger, R.E., 1982, Renal carbonic anhydrase, *American Journal of Physiology*, 243, F311-F324.
- Dringen, R., Brandmann, M., Hohnholt, M.C., Blumrich, E.M., 2015, Glutathione dependent detoxification processes in astrocytes, *Neurochemical Research*, 40, 2570–2582.
- Duarte, I.F., Caio, J., Moedas, M.F., Rodrigues, L.A., Leandro, A.P., Rivera, I.A., Silva, M.F.B., 2021, Dihydrolipoamide dehydrogenase, pyruvate oxidation, and acetylation-dependent mechanisms intersecting drug iatrogenesis, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 7451-7468.
- Ejaz, A.A., Nakagawa, T., Kanbay, M., Kuwabara, M., Kumar, A., Garcia Arroyo, F.E., Roncal-Jimenez, C., Sasai, F., Kang, D.H., Jensen, T., Hernando, A.A., Rodriguez-Iturbe, B., Garcia, G., Tolan, D.R., Sanchez-Lozada, L.G., Lanaspá, M.A., Johnson, R.J., 2020, Hyperuricemia in kidney disease: A major risk factor for cardiovascular events, vascular calcification, and renal damage, *Seminars in Nephrology*, 40, 574-585.
- El-Beshbishy, H.A., Bahashwan, S.A., Aly, H.A., Fakher, H.A., 2011, Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes, *European Journal of Pharmacology*, 668, 278–284.
- Erel, O., 2005, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry*, 38, 1103-11.
- Ertik, O., Sener, G., Yanardag, R., 2023, The effect of melatonin on glycoprotein levels and oxidative liver injury in experimental diabetes, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37, e23268.
- Ertik, O., Magaji, U.F., Sacan, O., Yanardag, R., 2023, Effect of Moringa oleifera leaf extract on valproate-induced oxidative damage in muscle, *Drug and Chemical Toxicology*, 46, 1212-1222.
- Ferreira, G.K., Cardoso, E., Vuolo, F.S., Michels, M., Zanoni, E.T., Carvalho-Silva, M., Gomes, L.M., Dal-Pizzol, F., Rezin, G.T., Streck, E.L., Paula, M.M., 2015, Gold nanoparticles alter parameters of oxidative stress and energy metabolism in organs of adult rats, *Biochemistry and Cell Biology*, 93, 548-557.

- Geyer, J.W., Dabich, D., 1971, Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates, *Analytical Biochemistry*, 39, 412-417.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Turkyilmaz, I.B., Ercin, M., Yanardag, R., Bolkent, S., 2016, Vitamin U has a protective effect on valproic acid-induced renal damage due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-fibrotic properties, *Protoplasma*, 253, 127-135.
- Ghibu, S., Richard, C., Vergely, C., Zeller, M., Cottin, Y., Rochette, L., 2009, Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54, 391-398.
- Goraca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., Skibska, B., 2011, Lipoic acid—biological activity and therapeutic potential, *Pharmacological Reports*, 63, 849–858.
- Granata, S., Dalla Gassa, A., Tomei, P., Lupo, A., Zaza, G., 2015, Mitochondria: A new therapeutic target in chronic kidney disease, *Nutrition Metabolism*, 12, 49.
- Guo, Z.J., Niu, H.X., Hou, F.F., Zhang, L., Fu, N., Nagai, R., Lu, X., Chen, B.H., Shan, Y.X., Tian, J.W., Nagaraj, R.H., Xie, D., Zhang, X., 2008, Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway, *Antioxidants and Redox Signaling*, 10, 1699–1712.
- Guo, A., Li, J., Luo, L., Chen, C., Lu, Q., Ke, J., Feng, X., 2021, Valproic acid mitigates spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats by modulating microglial function and inhibiting neuroinflammatory response, *International Immunopharmacology*, 2021, 92, 107332.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981, Assays of differentiation on glutathione-S-transferase, *Methods of Enzymology*, 77, 398-405.
