

Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol ‘ ün
Koruyucu Etkisi

Senanur Can

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2014

The Protective Effects of Geraniol Against Damage of Long Term Renal Ischemia-
Reperfusion in Rats

Senanur Can

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2014

Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol' ün
Koruyucu Etkisi

Senanur Can

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Mediha Canbek

Ocak 2014

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Senanur Can'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol'ün Koruyucu Etkisi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mediha CANBEK

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCİ

Üye: Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye: Doç. Dr. A. Pınar ÖZTOPÇU VATAN

Üye: Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Üye: Doç. Dr. Hakan ŞENTÜRK

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu tez çalışmasında sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan uzun süreli böbrek iskemi/reperfüzyon (İR) hasarına karşı, antioksidan özelliği bilinen geraniolün olası koruyucu etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmada 28 adet 3-4 aylık *Wistar-albino* cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır (n=7). Bunlar rastgele seçimle 4 gruba ayrılmıştır. Grup I (Sham Grubu), Grup II (İR + Serum Fizyolojik), Grup III (İR + 50 mg/kg geraniol), Grup IV (İR + 100 mg/kg geraniol) olarak belirlenmiştir. Ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (70 mg/kg) anestezisi altında Grup I dışındaki tüm gruplara sağ böbrek nefroktomisi yapılmıştır. Grup II, III ve IV için iskemi süresi 60 dakika, reperfüzyon süresi ise 24 saat olarak belirlenmiştir. Grup I ve II'e serum fizyolojik (1 ml/kg), Grup III ve IV'e sırasıyla 50 mg/kg, 100 mg/kg dozlarındaki geraniol, serum fizyolojik içinde çözülerek intraperitoneal enjeksiyon ile uygulanmıştır. Deney sonunda kan serumunda Üre (BUN), Kreatinin (CRE) aktivitelerine ve böbrek dokularında Katalaz (KAT), Glutatyon Peroksidaz (Gpx) ve Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Doku kesitleri Hematoksilen&Eozin boyama yapılarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Çalışma sonunda, gruplar arasında BUN ve CRE değerleri karşılaştırıldığında Grup II'nin diğer gruplara göre yükseldiği ve bunun sonucunda İ/R hasarının oluşturulduğu gözlenmiştir. Geraniol uygulaması sonucunda KAT, GPx ve SOD aktivitelerinin kontrol değerine yaklaşarak hasarı önlediği görülmüştür. Buna göre 100 mg/kg geraniol dozunun, 50 mg/kg geraniol dozuna göre daha etkili olduğu düşünülmüştür. Histolojik bulgular da bu sonuçları desteklemektedir.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular, böbrek İR hasarına karşı geraniolün koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, İskemi/Reperfüzyon, Geraniol, Serbest Radikal, Sıçan

SUMMARY

In this thesis study, the possible protective effects of geraniol, which is known to be an antioxidant, were investigated against experimentally induced long-term renal ischemia/reperfusion (IR) injury in rats.

In the study, three to four month old, *Wistar-albino* type 28 male rats were used (n=7). They were randomly separated into 4 groups. The groups were determined as follows: Group I (Sham Group), Group II (IR + normal saline), Group III (IR + 50 mg/kg geraniol), Group IV (IR + 100 mg/kg geraniol). Groups I and II were inoculated with normal saline (1 ml/kg) and Groups III and IV were inoculated with 50 mg/kg and 100 mg/kg of geraniol, injected intraperitoneally. Right nephrectomies were performed under xylazine (10 mg/kg) and ketamine (70 mg/kg) anesthesia in all group rats except Group I. For Groups II, III and IV, ischemia and reperfusion durations were determined to be 60 mins and 24 hours respectively. At the end of the experiment, Urea (BUN), Creatinine (CRE) activities in the blood serum and the catalase (CAT), glutathione peroxidase (Gpx) and Superoxide dismutases (SOD), enzyme activities in kidney tissue were measured. Histological sections were stained using Hematoxylien & Eosine and investigated by light microscope.

At the end of the study, when Group I and Group II's BUN and CRE values of the I/R injury were compared, it was determined that there had been an increase in Group II and as a result of this, I/R injury had been created. It was observed that as a result of the application of geraniol, the CAT, GPx and SOD activities approached the control values and prevented this, injury 100 mg/kg geraniol was thought to be more effective when compared to 50 mg/kg of geraniol. Histological findings supported these results too.

The results obtained in the study showed that geraniol has a protective effect renal against renal I/R injury.

Key Words: Kidney, Ischemia/Reperfusion, Geraniol, Free Radical, Rat

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde bana danışmanlık eden, beni yönlendiren; tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım Sayın Hocam Doç. Dr. Mediha CANBEK' e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında teknik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocalarım Doç. Dr. Hakan ŞENTÜRK ve Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresince bana fikirleri ve deneyimleriyle destek olan, vakit ayıran ve her konuda kendisine danışabileceğim Sayın Hocam Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENCİ'ye saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez araştırmalarımın laboratuvar deneyleri aşamasında tüm sıkıntılara katlanıp, samimi destekleriyle gösterdikleri sabır ve yardımdan dolayı arkadaşlarım Seren DANIŞ, Fatma YILDIZ, Işıltan YILMAZ ve Handan ÇİFÇİ'ye çok teşekkür ederim. Ve bu çalışmada emekleri geçen Moleküler Biyoloji Laboratuvar ekibine teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca her türlü imkânı bana sağlayan ve başarılarımın esas kaynağını oluşturan, emekleri ile karşılığını ödeyemeyeceğim değerli aileme çok teşekkür ederim. Bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren canım babam Gürani CAN'a ve tüm dert ve sıkıntılarımda yanımda olan canım annem Necla CAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇLAR.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek	3
2.1.1. Böbrek anatomisi.....	3
2.1.2. Böbrek fizyolojisi	4
2.1.3. Böbrek histolojisi.....	6
2.1.4. Sıçan böbrek anatomisi.....	7
2.2. İskemi / Reperfüzyon Hasarı.....	8
2.2.1. İskemi	8
2.2.1.1. Geri Dönüşümlü İskemik Hasar	9
2.2.1.2. Geri Dönüşümsüz İskemik Hasar	9
2.2.2. Reperfüzyon	11

İÇİNDEKİLER (devam)

2.3. Serbest Radikaller	15
2.3.1. Serbest radikallerin başlıca etkileri	17
2.3.2. Serbest Radikaller Ve Reaktif Oksijen Türleri.....	19
2.3.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet}$)	21
2.3.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	22
2.3.2.3. Hidroksil Radikali ($HO^{\bullet}$)	24
2.3.2.4. Singlet Oksijen (1O_2)	24
2.3.3. Serbest radikallerin oluşma mekanizmaları.....	24
2.3.3.1. Otooksidasyon	25
2.3.3.2. Geçiş metal iyonlarının etkisi	26
2.3.3.3. Fotooksidasyon	28
2.3.3.4. Enzimatik oksidasyonlar	29
2.4. Antioksidan Savunma Sistemi	30
2.4.1. Antioksidanların Etki Etme Şekilleri.....	31
2.4.2. Antioksidanların Çeşitli Kriterlere Göre Gruplandırılması.....	31
2.4.2.1. Endojen antioksidanlar	32
2.4.2.2. Eksojen antioksidanlar	36
2.5. Monoterpenler Ve Geraniol	37
2.5.1. Monoterpenler	37
2.5.2. Geraniol	40
3. MATERYAL ve METOD	42
3.1. Deney Hayvanları.....	42
3.2. Deney Grupları.....	42
3.3. Geraniol Uygulaması	43
3.4. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar	43
3.4.1. Nefroktomi İşlemleri	44

İÇİNDEKİLER (devam)