- Haidari, F., Mohammadi-Asl, J., Kavianpour, M., Dadfar, M., Haghighian, H.K., 2021, Effect of lipoic acid supplementation on gene expression and activity of glutathione S-transferase enzyme in infertile men, *Human Fertility*, 24, 276-283.
- Halestrap, A.P., 2009, What is the mitochondrial permeability transition pore?, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46, 821–831.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E., 1992, Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598-620.
- Hayes, J.D., Strange, R.C., 2000, Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences, *Pharmacology*, 61, 154–166.
- Heidari, R., Jafari, F., Khodaei, F., Shirazi Yeganeh, B., Niknahad, H., 2018, Mechanism of valproic acid-induced Fanconi syndrome involves mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rat kidney, *Nephrology*, 23, 351-361.
- Hernández, L.E., Sobrino-Plata, J., Montero-Palmero, M.B., Carrasco-Gil, S., Flores-Cáceres, M.L., Ortega-Villasante, C., Escobar, C., 2015, Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress, *Journal of Experimental Botany*, 66, 2901–2911.

- Ho, H.J., Shirakawa, H., 2022, Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease, *Cells*, 12, 88.
- Holmström, K.M., Finkel, T., 2014, Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 411–421.
- Iannaccone, T., Sellitto, C., Manzo, V., Colucci, F., Giudice, V., Stefanelli, B., Iuliano, A., Corrivetti, G., Filippelli, A., 2021, Pharmacogenetics of carbamazepine and valproate: Focus on polymorphisms of drug metabolizing enzymes and transporters, *Pharmaceuticals*, 14, 204.
- Jomova, K., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K., Valko, M., 2024, Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants, *Archives of Toxicology*, 98, 1323-1367.
- Jovanović-Stević, S., Radisavljević, S., Scheurer, A., Ćoćić, D., Šmit, B., Petković, M., Živanović, M.N., Virijević, K., Petrović, B., 2021, Bis(triazinyl)pyridine complexes of Pt(II) and Pd(II): studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/HSA interactions, molecular docking and biological activity, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 26, 625-637.
- Kamt, S.F., Liu, J., Yan, L.J., 2023, Renal-protective roles of lipoic acid in kidney disease, *Nutrients*, 15, 1732.
- Keshk, W.A., Zahran, S.M., 2019, Mechanistic role of cAMP and hepatocyte growth factor signaling in thioacetamide-induced nephrotoxicity: Unraveling the role of platelet rich plasma, *Biomedicine Pharmacotherapy*, 109, 1078-1084.
- Khalifa, E.A., Nabil Ahmed, A., Hashem, K.S., Allah, A.G., 2020, Therapeutic effects of the combination of alpha-lipoic acid (ALA) and coenzyme q10 (CoQ10) on cisplatin-induced nephrotoxicity, *International Journal of Inflammation*, 2020, 5369797.
- Khodayar, M.J., Kalantari, H., Khorsandi, L., Ahangar, N., Samimi, A., Alidadi, H., 2021, Taurine attenuates valproic acid-induced hepatotoxicity via modulation of RIPK1/RIPK3/MLKL-mediated necroptosis signaling in mice, *Molecular Biology Reports*, 48; 4153-4162.
- Kiang, T.K., Teng, X.W., Surendrass, J., Karagiozov, S., Abbott, F.S., Chang, T.K., 2011, Glutathione depletion by valproic acid in sandwich- cultured rat hepatocytes: role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 252, 318–324.
- Kishi, S., Nagasu, H., Kidokoro, K., Kashiwara, N., 2024, Oxidative stress and the role of redox signalling in chronic kidney disease, *Nature Reviews Nephrology*, 20, 101-119.
- Kisic, B., Miric, D., Dragojevic, I., Rasic, J., Popovic, L., 2016, Role of myeloperoxidase in patients with chronic kidney disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1069743.