3.4.2. İ/R İşlemleri.....	45
3.5. Örneklerin Alınması ve Değerlendirilmesi	46
3.5.1. Serum örnekleri	46
3.5.2. Böbrek doku örnekleri.....	46
3.5.2.1. Böbrek doku örneklerinin biyokimyasal analizleri.....	47
3.5.2.2. Böbrek doku örneklerinin histolojik analizleri	51
3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	51
 4. BULGULAR.....	 52
4.1. Biyokimyasal Analizler.....	52
4.1.1. Serum örneklerinde biyokimyasal analizler	52
4.1.2. Böbrek Doku Örneklerinde Elektroforetik Analizler	54
4.2. Histolojik Analizler	60
 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	 66
 6. KAYNAKLAR DİZİNİ	 76
 7. EKLER	 89
7.1 Ek1: Etik Kurul Raporu	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Böbreğin yapısı	4
Şekil 2.2 Böbrek kesiti ve Nefron.....	7
Şekil 2.3 İskemi reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu.....	12
Şekil 2.4 İskemi/Reperfüzyon hasarının şematik gösterimi.	14
Şekil 2.5 Serbest radikallerin hücre zarına etkisi	18
Şekil 2.6 Oksijen molekülü ve türevlerinin oluşumu	23
Şekil 2.7 Antioksidanların sınıflandırılması	39
Şekil 2.8 Geraniol ve Nerol ‘ un kimyasal yapısı	40
Şekil 2.9 Geraniolün yapısı (3,7-dimetil -2,6-oktadien-1-ol)	41
Şekil 3.1 Nefroktami işlemi. (A) Diseksiyon, (B) Kesitin bağ dokularından temizlenmesi, (C) Sağ böbreğin çıkarılması, (D) Sağ böbreğin sütur ile boğumlanıp vücuttan ayrılabilmesi için tutturulması	44
Şekil 3.2 İskemi/ reperfüzyon işlemleri. (A) Midline laparotomi, (B-C) sol renal arterinizolasyonu, (D) renal artere klemp takılması, (E) Reperfüzyon işlemi, (F) Cerrahi bölgesinin kapatılması	45
Şekil 4.1 Grup I, II, III ve IV’e ait serum BUN seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	53
Şekil 4.2. Grup I, II III ve IV’e ait serum CRE seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	54
Şekil 4.3 Grup I, II, III, IV’e ait böbrek dokusu örneklerinde belirlenen KAT enzim aktivitesi sonucu oluşan bant alanlarının ortalama değerleri (mm ²).....	56
Şekil 4.4. Gruplara ait KAT izoenziminin elektroforetik bantları.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil 4.5. Gruplara ait SOD izoenzimlerinin elektroforetik bantları	57
Şekil 4.6. Grup I, II, III, IV'e ait böbrek dokusu örneklerinde belirlenen SOD1, SOD2,SOD3 enzim aktivitesi sonucu oluşan bant alanlarının değerleri (mm ²).....	58
Şekil 4.7 Grup I, II, III, IV'e ait böbrek dokusu örneklerinde belirlenen Gpx enzim aktivitesi sonucu oluşan bant alanlarının ortalama değerleri (mm ²).....	59
Şekil 4.8. Gruplara ait Gpx izoenziminin elektroforetik bantları	59
Şekil 4.9 Grup I, II, III, IV'e ait Böbrek tübül hücreleri ve glomerülün genel görünümü	61
Şekil 4.10 Grup I'e (sham grubu) ait Böbrek tübül hücrelerinin ve glomerülün görünümü (H&E.).....	62
Şekil 4.11 Grup II'e (İ/R grubu) ait böbrek doku örneklerinde vakuolizasyon ve tübül hücre dökülmesi (H&E.).....	63
Şekil 4.12 Grup III'e ait böbrek doku örneklerinde, normal görünümlü tübül hücreleri ve hafif kanlanma (H&E).	64
Şekil 4.13 Grup IV'e ait böbrek doku örneklerinde glomerül ile hafif kanlanma (H&E).	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Serbest Oksijen Radikalleri Kaynakları	19
Çizelge 2.2 Reaktif oksijen partikülleri	21
Çizelge 2.3. Karbon sayılarına göre Terpenler	38
Çizelge 4.1. Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen BUN ve CRE miktarlarının ortalama değerleri $\pm$ standart hata değerleri (n=7).	52
Çizelge 4.2. Deney gruplarına ait hayvanların böbrek dokusu örneklerinde belirlenen KAT ve Gpx enzim aktiviteleri sonucu oluşan bant alanlarının ortalama değerleri	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Celcius degree (santigrat derece)
n	denek sayısı (Adet)
rpm	devir/dakika
dk	dakika
mL	mililitre (10^{-3} litre)
μ L	microliter (mikrolitre) = 10^{-6} litre
gr	gram
μ g	microgram (mikrogram) = 10^{-6} gram
mg	miligram (10^{-3} gram)
1/kg	1/kilogram
g/mol	molekül ağırlığı
g/cm^3	yoğunluk
mA	miliamper
V	volt
cm	santimetre

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SOR	Serbest oksijen Radikalleri
İ\R	İskemi/Reperfüzyon
Bkz	Bakınız
KAT	Katalaz
SOD	Süper Oksit Dismutaz
Gpx	Glutasyon peroksidaz
KO	Ksantin oksidaz
KDH	Ksantin dehidrogenaz
H&E	Hematoksilin ve Eosin
NAPDH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PUFA	Poliansatüre yağ asiti
AP	Amonyum persülfat
NBT	Nitroblue tetrazolium
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
PMS	Phenazine methosulphate
HCl	Hidroklorik asit
TEMED	Tetrametil etilen diamin
DNA	deoxyribonucleic acid (deoksiribonükleik asit)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

ATP	Adenosintriphosphate (adenozintrifosfat)
PMNL	Polymorph Nuclear Leukocyte (Polimorf Nükleer Lökosit)
ROT	Reaktif oksijen türevleri

1. GİRİŞ VE AMAÇLAR

Biyolojik sistemlerde oksijen radikalleri ile antioksidan savunma sistemi arasında sistematik bir denge vardır (McCord, 1985). Sağlıklı organizmada, normal metabolizma sonucunda oluşan ROT, vücudun antioksidan savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilir. Fakat bu metabolik dengenin, radikallerin lehine bozulması durumunda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (Kulisic, et al., 2004).

Oksidatif stres, iskemi reperfüzyon (İR) hasarında kaçınılmaz olur (Chen,et al., 2011). Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir (Yaylak, et al., 2008). Reperfüzyon ise dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır (Montalvo-Jave et al.,2008). Reperfüzyon ile oluşan hasar iskemi hasarına göre doku ya da organlarda daha ciddi hasara neden olur. Reperfüzyon hasarının en önemli sebeplerinden biri ise serbest oksijen radikallerinin (SOR) ortaya çıkmasıdır (Verma, et al., 2002).

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde oksidatif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir. Yalnız, serbest radikallerin oluşum hızı, organizmanın endojen antioksidan (katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (Gpx) ve süperoksit dismutaz (SOD) v.b.) enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma serbest radikallerden etkilenmez. Fakat radikal oluşum hızı savunma sisteminin hızını aşarsa, serbest radikaller zararlı olmaya başlar ve organizmada oksidatif stres olarak ortaya çıkar (Şentürk, 2008). Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere zarar verir (Şener ve Yeğen, 2009).

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için, antioksidan savunma mekanizmasına dışarıdan besinlerle alınan doğal maddeler yardımcı olabilmektedir.

Antioksidan özelliği bilinen bileşiklerden karvakrol, citronellol, eugenol, geraniol ve limonen besin maddelerinin genetik yapısını değiştirmeden besinlerin korunmasında etkilidirler. Patojen mikroorganizma kontrolünde, antioksidan olarak savunmada, sindirim enzimlerin aktivitesini artırmada ve ölüm oranını azaltıp verimliliği artırmada başarılı sonuçlar verdikleri bilinmektedir (Svoboda ve ark, 1998).

Bu maddelerden biri olan terpen türevli geraniol kanser önleyici doğal bir antioksidandır (Güneş, 2010). Uçucu yağların serbest radikal bağlayıcı özelliğini sergilemesi ile beraber serbest radikallerin hasarına karşı mitokondri membranını koruduğu rapor edilmiştir (Choi et al., 2000).

Son yapılan çalışmalarla geraniolün genotoksik maddelere karşı insan sağlığını koruyabileceği bildirilmiştir (Wiseman et al., 2007).

Bu çalışmada; uzun süreli böbrek iskemi reperfüzyon hasarına karşı antioksidan özelliği bilinen geraniolün biyokimyasal, histolojik ve doğal jel elektroforez yöntemiyle olası koruyucu etkisi araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

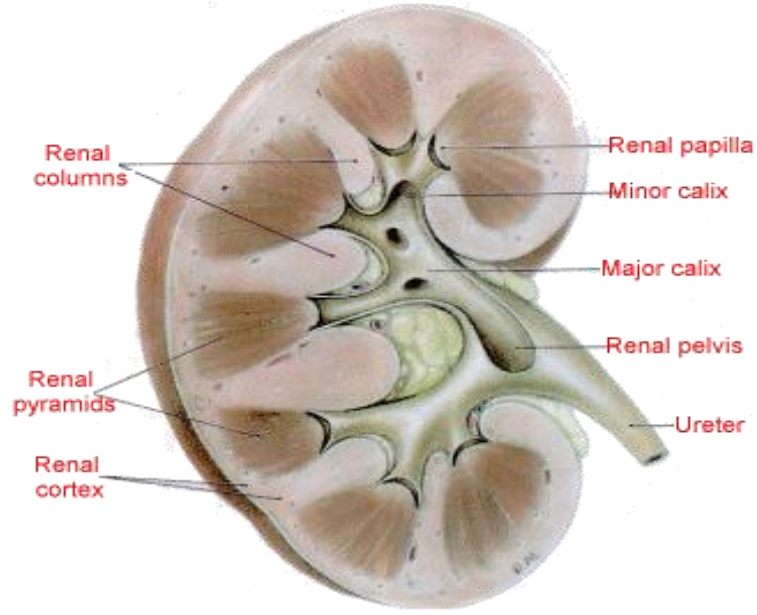
2.1. Böbrek

2.1.1.Böbrek anatomisi

Böbrek, insan organizmasında konumsal (arkasında kalın sırt kasları, üst ve yanda 11. ve 12. kostalar, önde ve yanda karın duvarı) olarak korunmuş en önemli organlardan biridir. Karaciğerin konumu, sağ böbreğin sol böbreğe oranla bir miktar aşağıda bulunmasına neden olur (Anafarta vd., 2008).

Her bir böbrek sürrenal bez tarafından sarılmıştır. Her bir sürrenal yaklaşık 5 gram ağırlığındadır. Sağ sürrenal üçgen şeklinde olup sol daha yuvarlak ve yarımay şeklindedir. Sağ sürrenal karaciğerle vena kava arasında bulunur. Sol sürrenal aorta komşudur. Alt yüzü pankreas, üst ve dış yan dalakla ilişkilidir (Tanagho and McAninch, 2009). Böbrek 12 cm uzunluğunda, 5-7 cm genişliğinde, 3-4 cm kalınlığında bir organdır (Cebeci, 2007). Ağırlığı yaklaşık olarak erkeklerde 150 gr, kadınlarda da 135 gr'dır.

Böbreğin uzunlamasına kesitinin dış kısmında korteks, iç kısmında medulla, internal pelvis ve kalisler görülür (Şekil 2.1). Korteks homojen görünümündedir. Medulla birbirine yaklaşan ve minör kalislere boşalan toplayıcı renal tübüllerin oluşturduğu çok sayıda böbrek piramidi içerir (Anafarta vd., 2008).



Şekil 2.1 Böbreğin Yapısı (<http://hastaneciyiz.files.wordpress.com/2011/01>)

2.1.2.Böbrek fizyolojisi

Böbrekler boşaltımdan sorumlu düzenleyici organlardır. Vücudu fazla su ve atık maddelerden temizler. Aynı zamanda su ve yiyecek alımındaki çeşitliliğe rağmen, vücut sıvı içeriğini ve hacmini düzenler. Böbrekler homeostatik rolünden dolayı değişik çevresel koşullarda bile normal işlevlerini yaparlar. Böbreklerin bu görevleri dışında birçok önemli işlevleri de vardır;

Vücut sıvı osmolalitesinin ve hacminin düzenlenmesi: Vücut sıvı osmolalitesinin kontrolü ve vücudun tüm dokularındaki normal hücre hacminin korunması için önemlidir. Vücut sıvı hacminin kontrolü kardiovasküler sistemin normal işlevini sürdürmesi için gereklidir. Böbrekler kardiyovasküler, endokrin ve merkezi sinir sistemi elemanlarının işbirliği ile tuz ve su atılımının düzenlenmesini sağlarlar.

Elektrolit dengesinin düzenlenmesi: Böbrekler Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , H^+ , Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonunda içinde olduğu vücuttaki birçok önemli inorganik iyon miktarının düzenlenmesinde temel rol oynarlar. Uygun dengeyi sağlamak için elektrolitlerin

atılımı ile alımı eşit olmalıdır. Eğer bir elektrolitin alımı atılan miktarı aşarsa, vücutta bu elektrolitin miktarı artar, bireyin bu elektrolit için pozitif dengede olduğu söylenir. Diğer taraftan eğer elektrolitin atılımı alımını aşarsa vücuttaki miktarı azalır ve birey bu elektrolit için negatif dengededir.

Asit-baz dengesinin düzenlenmesi: Vücudun metabolik işlevlerinin çoğu pH 'a duyarlıdır. Bunun için vücut sıvılarının pH' sı dar sınırlar içinde tutulmalıdır. PH; böbrekler, karaciğer ve akciğerlerin birlikte çalışmasıyla ve vücut sıvılarındaki tamponlarla korunur.

Metabolik ürünlerin ve yabancı maddelerin vücuttan atılması: Böbrekler ihtiyaç duyulmayan metabolizma son ürünlerini vücuttan atarlar. Bu artık ürünler üre (aminoasitlerden), ürik asit (nükleik asitlerden), kreatinin (kas kreatininden), hemoglobin metabolizmasının son ürünleri ve hormon metabolitleridir. Böbreklerin bu maddeleri vücuttan atma hızı üretimleri ile orantılıdır. Böylece böbrekler bu maddelerin vücut sıvılarındaki konsantrasyonunu düzenlerler. Böbrekler ayrıca ilaç, pestisit ve yiyeceklerle alınan diğer kimyasallar gibi yabancı maddeleri de vücuttan atarlar.

Hormonların üretilmesi ve salgılanması: Böbrekler renin, kalsitriol ve eritropoietin üreten ve salgılayan önemli endokrin organlardır.

Renin, sodyum ve potasyum dengesini ve kan basıncının düzenlenmesine yardım eden renin-anjiotensin-aldosteron sistemini etkinleştirir.

Kalsitriol, D vitamininin bir metabolitidir. Kalsiyumun gastrointestinal kanalda normal geri Emilimi ve kemiklerde depo edilmesi için gereklidir. Böbrek hastalarında böbreklerin kalsitriol üretimi bozulur ve bu hormonun düzeyi düşer. Sonuç olarak, bağırsaklar tarafından kalsiyumun geri Emilimi azalır. Kronik böbrek hastalığına sahip bireylerde görülen kemik oluşumundaki anormallikler, azalan bağırsak fonksiyonları kalsiyum geri Emiliminin bir sonucudur.

Eritropoietin, kemik iliğinde kırmızı kan hücrelerinin yapımını uyarır. Azalmış eritrosit üretimi kronik böbrek yetmezliğinde görülen aneminin bir sebebidir (Berne, et al., 2008).

2.1.3.Böbrek histolojisi

Nefronun ince yapısı:

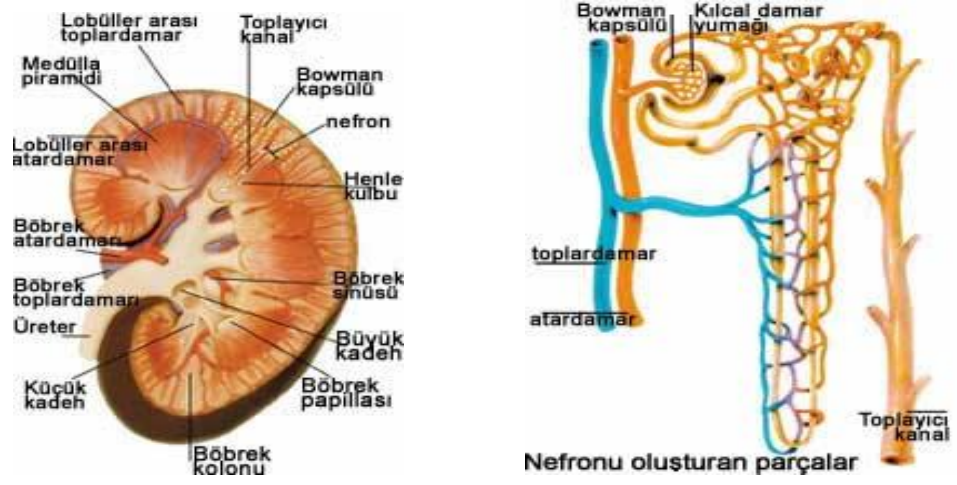
İdrar oluşumunda görev alan böbreğin fonksiyonel alt birimine Nefron adı verilir. Nefronlar birbirinden bağımsız olarak çalışır ve her bir nefron tek başına idrar oluşturma yeteneğine sahiptir. Her iki böbrekte yaklaşık 2.400.000 nefron vardır. Her bir nefron temel olarak iki kısımdan oluşur (Şekil 2.2):

1. Sıvının kandan filtre olduğu *glomerül*
2. Filtre olan sıvının idrara dönüştüğü *tübül*

Glomerül: Bowman kapsülü içinde yer alan, birbirine paralel yerleşen ve anastomoslar yapan kapiller bir yumaktır. Vücutta bulunan diğer kapillerlerden iki önemli farkı vardır;

İki arteriyal yatak arasında yer alır (afferent arteriol-glomerül-efferent arteriol). Bunun sonucu oluşan glomerül içi yüksek basınç, sıvının bowman kapsülü içine filtre olmasına sebep olur.

Glomerüler membranının yapısına bağlı olarak geçirgenlik, diğer kapiller damarlardan daha fazladır.



Şekil 2.2. Böbrek kesiti ve Nefron (http://www.populerbilgi.com/genel/res_insan/144-2)

Tübül: Bowman kapsülü içinde biriken glomerüler filtratın daha sonra ilerlediği kısımdır. Sırası ile;

- 1.Proksimal tübül
- 2.Henle kulpu inen kolu
- 3.Henle kulpu çıkan kolu
- 4.Distal kıvrımlı tübül
- 5.Kortikal toplayıcı tübül
- 6.Medüller toplayıcı tübül kısımlarından oluşur.

Nefronun bu segmentlerinde bir dizi metabolik işleme tabi tutulan idrar oluşur (Kadayıfçı, 2009).

2.1.4. Sıçan böbrek anatomisi

Sıçan böbreği tek bir kaliksle doğrudan üretere bağlanır. Sağ böbrek ve böbreküstü bezi sol böbreğe göre daha üsttedir. Sıçanlarda hem uzun hemde kısa nefronlar bir arada bulunur (Sharp and La Regina, 1998).

Sıçan böbreği yaklaşık 1,6 cm uzunluğunda, 1 cm genişliği ve 0.9 cm kalınlığındadır. 180-280 gr ağırlığındaki bir hayvanın böbrek ağırlığı yaklaşık 2,7-3 gr civarındadır (Nur ve Yoldaş, 2011).

2.2.İskemi / Reperfüzyon Hasarı

2.2.1. İskemi

Bir organa gelen kan akımının, bir pıhtı veya mekanik etkenlerle kısmen veya tamamen kesilmesi sonucunda dokunun beslenmesinin bozulmasına “iskemi” denir (Arslan, 2012). Hipoksi ise dokulara giden oksijen miktarının azalması olarak tanımlanır. İskemi sonucunda doku hipokside kalır (Kumar, et al., 2003). İskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre bütünlüğünün bozulmasına ve hücre ölümüne yol açmaktadır (Zimmerman and Granger, 1992; Şener ve Yeğen, 2009).

Dokularda meydana gelen iskemik hasar dokunun iskemide kaldığı duruma göre sıcak ve soğuk iskemi olarak 2 şekilde ortaya çıkar;

- Sıcak iskemi dönemi ilk dönem olup, organın kan akımından belli bir süre mahrum kaldığı durumlarda olur.
- İkinci dönem soğuk iskemi süresidir. Organın vücut dışında koruyucu sıvılar içinde nakline kadar olan sürede kan akımının olmadığı durumları ifade eder (Sakon et. al 2002).