- Kochi, C., Pokkunuri, I., Salvi, A., Asghar, M., Salim, S., 2020, Simulated vehicle exhaust exposure (SVEE) in rats impairs renal mitochondrial function, *Clinical and Experimental Hypertension*, 42, 571–579.
- Koroglu-Aydin, P., Bayrak, B.B., Bugan, I., Karabulut-Bulan, O., Yanardag, R., 2021, Histological and biochemical investigation of the renoprotective effects of metformin in diabetic and prostate cancer model, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 31, 489-500.
- Landreville, S., Agapova, O.A., Matatall, K.A., Kneass, Z.T., Onken, M.D., Lee, R.S., Bowcock, A.M., Harbour, J.W., 2012, Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma, *Clinical Cancer Research*, 18, 408-416.
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A., Kadziolka, A., 1986, The relationship between plasma triglycerides and lipid peroxidation products during human atherosclerosis, *Clinica Chimica Acta*, 155, 275-284.
- Lee, M., Ahn, C., Kim, K., Jeung, E.B., 2023, Mitochondrial toxic effects of antiepileptic drug valproic acid on mouse kidney stem cells, *Toxics*, 11, 471.
- Li, H.Y., Hou, F.F., Zhang, X., Chen, P.Y., Liu, S.X., Feng, J.X., Liu, Z.Q., Shan, Y.X., Wang, G.B., Zhou, Z.M., Tian, J.W., Xie, D., 2007, Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model, *Journal of American Society of Nephrology*, 18, 528-538.
- Linde, M., Mulleners, W.M., Chronicle, E.P., McCrory, D.C., 2013, Valproate (valproic acid or sodium valproate or a combination of the two) for the prophylaxis of episodic migraine in adults, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6, CD010611.
- Liu, X., Lv, H., Guo, Y., Teka, T., Wang, X., Huang, Y., Han, L., Pan, G., 2020, Structure-based reactivity profiles of reactive metabolites with glutathione, *Chemical Research in Toxicology*, 33, 1579–1593.
- Liu, S.J., Cao, Y.L., Zhang, C., 2024, Hirudin in the treatment of chronic kidney disease, *Molecules*, 29, 1029.
- Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Maglione, E., Marrese, C., Migliaro, E., Marcuccio, F., Panico, C., Salvati, C., Citro, G., Quercio, M., Roncagliolo, F., Torello, C., Brufani, M., 2015, Increasing bioavailability of (R)-alpha-lipoic acid to boost antioxidant activity in the treatment of neuropathic pain, *Acta BioMedica Atenei Parmensis*, 86, 226–233.
- Malle, E., Buch, T., Grone, H.J., 2003, Myeloperoxidase in kidney disease, *Kidney International*, 64, 1956-1967.
- Mao, W.P., Zhang, N.N., Zhou, F.Y., Li, W.X., Liu, H.Y., Feng, J., Zhou, L., Wei, C.J., Pan, Y.B., He, Z.J., 2011, Cadmium directly induced mitochondrial dysfunction of human embryonic kidney cells, *Human and Experimental Toxicology*, 30, 920-929.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., 2003, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 24–38.

- Magaji, U.F., Miftari, S., Saçan, Ö., Yanardağ, R., 2023, Effect of antiepileptic drug sodium valproate on stomach tissue glycoproteins: The protective role of Moringa extract, *Archives of Epilepsy*, 29, 41-45.
- Mailloux, R.J., 2020, An update on mitochondrial reactive oxygen species production, *Antioxidants*, 9, 472.
- Mittal, N., Keaur, J., Mahmood, A., 1996, Changes in tubular membrane glycosylation in diabetic insulin and thyroxin treated rat kidneys, *Indian Journal of Experimental Biology*, 34, 782–785.
- Mohammedi, K., Bellili-Muñoz, N., Driss, F., Roussel, R., Seta, N., Fumeron, F., Hadjadj, S., Marre, M., Velho, G., 2014, Manganese superoxide dismutase (SOD2) polymorphisms, plasma advanced oxidation protein products (AOPP) concentration and risk of kidney complications in subjects with type 1 diabetes, *PLoS One*, 9, e96916.
- Moedas, M.F., Simões, R.J.M., Silva, M.F.B., 2024, Mitochondrial targets in hyperammonemia: Addressing urea cycle function to improve drug therapies, *Biochemical Pharmacology*, 222, 116034.
- Muñoz, M., López-Oliva, M.E., Rodríguez, C., Martínez, M.P., Sáenz-Medina, J., Sánchez, A., Climent, B., Benedito, S., García-Sacristán, A., Rivera, L., Hernández, M., Prieto, D., 2020, Differential contribution of Nox1, Nox2 and Nox4 to kidney vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in obesity, *Redox Biology*, 28, 101330.
- Myloie, A.A., Collins, H., Umbles, C., Kyle J., 1986, Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82, 512-520.
- Na, M.H., Seo, E.Y., Kim, W.K., 2009, Effects of alpha-lipoic acid on cell proliferation and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cells, *Nutrition Research and Practice*, 3, 265-271.
- Namazi, N., Larijani, B., Azadbakht, L., 2017, Alpha-lipoic acid supplement in obesity treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials, *Clinical Nutrition*, 37, 419–428.
- Osborn, J.W., Tyshynsky, R., Vulchanova, L., 2021, Function of renal nerves in kidney physiology and pathophysiology, *Annual Review of Physiology*, 83, 429–450.
- Oktaç, S., Alev, B., Tunali, S., Emekli-Alturfan, E., Tunali-Akbay, T., Koc-Ozturk, L., Yanardag, R., Yarat, A., 2015, Edaravone ameliorates the adverse effects of valproic acid toxicity in small intestine, *Human and Experimental Toxicology*, 34, 654-661.
- Oztay, F., Tunali, S., Kayalar, O., Yanardag, R., 2020, The protective effect of vitamin U on valproic acid-induced lung toxicity in rats via amelioration of oxidative stress, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34, e22602.
- Özerkan, D., Ertik, O., Kaya, B., Kuruca, S.E., Yanardag, R., Ülküseven, B., 2019, Novel palladium (II) complexes with tetradentate thiosemicarbazones. Synthesis,

- characterization, in vitro cytotoxicity and xanthine oxidase inhibition, *Investigational New Drugs*, 37, 1187-1197.
- Öztaylan, Y., Türkyılmaz, İ.B., Yanardağ, R., 2022, The effects of alpha lipoic acid on lens injury in rats administered with valproic acid, *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 85, 557-563.
- Packer, L., Cadenas, E., 2010, Lipoic acid: Energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48, 26–32.
- Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., Hill, D.E., Vidal, M., Evans, J.G., Thorburn, D.R., Carr, S.A., Mootha, V.K., 2008, A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology, *Cell*, 134, 112–123.
- Parikh, S.K., Silberstein, S.D., 2019, Current status of antiepileptic drugs as preventive migraine therapy, *Current Treatment Options in Neurology*, 21, 16.
- Peterson, G.M., Naunton, M., 2005, Valproate: a simple chemical with so much to offer, *Journal of Clinical and Pharmaceutical Therapy*, 30, 417-421.
- Reddy, A.R., Reddy, Y.N., Krishna, D.R., Himabindu, V., 2010, Multi wall carbon nanotubes induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells, *Toxicology*, 272, 11-16.
- Reed, L.J., DeBusk, B.G., Gunsalus, I.C., Hornberger, C.S., Jr., 1951, Crystalline α -lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase, *Science*, 114, 93–94.
- Ridderstap, A.S., Bonting, S.L., 1969, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -activated ATPase and exocrine pancreatic secretion in vitro, *The American Journal of Physiology*, 217, 1721-1727.