Organizmada çeşitli organların iskekiye karşı verdikleri cevap temelde aynıdır. Ancak organlara özgü bazı farklılıklar vardır (Akkoç, 2010). İskemik hasarın şiddeti; doku ya da organa giden kan akımındaki azalmanın miktarına ve iskekiye maruz

kaldığı süreye bağlı olarak gelişip, geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz zedelenmelere neden olabilmektedir (Kandilci ve Gümüşel, 2005).

2.2.1.1 Geri Dönüşümlü İskemik Hasar

Hücrel fonksiyonlar oksijen varlığında ve yüksek enerjili fosfat bağları gerektirdiği için aerobik mekanizma ile sürdürülür (Basım, 2005). İskemi ve hipoksi durumunda aerobik mekanizma devam edemediğinden dokuda var olan ATP (Adenozin tri fosfat)'lar tüketilir. ATP üretimi de yetersiz kaldığından hücrel fonksiyonda azalma ve buna bağlı olarak yapısal bozukluklar oluşur (İşcan, 2012).

Özellikle hücre zarının ATP aktivitesinin azalması, zarda Na^+ pompasının yetersizliğine yol açar ve dolayısıyla hücre içi Na^+ birikimiyle beraber izoosmotik su birikimi sonucu akut hücrel şişme meydana gelir (Cotran, et al., 1995).

Hücrel ATP azlığına rağmen kullanımına devam edildiği için adenozin monofosfat (AMP) artışı gerçekleşir. Bu durum fosfofruktokinaz enzimini uyarır ve anaerobik glikolizi artırarak glikojenden ATP oluşumunu sağlar. Bu sayede hücre içi enerji kaynakları korunur. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine yol açarak hücre içi pH' ı düşürür. Daha sonra granüllü endoplazmik retikulumlardan (GER) ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanır (Akkoç, 2010). Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve organellerin yapı ve fonksiyonları bozulur. Bu bozuklukların tümü oksijen verilince geri dönüşlüdür. Eğer iskemi sürerse geri dönüşümsüz zedelenme oluşur (Kumar, et al., 2003; Şahin, 2011).

2.2.1.2. Geri Dönüşümsüz İskemik Hasar

Kritik iskemi dönemi, doku canlılığının sürdürülebildiği maksimum iskemi süresi olarak tanımlanır. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına

göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte, uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (Siemionow and Arslan, 2004; Arslan, 2012). Böbrekte yapılan deneysel çalışmalarda bu kritik zaman dilimi 30 dakika olarak bulunmuştur (Gasnov, 2010).

Geri dönüşümsüz hasar hücre zarının zedelenmesi ile başlar. Mitokondri ve mitokondri kristalarında aşırı vakuolizasyon, plazma zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme geri dönüşümsüz zedelenmeye yol açan hasarlardır (Cebeci, 2007; Arslan,2012). Hücre zarının zedelenmesi sonucu Ca^{+2} yüksek yoğunlukta bulunduğu hücre dışından hücre içine geçer. Hücre içi Ca^{+2} iyonunun artması hücre için sitotoksiktir (Akkoç, 2010).

Mitokondri matrixinde amorf kalsiyumdan zengin yapılar gelişir. Mitokondride geri dönüşümsüz zedelenmelerin erken bulguları 30-40 dakikalık iskemiden sonra görülebilir. Proteinler, temel koenzimler, ribonükleik asitler (RNA) aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. PH 'nın düşmesi sonucunda lizozom zarları zedelenir. Lizozom enzimleri sitoplazmaya geçerek sitoplazma ve çekirdek yapılarının sindirimine yol açar. Hücre organellerinin devamlı parçalanmasını hücre ölümü izler. Hücresel enzimler hücre dışına salınırlar. Sonuç olarak ölü hücreler miyelin oluşumlarına ve fosfolipitten oluşan büyük kitlelere dönüşürler. Bunlar daha sonra diğer hücreler tarafından fagosite edilir veya yağ asitlerine parçalanırlar (Cotran, et al., 1995; Ergün, 2006; Şahin, 2011).

Geri dönüşümsüz iskemiye karakterize eden iki olay vardır; birincisi mitokondri bozukluğunun reperfüzyona (yeniden kanlanma) rağmen düzeltilemeyişi ve ikincisi membran fonksiyonlarının çok ciddi bozukluğudur. Geri dönüşümsüz zedelenmede membran hasarının olası sebepleri;

1. Hücresel ATP azalması

2. Membran fosfolipitlerinin kaybı: Sentez azalması ya da parçalanmanın artımı
3. Lipid Yıkım Ürünleri: İskemik hücrelere membranlar üzerinde deterjan etkisi olan fosfolipidlerin parçalanması sonucu katabolik ürünler birikir.
4. Hücre İskeleti değişiklikleri: İskemide hücre iskeletinden hücre membranının ayrılması hücre şişmesi sonucu görülür. Hücre iskelet proteinlerinin parçalanması, sitozolik Ca^{+2} artışıyla hücre içi proteazların aktivasyonu sonucudur.
5. Toksik O_2 türevleri: Toksik O_2 türevleri büyük ölçüde reperfüzyon sırasında iskemi alanında infiltre olan polimorfnükleer lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir.
6. Lizozom zarının yırtılması

Sonuç olarak hipoksi oksidatif fosforilasyonu etkiler ve hayati olan ATP yapımını engeller, kritik noktadan sonra öldürücü olan membran zedelenmesi yapar (Kumar, et al., 2003; Şahin, 2011).

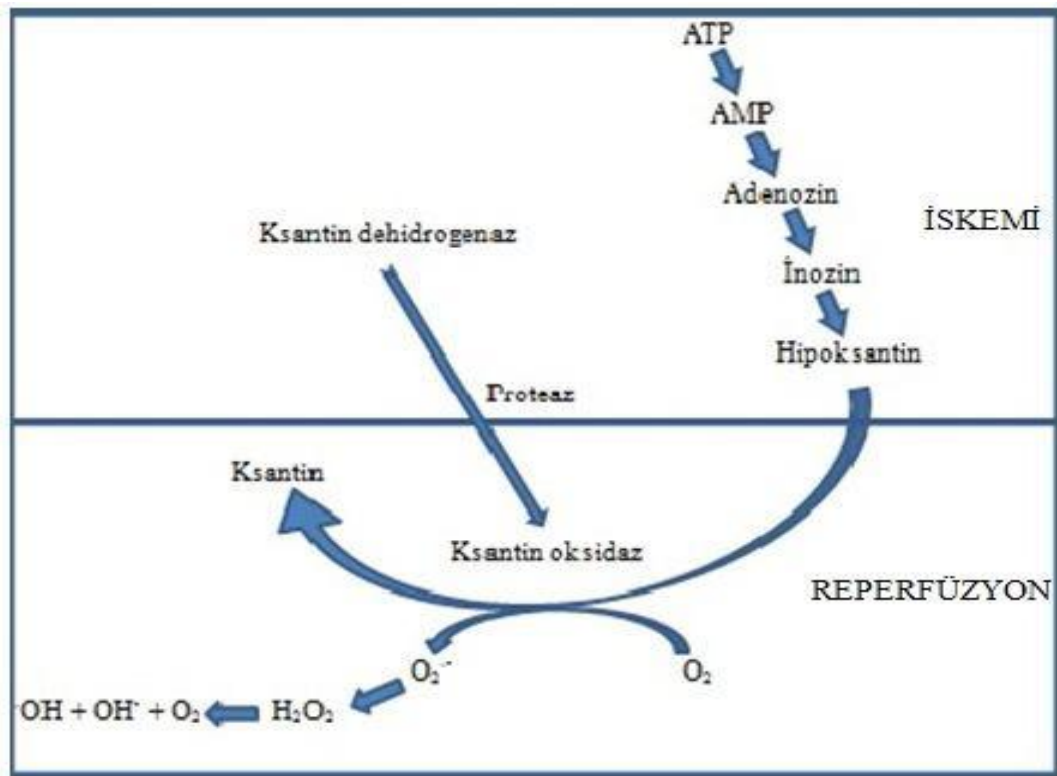
2.2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon iskemik dokudaki kan akımının ve bununla birlikte oksijenin ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanmasıdır. Eğer hücre geri dönüşümsüz şekilde hasara uğramadıysa reperfüzyon ile enerji depoları ve hücresel hemoastazis geri kazanılabilir (Karabiga, 2007; Gönüllü et al., 2011). Reperfüzyonun iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki önemli etkisi vardır. Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır (Zimmerman and Granger, 1992; Basım, 2005).

İskemik dokunun reperfüzyonu ile oluşan hasarlardan biri, hücre içine moleküler oksijenin girişiyle hızla oluşan SOR' lardandır (Parks, et al., 1988; Şener ve Yeğen, 2009). Özellikle dokuya gelip yerleşen polimorf nükleer lökositler (PMNL) tarafından

salınan SOR'lar dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya “reperfüzyona bağlı doku hasarı” denir (Akkoç, 2010).