- Riley, P.A., 1994, Free radicals in biology: Oxidative stress and the effects of ionizing radiation, *International Journal of Radiation Biology*, 65, 27-33.
- Rochette, L., Ghibu, S., Muresan, A., Vergely, C., 2015, Alpha-lipoic acid: Molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93, 1021-1027.
- Romoli, M., Mazzocchetti, P., D'Alonzo, R., Siliquini, S., Rinaldi, V.E., Verrotti, A., Calabresi, P., Costa, C., 2019, Valproic acid and epilepsy: From molecular mechanisms to clinical evidences, *Current Neuropharmacology*, 17, 926-946.
- Safdar, A., Ismail, F., 2023, A comprehensive review on pharmacological applications and drug-induced toxicity of valproic acid, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 31, 265-278.
- Saravanan, G., Ponmurugan, P., Senthil Kumar, G.P., Rajarajan, T., 2010, Antidiabetic effect of S-allylcysteine: Effect on plasma and tissue glycoproteins in experimental diabetes, *Phytomedicine*, 17, 1086-1089.
- Sarkar, A., Das, J., Manna, P., Sil, P.C., 2011, Nano-copper induces oxidative stress and apoptosis in kidney via both extrinsic and intrinsic pathways, *Toxicology*, 290, 208-217.

- Sayiner, S., Serakinci, N., 2021, Alpha-lipoic acid as a potential treatment for COVID-19 - a hypothesis, *Current Topics in Nutraceutical Research*, 19, 172–175.
- Schmidt, H.M., Kelley, E.E., Straub, A.C., 2019, The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases, *Redox Biology*, 21, 101072.
- Shaltiel, G., Mark, S., Kofman, O., Belmaker, R.H., Agam, G., 2007, Effect of valproate derivatives on human brain myo-inositol-1-phosphate (MIP) synthase activity and amphetamine-induced rearing, *Pharmacological Reports*, 59, 402–407.
- Shnayder, N.A., Grechkina, V.V., Khasanova, A.K., Bochanova, E.N., Dontceva, E.A., Petrova, M.M., Asadullin, A.R., Shipulin, G.A., Altynbekov, K.S., Al-Zamil, M., Nasyrova, R.F., 2023, Therapeutic and toxic effects of valproic acid metabolites. *Metabolites*, 13, 134.
- Sies, H., 2015, Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine, *Redox Biology*, 4, 180–183.
- Simic, T., Savic-Radojevic, A., Pljesa-Ercegovac, M., Matic, M., Mimic-Oka, J., 2009, Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors, *Nature Reviews Urology*, 6, 281–289.
- Singal, P., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., Iliskovic, N., 2000, Adriamycin-induced heart failure: Mechanisms and modulation, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 207, 77–86.
- Solomonson, A., DeBerardinis, R.J., 2018, Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation, *Journal of Biological Chemistry*, 293, 7522–7530.
- Song, J.U., Jang, J.W., Kim, T.H., Park, H., Park, W.S., Jung, S.H., Kim, G.T., 2016, Structure-based design and biological evaluation of novel 2- (indol-2-yl) thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26, 950–954.
- Stafstrom, C.E., 2010, Mechanisms of action of antiepileptic drugs: The search for synergy, *Current Opinion in Neurology*, 23, 157–163.
- Stanely Mainzen Prince, P., Kannan, N.K., 2006, Protective effect of rutin on lipids, lipoproteins, lipid metabolizing enzymes and glycoproteins in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 1373–1383.
- Stöcker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A.; Dick, T.P., 2018, The conundrum of hydrogen peroxide signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs, *Antioxidants and Redox Signaling*, 28, 558–573.
- Susantitaphong, P., Perianayagam, M.C., Tighiouart, H., Kouznetsov, D., Liangos, O., Jaber, B.L., 2013, Urinary α - and π -glutathione s-transferases for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass, *Biomarkers*, 18, 331–337.