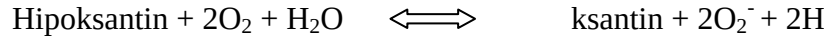
İskemik dönemdeki hücrede meydana gelen metabolik ve yapısal değişiklikler hücreyi reperfüzyona bağlı doku hasarına karşı dayanıksız kılar (Şener ve Yeğen, 2009). İskemi ile hücre içindeki ATP ve ADP gibi yüksek enerjili adenin bileşikleri AMP'ye indirgenir ve hücre içindeki AMP konsantrasyonu artar. AMP'den adenzin ayrılır (Karabiga, 2007). Adenzin hızla hücre dışına difüze olur ve sırasıyla inozin ve hipoksantine dönüşür (Şener ve Yeğen, 2009). Reperfüzyon sağlanabilirse hipoksantin oksijen ve ksantinoksidaz enziminin etkisi ile ksantine dönüşür. Ksantin de ortamdaki oksijenle reaksiyona girerek ürik aside parçalanır (Arslan, 2012) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3.İskemi reperfüzyonda oksijen radikali oluşumu (Arslan, 2012)

Ksantinoksidoredüktaz, hipoksantin gibi pürinlerin 2 aşamalı oksidasyonu ile ksantin üzerinden ürata dönüşmesini sağlayan enzimdir. İn vivo olarak bu enzim 2 şekilde bulunabilir (Karabiga, 2007);

1. Dehidrogenaz (D şekli) : Ksantindehidrogenaz (KDH), hipoksantin ksantin ve ürik aside dönüşümü sırasında NAD^+ yı elektron alıcısı olarak kullanır ve serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna neden olmaz (Suyarı, 2006). Normal dokularda bulunur. Ancak iskemi, proteoliz ve yan grupların geri dönüşümlü oksidasyonu sonucunda oksidaz (O şekli) şekline dönüşebilir (Karabiga, 2007).

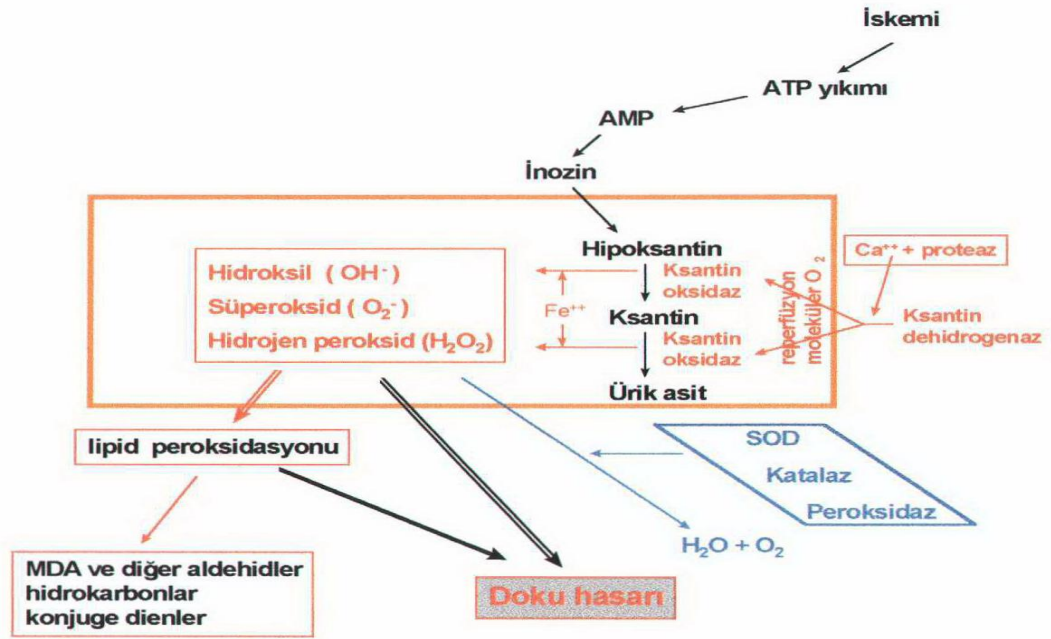


2. Oksidaz (O şekli) : Ksantin oksidaz elektron alıcısı olarak NAD^+ yerine moleküler oksijen kullanır. Bu da serbest oksijen radikali üretimi ile sonuçlanır ve süperoksit radikalinin (O_2^-) ortaya çıkmasına neden olur.

ATP'nin azalmasından dolayı membranların iyon gradienti inhibe olur ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artar. Hücre içinde artan Ca^{+2} konsantrasyonu proteazları aktive ederek ksantindehidrogenaz (KDH)' dan ksantinoksidaz (KO) oluşmasını sağlar. (Şekil 2.4)

Renal iskemi sırasında, D şekli geri dönüşümsüz olarak tip O şekline dönüştürülür ve bunun için 30 dakikalık bir iskemi yeterli olmaktadır.

Bununla beraber hipoksantin yıkılmaya başlamadan önce yeterli O_2 akımı sağlanırsa, hipoksantin ve diğer bileşiklerden tekrar ATP oluşur (Suyarı, 2006; Karabiga, 2007) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Şematik Gösterimi (Ergün, 1998).

Reperfüzyon hücrede aşağıdaki hasarlara neden olur;

1. Ksantin oksidaz kaynaklı serbest radikallerin oluşumu
2. Hasarlı endotele nötrofil birikmesi
3. Enerji kaybı olan organa reperfüzyon sırasında Ca^{++} taşınması
4. Adenin nükleotit sağlanmasındaki yetersizlik, hücrede enerji açığı (Yüzer, 2008).

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiri ile etkileşimi sonucunda serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar (Basım, 2005).

Hücre içinde pekçok reaksiyon, serbest radikallerin oluşumundan sorumludur. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.

1- Hücre içi metabolik olaylar sırasında oluşan redüksiyon- oksidasyon (redoks) reaksiyonlarında görülür. Bu olaylarda; süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) gibi, önemli serbest radikaller oluşur. Hücre içinde oluştuğunda süratle çeşitli membran moleküllerini, proteinleri ve nükleik asitleri (DNA) parçalayarak hasar verir. Böyle DNA hasarları; hücre ölümünde, yaşlanmada söz konusudur. Normal koşullarda bu serbest radikaller, antioksidanlarla yok edilebilir. Eğer antioksidanlar yoksa veya serbest radikal üretimi çok artarsa, hücrelerde hasar kaçınılmaz olacaktır.

2- Radyasyon enerjisinin (ultraviyole ışık, X-ışınları) absorpsiyonunda iyonize radyasyonun etkisiyle hücre içindeki su hidrolize olur. Suyun bu radyolizisi sonucu hidroksil (OH) ve hidrojen (H) serbest radikalleri ortaya çıkar.

3- Demir ve bakır gibi değişimli metaller, bazı hücre içi reaksiyonlarda elektron alıp verme özellikleri nedeniyle serbest radikallerin meydana gelmesine neden olurlar.

4- Ekzogenöz (dış kaynaklı) kimyasal maddelerin enzimatik metabolizması sonucu karbon tetraklorid (CCl_3) den, karbon tetraklorür (CCl_4) serbest radikali oluşur.

5- Nitrik oksit (NO), endotel hücreleri ve makrofaj gibi, bazı tip hücreler tarafından sentez edilen, serbest radikal gibi davranan önemli bir kimyasal mediyatördür. Nitrik oksit oksijenle reaksiyona girdiğinde, NO_2 ve NO_3 gibi, diğer serbest radikalleri de oluşturur (Ünal, 2012).

2.3.Serbest Radikaller

Atomun yapısı, bir çekirdek, nöronlar, protonlar ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır (Güneş, 2010). Atom çekirdeğindeki protonların sayısı, atomu çevreleyen elektronların sayısını belirler. Elektronlar kimyasal reaksiyonlarla ilgilidir ve molekülleri oluşturmak için atomları birbirine bağlar (Ünal,

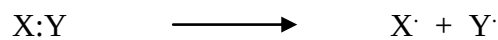
2012). Atomlarda, elektronlar “orbital” adı verilen uzaysal bölgede ve çift olarak bulunurlar (Durmuş ve Ünsaldı, 2005). Her orbitalde yerleşik iki elektron, birbirine zıt yönde kendi eksenini etrafında dönmektedir (Güneş, 2010). Enerji düzeylerine göre belli bir düzende orbitallere yerleşen elektronlar, atomu uzaysal yörüngelerde bir veya birkaç kabuk şeklinde çevreler. En içteki kabuk iki elektrona sahip olduğunda dolar. İlk kabuk dolduğu zaman elektronlar ikinci kabuğu doldurmaya başlar.

Bir atomun kimyasal davranışını belirleyecek en önemli yapısal özellik, dış kabuktaki elektron sayısıdır. Dış kabuğu tamamen dolu olan bir atom, kimyasal reaksiyonlara girme eğiliminde değildir, stabildir. Atomlar maksimum stabiliteye ulaşmak için, dış kabuğunu dolu hale getirmeye çalışırlar (Ünal, 2012).

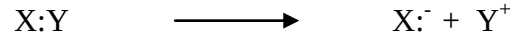
Serbest radikaller, dış kabuğunda bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron içeren, bundan dolayı kararsız ve kimyasal reaktiviteleri yüksek molekül veya atomlardır (Akkuş, 1995; Yavaş, 2011). Serbest radikaller kısa ömürlü ve küçük moleküllerdir. Boyutlarının küçük olması hücre membranlarından geçmelerini kolaylaştırır. (Yavaş, 2011).

Serbest Radikallerin oluşabilmeleri üç şekildedir;

1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi sonucu oluşur. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600° C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi sonucu oluşur. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalırlar. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



3. Normal bir moleküle elektron transferi ile oluşurlar. Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir (Göktepe, 2012).