- Swenson, E.R., 2000, Respiratory and renal roles of carbonic anhydrase in gas exchange and acid-base regulation, *Experientia Supplementum*, 90, 281–341.
- Tong, Z.J., Kuo, C.W., Yen, P.C., Lin, C.C., Tsai, M.T., Lu, S.H., Chang, Y.P., Liu, W.S., Tsou, H.H., Cheng, H.W., Wang, H.T., 2022, Acrolein plays a culprit role in the

- pathogenesis of diabetic nephropathy in vitro and in vivo, *European Journal of Endocrinology*, 187, 579–592.
- Tripathi, A.K., Ray, A.K., Mishra, S.K., Bishen, S.M., Mishra, H., Khurana, A., 2023, Molecular and therapeutic insights of alpha-lipoic acid as a potential molecule for disease prevention, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33, 272-287.
- Turkyilmaz, I.B., Yanardag, R., Vitamin U ameliorates glycoprotein components, enzyme and tissue factor activities of amiodarone toxicity in liver, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20, 131-136.
- Turkyilmaz, I.B., Bilgin Sokmen, B., Yanardag, R., 2020, Alpha-lipoic acid prevents brain injury in rats administered with valproic acid, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34, e22580.
- Vasanth, S.B., Kurian, G.A., 2017, Toxicity evaluation of silver nanoparticles synthesized by chemical and green route in different experimental models, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45, 1721-1727.
- Veljkovic, A.R., Nikolic, R.S., Kocic, G.M., Pavlovic, D.D., Cvetkovic, T.P., Sokolovic, D.T., Jevtovic, T.M., Basic, J.T., Laketic, D.M., Marinkovic, M.R., Stojanovic, S.R., Djordjevic, B.S., Krsmanovic, M.M., 2012, Protective effects of glutathione and lipoic acid against cadmium-induced oxidative stress in rat's kidney, *Renal Failure*, 34, 1281-1287.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C, *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Wagner, C.A., Imenez Silva, P.H., Bourgeois, S., 2019, Molecular pathophysiology of acid-base disorders, *Seminars in Nephrology*, 39, 340-352.
- Wang, Z.M., Yang, Z.L., Bosy-Westphal, A., Zhang, J.Y., Schautz, B., Later, W., Heymsfield, S.B., Muller, M.J., 2010, Specific meta-bolic rates of major organs and tissues across adulthood: Evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure, *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 1369–1377.
- Wang, Y., Xia, J., Helfer, B., Li, C., Leucht, S., 2016, Valproate for schizophrenia, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, CD004028.
- Wang, Q., Lv, C., Sun, Y., Han, X., Wang, S., Mao, Z., Xin, Y., Zhang, B., 2018, The role of alpha-lipoic acid in the pathomechanism of acute ischemic stroke, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48, 42-53.
- Wang, C., Nie, G., Yang, F., Chen, J., Zhuang, Y., Dai, X., Liao, Z., Yang, Z., Cao, H., Xing, C., Hu, G., Zhang, C., 2020, Molybdenum and cadmium co-induce oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in duck renal tubular epithelial cells, *Journal of Hazardous Materials*, 383, 121157.
- Wang, J., Ling, X., Wang, H., Chen, F., 2023, a-Lipoic acid chemistry: The past 70 years, *Royal Society of Chemistry Advances (RSC Advances)*, 13, 36346.
- Wei, H., Frankel, K., 1991, In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin, *Cancer Research*, 51, 4443-4448.

- Weidinger, A., Kozlov, A.V., 2015, Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction, *Biomolecules*, 5, 472–484.
- Wendel, A., 1981, Glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 77, 325–333.
- White, H.S., Smith, M.D., Wilcox, K.S., 2007, Mechanisms of action of antiepileptic drugs, *International Review of Neurobiology*, 81, 85–110.
- Witko-Sarsat, V., Frielander, M., Capeille`re-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney International*, 49, 1304–1313.
- Witko-Sarsat, V., Frielander, M., Nguyen-Khoa, T., Capeill re- Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Dru ke, T., Descamps-Latscha, B., 1998, Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure, *Journal of Immunology*, 161, 2524–2532.
- Witko-Sarsat, V., Gausson, V., Descamps-Latscha, B., 2003, Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins?, *Kidney International*, 84, S11–S14.
- Winzler, R.J., 1955, Determination of serum glycoproteins, *Methods of Biochemical Analysis*, 279–311.
- Witko-Sarsat, V., Friendlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khao, T., Nguyen, A.T., Jmgraft, J., Jungers, P., Descomps-Latscha, B., 1996, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney International*, 49, 1304–1313.
- Wollin, S.D., Jones, P.J., 2003, α -Lipoic acid and cardiovascular disease, *Journal of Nutrition*, 133, 3327–3330.
- Xu, B., Xu, Z.F., Deng, Y., Yang, J.H., 2010, Protective effects of chlorpromazine and verapamil against cadmium-induced kidney damage in vivo, *Experimental Toxicology and Pathology*, 62, 27–34.
- Yang, Z., Ming, X.F., 2013, Arginase: the emerging therapeutic target for vascular oxidative stress and inflammation, *Frontiers in Immunology*, 4, 149.
- Yang, X., Okamura, D.M., Lu, X., Chen, Y., Moorhead, J., Varghese, Z., Ruan, X.Z., 2017, CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities, *Nature Review Nephrology*, 13, 769–781.
- Yang, X., Song, J., Yan, L.J., 2019, Chronic inhibition of mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase (DLDH) as an approach to managing diabetic oxidative stress, *Antioxidants*, 8, 32.
- Yellen, G., 2002, The voltage-gated potassium channels and their relatives, *Nature*, 419, 35–42.
- Yen, H.C., Oberley, T.D., Vichitbandha, S., Ho, Y.S., St Clair, D.K., 1996, The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice, *Journal of Clinical Investigation*, 98, 1253–1260.

- You, H., Gao, T., Cooper, T.K., Morris, S.M. Jr, Awad, A.S., 2015, Arginase inhibition: a new treatment for preventing progression of established diabetic nephropathy, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 309, F447-F455.
- Zaazaa, A.M., Motelp, B., Aniss, N.N., 2019, Potential protective role of rutin and alpha-lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 22, 361–371.
- Zachariah, B., Basu, D., Surface carbohydrate in cell sociology, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 30, 422–425.
- Zamani, F., Samiei, F., Mousavi, Z., Azari, M.R., Seydi, E., Pourahmad, J., 2021, Apigenin ameliorates oxidative stress and mitochondrial damage induced by multiwall carbon nanotubes in rat kidney mitochondria, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35, 1-7.
- Zhang, J., McCullough, P.A., 2016, Lipoic acid in the prevention of acute kidney injury, *Nephron*, 134, 133–140.
- Zhang, Y., Chen, J., Ji, H., Xiao, Z.G., Shen, P., Xu, L.H. 2018, Protective effects of Danshen injection against erectile dysfunction via suppression of endoplasmic reticulum stress activation in a streptozotocin-induced diabetic rat model, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 343.
- Zheng, S., Zhong, Z.M., Qin, S., 2013, Advanced oxidation protein products induce inflammatory response in fibroblast-like synoviocytes through NADPH oxidase-dependent activation of NF- κ B, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32, 972–985.
- Zonooz, S.R., Hasani, M., Morvaridzadeh, M., Pizarro, A.B., Heydari, H., Yosae, S., Rezamand, G., Heshmati, J., 2021, Effect of alpha-lipoic acid on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis, *Journal of Functional Foods*, 87, 104744.