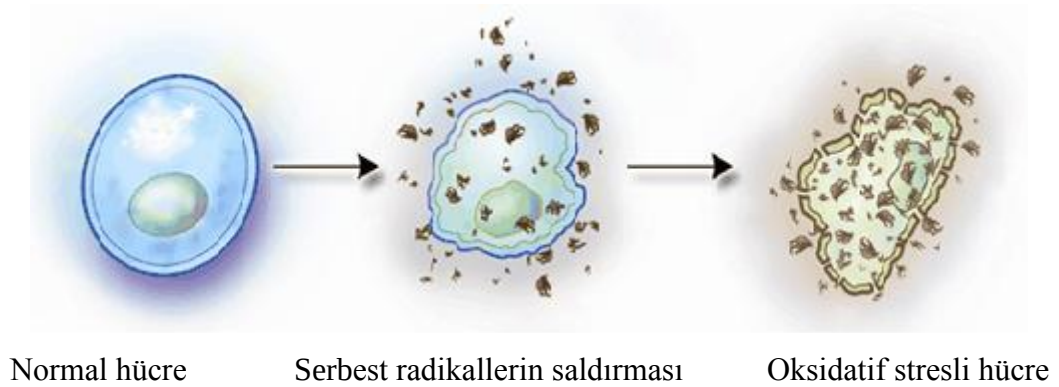
Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektrona sahip olmalarına rağmen serbest radikal kabul edilmezler fakat serbest radikal oluşumunda etkilidirler. Bir moleküle saldırdığında onun elektronunu çalarak okside ederler ve yeni molekülü serbest radikal haline çevirirler (Göktepe, 2012).

Serbest radikaller normal metabolizmanın sürdürülmesinde birçok fizyolojik ve patolojik tepkimeler esnasında oluşabilen reaktif moleküllerdir (Aliyev, 2005; Göktepe, 2012).

2.3.1.Serbest radikallerin başlıca etkileri

Serbest radikaller; organizmanın yapı elemanları olan nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi biyolojik moleküller ile reaksiyona girerek hücresel hasara yol açar ve enzimlerin yapısını bozarlar (Şentürk, 2008; Tümay, 2010). Serbest radikallerin yaptığı en büyük zarar hücre zarları üzerinedir. Serbest radikaller hücre

zarlarından elektron çalarak eşlenir, hücre zarı ve hücre yapısını bozar (Göktepe, 2012) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Serbest radikallerin hücre zarına etkisi (Göktepe, 2012)

Serbest radikaller, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine de zarar veren moleküllerdir. Serbest radikaller normal hücresel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi kirli hava, sigara dumanı, radyasyon, bitki koruma ilaçları, bozulmuş gıdalar, egzoz dumanı pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, güneş ışınları, X ışınları ve yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler aracılığıyla meydana gelebilir (Tümay, 2010) (Çizelge 2.1).

Serbest radikallerdeki aşırı artma vücut için tehlike oluşturur. Ancak vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidir. Vücudu saran mikroorganizmaları yok ederek vücudun hastalıklara karşı direncini artırır. Radikal moleküller ve vücudun savunma gücü dinamik bir denge içinde olduğu sürece organizmaya yararlıdır. Örneğin; lökositlerle mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikal oluşumudur (Tümay, 2010).

Çizelge 2.1 Serbest Oksijen Radikal Kaynakları (Çavdar, et al.; 1997)

I-Normal biyolojik işlemler	1. Oksijenli solunum 2. Katabolik ve anabolik işlemler
II- Oksidatif Stres Yapıcı Durumlar	1.İskemi-Hemoraji-travma-radyoaktivite-intoksikasyon 2.Ksenobiyotik maddelerin etkisi İnhale edilenler Alışkanlık yapan maddeler İlaçlar 3.Oksidan Enzimler Ksantin oksidaz İndolamin dioksigenaz Tryptofan dioksigenaz Galaktozoksidaz Siklooksigenaz Lipooksigenaz Monoamino oksidaz 4.Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu 5.Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler) 6.Uzun süreli metabolik hastalıkları 7.Diğer nedenler: sıcak şoku, güneş ışını, sigara
III-Yaşlanma Süreci	SOR' lar yaşlılığın önemli nedensel ajanlarıdır.

2.3.2. Serbest Radikaller Ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki elektron alıcı moleküller olan serbest radikallerin aktif oksijen türevleri “oksidanlar” olarak adlandırılır (Eken, 2012). SOR’ların

biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalidir (Aktoz, 2004).

Oksijen dünya üzerinde ençok bulunan elementlerden birisi olup, atmosferin yaklaşık %21 oranındadır. Ayrıca deniz, göl, nehir ve su içeren birçok yerde çözülmüş halde bulunur ve atmosferdeki oksijen ile dengededir. Atmosferin oksijen içeriği artığı zaman toksik olabilir. Oksidasyon; organizma hücrelerine zararlı ve bazı durumlarda öldürücü etki yapabilmektedir (Aliyev, 2005).

Oksijen; sekiz atom numaralı, doğada dioksijen olarak bulunan kararsız bir elementtir ve kararsız durumu enerji düzeylerinde bulunan elektronların yapısına bağlıdır. Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip son orbitali önemlidir (Karabiga, 2007). Elektronlar paylaşılmadığında ayrı ayrı orbitallerde bulunduklarında ve spinleri aynı yönde oldukları zaman en düşük enerji seviyesindedir (Aliyev, 2005). Böyle yörüngeye sahip oksijen, stabil oksijen olup, tepkimeye girmek için fazla aktif değildir (Akkuş, 1995). Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönlerde döndüğünde ‘singlet oksijen’ oluşur. Orbitalden birine ters dönüşlü bir elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron gelirse ‘oksijen radikali’ oluşur (Karabiga, 2007).

Oksijen merkezli reaktiflerin bazıları şu şekilde sıralanabilir (Çizelge 2.2):

- 1) Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)
- 2) Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$),
- 3) Singlet oksijen a) Delta singlet oksijen b) Sigma Singlet oksijen
- 4) Hidrojen peroksit reaktifi (H_2O_2)

Bu reaktif maddeler bazı biyolojik molekülleri hasara uğratar ve etrafındaki moleküller ile tepkimeye girerek onlardan elektron alıp kararlı hale gelebilirler (Aliyev, 2005).

Çizelge 2.2 Reaktif oksijen partikülleri (Çavdar vd., 1997).

1. RADİKAL OLANLAR
Süperoksit radikal (O_2^-)
Hidroksil radikal (OH^-)
Alkoksil radikal (LO^-)
Peroksil radikal (LOO^-)
2. RADİKAL OLMAYANLAR
Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Hipoklorik asit ($HOC1$)

2.3.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet}$)

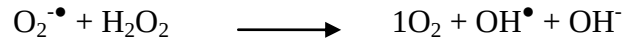
Oksijen molekülü dış yörüngesinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronların spinleri aynı yönde ayrı ayrı orbitallerde olduğunda en düşük enerji seviyesinde olup, dış yörüngelerine bir elektron daha alabilir (Aliyev, 2005; Çakır, 2012). Bu yörüngelere tek elektron alınmasıyla süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) oluşur (Çakır, 2012). Hemen tüm aerobik hücreler enerji üreticisi oksijeni işleyerek suya dönüştürürken serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\bullet-}$) meydana gelir (Akkuş, 1995; Tümay, 2010). Süperoksit direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Akkuş, 1995). Mitokondride kullanılan oksijenin yaklaşık % 1-2'si redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'e okside olması ile süperoksit ($O_2^{\bullet}$) üretilmektedir.

Süperoksit ($O_2^{\bullet}$) spontan ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucunda, dismutasyona uğrayarak H_2O_2 ve O_2 ' ye dönüştürülür (Çakır, 2012).

Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali diğer moleküllerden elektronları çekerek, enerji gereksinimlerini karşıladıklarından, oksitleyici ajanlar olarak kabul edilirler. Ayrıca süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir ve böylece bir indirgeyici olarak davranabilir (Aliyev, 2005).

Süperoksit Radikalinin Yaptığı Tepkimeler

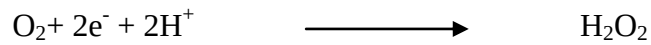
1. Süperoksit radikalleri kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir.
2. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali ($\text{HO}_2^\bullet$) oluşturabilir.
3. H_2O_2 ile tepkimeye girip hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturabilir.



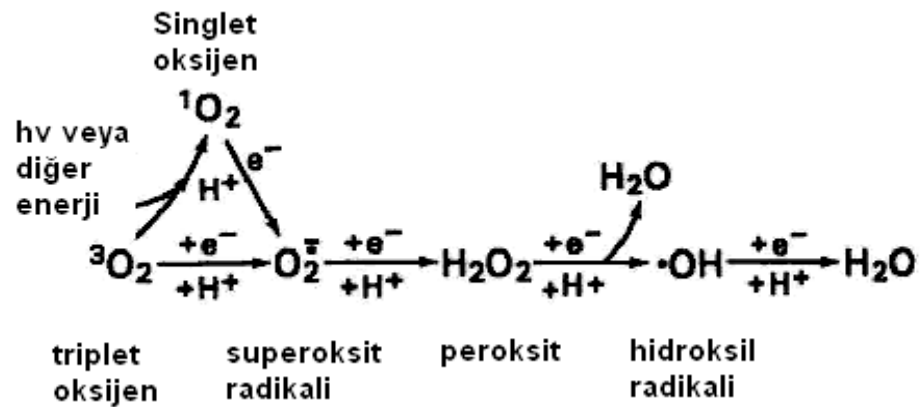
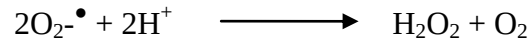
Genel olarak anyon şeklinde bulunduğu halde ortamın PH'sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilen süperoksit, bu durumda perhidroksi radikali ($\text{HO}_2^\bullet$) ismini alır. Süperoksit radikali düşük PH'larda katyon, nötral PH'da ve yüksek PH'larda anyon şeklinde bulunur. Toksik etkisi nispeten zayıf olan $\text{O}_2^{\bullet-}$, daha güçlü oksijen metabolitlerinin oluşumuna yol açarak asıl etkisini gösterir (Aliyev, 2005).

2.3.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) meydana getirir (Akkuş, 1995) (Şekil 2.6).

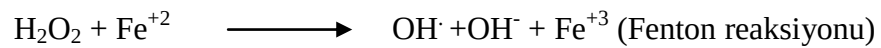
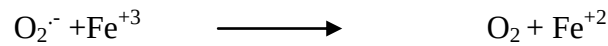


H_2O_2 , süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon tepkimesi sonucu ortaya çıkar. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar. Tepkime sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon tepkimesi olarak bilinir (Adalı, 1998; Haklar, 1994).



Şekil 2.6 Oksijen molekülü ve türevlerinin oluşumu (Aliyev, 2005).

H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen ve OH oluşumuna sebep olan uzun ömürlü oksidandır (Aliyev, 2005; Çakır, 2012). Kendisi radikal özelliği taşımasa da Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla çok zararlı olan hidroksil radikaline ($\text{HO}^\bullet$) dönüşür.



Hücrede oluşan H_2O_2 , katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından ortamdan uzaklaştırılır (Çakır, 2012).

2.3.2.3. Hidroksil Radikali (HO[•])

Serbest radikaller içinde OH[•], biyolojik sistemlere en fazla hasar yapan oksijen radikalidir ve oluşum yeri veya yakını ile reaksiyona girebilir (Günaydın ve Çelebi, 2003; Aliyev, 2005). Dolayısıyla hasar derecesi oluşum yerine bağlı olmaktadır (Aliyev, 2005). Yarılanma ömrü çok kısadır. HO[•], H₂O₂ 'in demir, bakır gibi geçiş metalleri varlığında fenton reaksiyonu ile veya O₂[•] 'in, H₂O₂ ile Haber-Weiss reaksiyonu ile oluşur. (Akkuş, 1995; Günaydın ve Çelebi, 2003; Şener ve Yeğen, 2009).

2.3.2.4. Singlet Oksijen (¹O₂)

Singlet Oksijen (¹O₂) ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest oksijen radikallerinin başlamasına da neden olur.

Singlet oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesi ile radikal özellik kazanır (Akkuş, 1995). Elektronların bu durumundan dolayı singlet oksijen kimyasal maddelerle kolaylıkla çift bağ oluşturarak etkileşir. Bu oksijen türevi diğer oksijen radikallerinden daha uzun ömürlüdür (Aliyev, 2005).

2.3.3. Serbest radikallerin oluşma mekanizmaları

En büyük serbest radikal kaynağı elektron ta zincirinden (ETS) elektron sızmasıdır. Serbest radikallerin oluşum mekanizmaları non-enzimatik ve enzimatik olarak ikiye ayrılır. Aktive olmuş fagositlerin, radyasyonun, bağımlılık yapan maddelerin (Alkol ve uyuşturucular), antineoplastik ajanların, çevresel ajanların (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, sigara dumanı) ve stresin etkisi sonucunda oluşan serbest radikaller non-enzimatik olanlardır. Küçük maddelerin otooksidasyonu (Katekolaminler), enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz,

hemoglobin), mitokondrial elektron transportu, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (Sitokrom P-450), peroksizomlar (oksidazlar), (lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz, lipid peroksidasyonu), oksidatif stres etkenleri (iskemi, travma) ile oluşanlar ise hücre içi enzimatik kaynaklardır (Koca ve Karadeniz, 2003; Gasanov, 2010).

2.3.3.1.Otooksidasyon

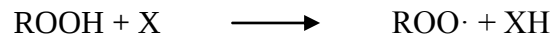
Atmosferik oksijen ile bir organik bileşik arasında gerçekleşen kimyasal zincir reaksiyonudur (Koca ve Karadeniz, 2003; Yavaşer, 2011). Otooksidasyon lipit içeren maddeleri etkiler (Yavaşer, 2011). Bu durumun sebebinin lipitlerin çift bağ yapma eğiliminde olmalarından dolayı yağ asitlerinin oksidatif bozulmasıdır. Memeli hücreleri, poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) miktarı açısından oldukça zengindir (Şentürk, 2008). PUFA 'nın oksidatif yıkımı "lipit peroksidasyonu" olarak bilinir ve kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde olmasından dolayı çok zararlıdır. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş, 1995).

PUFA'nın peroksidasyonu karbon zinciri üzerinden $-CH_2$ gruplarının herhangi birinden hidrojen atomunun çıkarılması ile başlar. Bu olayı H_2O_2 ve $O_2^{\cdot}$ gerçekleştirememesine rağmen $OH^{\cdot}$ ve $HO_2^{\cdot}$ gerçekleştirebilir. Hidrojen atomu bir elektrona sahip olup, elektronunu karbon üzerinde eşleşmemiş elektron olarak bırakır. Oluşan $-CH$ radikali $O_2^{\cdot}$ ile birleşerek peroksi ($RO_2^{\cdot}$) radikalini meydana getirir.

Peroksi radikalleri diğer yağ asitlerinden bir hidrojen çıkararak zincir tepkimesini başlatır. Bu tepkime; PUFA'nın tamamen hidroperoksitlere ($ROOH$) oksitleşmesine kadar devam eder (Aliyev, 2005).

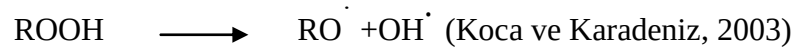
Hidroperoksitlerin bir zincir reaksiyonunu başlatabilmesi üç temel mekanizma ile olabilir;

1. Hidroperoksit, zincir reaksiyonuna katılabilecek bir peroksi radikalini ($\text{ROO}\cdot$) oluşturmak üzere başlatıcı bir radikal ($\text{X}\cdot$) ile reaksiyona girebilir.



2. Hidroperoksit, bir metal iyonu veya farklı bir indirgenle alkoksi ($\text{RO}\cdot$) radikalini veya daha az bir ihtimalle hidroksi ($\cdot\text{OH}$) radikalini oluşturmak üzere indirgenebilir.

3. Diğer mekanizmalara göre daha az önemli olmakla birlikte, oda sıcaklıklarında hidroperoksitteki O-O bağı parçalanarak alkoksi ve hidroksi radikallerine dönüşebilmektedir.



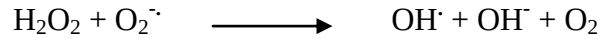
Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu metallerin varlığında artar. Metaller redoks katalisti olarak görev yaparlar ve süperoksid ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü sağlarlar (Akkuş, 1995).

2.3.3.2. Geçiş metal iyonlarının etkisi

Geçiş metalleri özellikle demir ve bakır fizyolojik şartlarda serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapmaktadırlar. Canlı sistemlerde oksijen taşınması, ATP üretimi, DNA ve klorofil sentezinde önemli role sahip olan demirin serbest formları hücrelerde toksik etki yapabilmektedir. Bu toksisite sonucunda oluşan aktif oksijen türleri lipid oksidasyonunu yükseltgenme indirgenme reaksiyonları

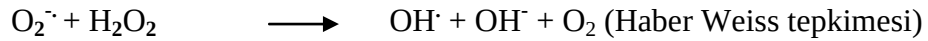
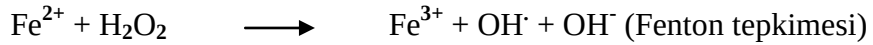
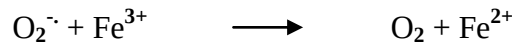
ile teşvik edebilmekte veya DNA moleküllerine saldırabilmektedir (Akkuş, 1995; Koca ve Karadeniz, 2003).

H₂O₂ bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içinde geçer ve serbest radikal biyokimyasında oldukça etkilidir. Çünkü süperoksit ile tepkimeye girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur.



Bu tepkimeye Haber-Weiss Tepkimesi adı verilir. Haber-Weiss tepkimesi katalizör varlığında ya da katalizörsüz olmak üzere iki şekilde meydana gelebilir. Fakat katalizörsüz tepkime oldukça yavaş ilerler. Demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen tepkime ise çok hızlıdır.

Bu tepkimede önce Ferri demir (Fe³⁺) süperoksit tarafından Ferro demire (Fe²⁺) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton Tepkimesi” ile hidrojen peroksitten OH⁻ ve OH[·] üretilir.



Bu tepkimeler (Fenton ve Haber-Weiss Tepkimeleri) Mn⁺ varlığında daha hızlı gerçekleşebilir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre H₂O₂’den daha reaktiftir (Akkuş, 1995; Aliyev, 2005). H₂O₂, O₂^{· -}’nin genellikle geçemediği hücre membranlarından çok hızlı geçer ve toksik etkiler yapar (Aliyev, 2005).

2.3.3.3. Fotooksidasyon

Fotokimyasal reaksiyonlar ışık yardımı ile elektronların uyarılması ile sağlanır. En gevşek elektron daha üst seviyeye çıkar (İnceoğlu, 2008). Işığın bir molekül tarafından direkt absorpsiyonu ile süperoksit anyonu üretebilen fotokimyasal reaksiyonlar homolitik parçalanma yoluna gidebilir (Koca ve Karadeniz, 2003; İnceoğlu, 2008). Bağ ayrışması için gerekli olan enerji görünür veya ultraviyole ışık tarafından sağlanır (İnceoğlu, 2008). Direkt fotokimyasal reaksiyonlardan daha önemli olan indirekt oksidasyonlarda ışığı absorbe eden bir molekül diğer molekülün oksidasyonuna neden olur (Koca ve Karadeniz, 2003; İnceoğlu, 2008).

Fotooksidasyon reaksiyonları Tip₁ ve Tip₂ olmak üzere 2 şekilde meydana gelir;

Tip₁ reaksiyonunda; aktif hale geçen molekül, substratla hidrojen atomu transferi ya da elektron vermek üzere reaksiyona girerek radikalleri üretmektedir. Bu radikaller de oksijenle reaksiyona girerek oksidasyon ürünlerini meydana getirmektedir.

Tip₂ reaksiyonunda ise aktif molekül oksijen ile direkt reaksiyona girerek tekli oksijen üretmekte ve bu oksijende oksidasyon ürünleri meydana getirmek üzere substratla reaksiyona girmektedir.

Riboflavin gibi flavinler Tip₁ reaksiyonlar için uygun bir molekül iken, klorofil gibi porfirinlerde Tip₂ reaksiyonlara uyan ve önemli oranda tekli oksijen üreten moleküller arasındadır.

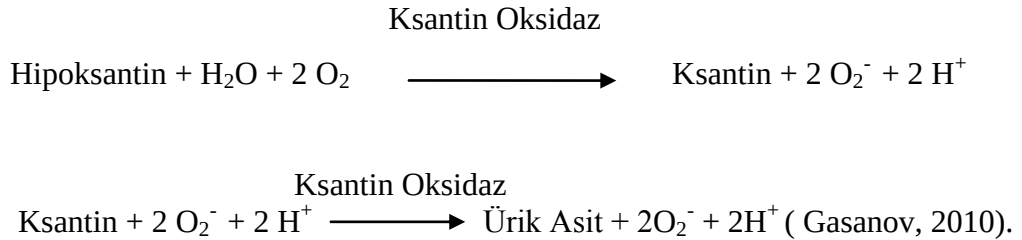
Fotooksidasyondan zarar gören başlıca biyolojik hedefler arasında; histidin, metiyonin, triptofan, tirozin ve sistein içeren proteinler ve guanidin içeren nükleik asitler bulunmaktadır. Ayrıca, yağ asitleri ve kolesterol gibi doymamış bileşiklerin oksidasyonunun gerçekleştiği lipidler de zarar gören başlıca hedefler arasındadır (Koca ve Karadeniz, 2003).

2.3.3.4. Enzimatik oksidasyonlar

Reaktif oksijen türleri, vücutta lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz ve sitokrom P-450 gibi birçok enzimin aktivitesinin bir sonucu olarak da oluşabilmektedir (Koca ve Karadeniz, 2003).

1. Ksantin oksidaz (XOD)

Canlı sistemlerde SOR oluşturan başlıca enzimatik oksidasyonlardan biridir. Ksantin dehidrogenaz, pürin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside okside ederken NAD^+ yerine reperfüzyonla dokulara ulaşan O_2 'yi kullanıp tiyol gruplarını okside eden ve proteolizise neden olan ksantin oksidaz enzimine dönüşür. Ksantin oksidaz (XOD)'ın reaksiyonu sonucunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri oluşmaktadır. Ksantin oksidazın beyinde ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi oksidatif hasarlarına neden olmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2003; Gasanov, 2010).



2. NADPH oksidaz

Serbest radikal oluşturan bir diğer enzim olan NADPH oksidaz nötrofillerin plazma membranının dış yüzeyinde bulunmaktadır (Akkuş, 1995). Nötrofiller iskemi sonrası doku hasarını gerek serbest oksijen radikalleriyle gerekse de sitotoksik enzimleri salgılayarak oluştururlar. Mitokondri tarafından alınan oksijenin yaklaşık %1-4'ü sitokrom oksidaz enzimi ile süperoksit anyonu üretimi için kullanılır ve üretilen süperoksit anyonunun yaklaşık %20'si hücrelere verilir (Koca ve Karadeniz, 2003;

Aliyev, 2005). Makrofajlar ve monositleri içeren fagosit hücrelerde O₂ alımının artması ile aktiflik kazanan NADPH oksidaz, bu oksijeni süperoksit anyonuna dönüştürerek ekstraselüler sıvılardaki miktarını artırmaktadır. Dolaşımdaki nötrofil aktivasyonunun ya da sayısının azaltılması ile iskemi reperfüzyon doku hasarının azaltıldığı görülmüştür (Koca ve Karadeniz, 2003; Gasanov, 2010).

3. Nötrofil miyeloperoksidaz (MPO)

Nötrofillerde aynı zamanda fagosit edilen mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılan lizozomal myeloperoksidaz sistemi de bulunmaktadır. Hidrojen peroksit tarafından klorid iyonlarının oksidasyonu yoluyla hipoklorik asit üretimini katalizleyen “Nötrofilik miyeloperoksidaz” enzimidir. Bu reaksiyonun toksisitesi savunma sisteminde bakterilerin öldürülmesine katkıda bulunur. Buna karşılık, oluşan hipoklorik asit sağlıklı insan dokusunu zarara uğratarak iltihaplanmalara neden olmaktadır. H₂O₂, myeloperoksidaz enzimi ile Br, I ve Cl ile tepkimeye girerek HOCl, HOI, HOBr gibi güçlü asitleri oluşturur (Koca ve Karadeniz, 2003; Gasanov, 2010).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidanlar oksidasyona karşı koyan, oksijen ya da peroksitlerle ilerleyen reaksiyonları engelleyen, hem direkt hem de dolaylı olarak ilaçların, karsinojenlerin toksik etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (Şıktar, 2008; Göktepe, 2012).

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı, vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların savunma gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli bir düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar oksidanlara karşı yetersiz olursa oksidatif stres hasarı meydana gelir (Çavdar, vd.,1997).

Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (Yavaşer, 2011).

2.4.1. Antioksidanların Etki Etme Şekilleri

SOR'un oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “Antioksidan savunma sistemi” dört yolla etki göstermektedir:

1. Süpürücü etki; serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı (süpürücü) etki denir. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler.
2. Bastırıcı etki; serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerinin azaltılmasıdır. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptir.
3. Zincir kırıcı etki; serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller bu tarz bir etkiye sahiptir.
4. Onarıcı etki; serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklindedir (Akkuş, 1995; Demirkıran, 2011).

2.4.2. Antioksidanların Çeşitli Kriterlere Göre Gruplandırılması

1-Yapılarına göre; a) Fenolik b) Aromatik c) Organo sülfür bileşikleri

2-Kaynaklarına göre;

a) Endojen Antioksidanlar: Enzim ve enzim olmayanlar olarak ikiye ayrılır.

-Enzim olan endojen antioksidanlar: Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, katalaz, mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz.

-Enzim olmayan endojen antioksidanlar: Melatonin, seruloplazmin, transferrin, myoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albumin.

b) Eksojen Antioksidanlar: Vitamin E, karoten, vitamin C, folik asit, allopürinol, oksipürinol, NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, kalsiyum kanal blokörleri), rekombinant süperoksit dismutaz, endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar (asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albumin), nötrofil adezyon inhibitörleri.

3-Çözünürlüklerine göre; a) Suda çözünenler b) Lipidlerde çözünenler

4-Yerleşimlerine göre; a) İntrasellüler olanlar, b) Ekstrasellüler olanlar (Akkuş, 1995).

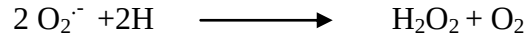
2.4.2.1. Endojen antioksidanlar

Antioksidan sistemler hasar öncesi radikal oluşumunu önler, oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve mutasyonları engellerler. Buna göre hem eksojen hem de endojen antioksidan madde ve enzimler hücrenin hasar görmüş bütün kısımlarına müdahale ederek oksidanların etkisini azaltarak ya da ortadan kaldırarak etki ederler (Biçim, 2013).

Endojen antioksidan sistemi; antioksidan enzimler, hasarlı molekülleri uzaklaştırıcı proteaz ve fosfolipazlar gibi enzimler, yeni bileşikleri sentezleyen sistemler, glutatyon, ürik asit ve çeşitli metal bağlayıcılarından oluşmaktadır. Enzim yapısında olan endojen antioksidanlar, radikal ve reaktifleri gidererek oluşabilecek oksidatif hasarları engellerler (Ağgöl, 2012).

a. Enzim olan endojen kaynaklı antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD) : SOD, süperoksit anyon radikallerinin dismutasyonu sonucunda moleküler oksijeni hidrojen peroksit katalize eden, molekül ağırlığı 17-85 kDa aralığında olan metalloenzimlerdir. SOD, oksijeni metabolize eden mantarlar, bitkiler ve hayvanları da içeren bütün ökaryotik hücrelerde bulunur (Demirkıran, 2011; Biçim, 2013). SOD'nin temel fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir (Biçim, 2013).



SOD, bu reaksiyonda hem oksidan hemde redüktan olarak hareket eder. SOD, oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı katalaz ve glutatyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır (Karabiga, 2007).

İnsanda SOD' un 3 izomer tipi mevcuttur. Hücrelerde Cu-Zn SOD sitoplazmada bulunur, dimerik yapıdadır; bakır ve çinko içerir. Mitokondride bulunan ve mangan içeren Mn SOD tetramer yapıdadır. EC SOD (Ekstrasellüler SOD) ise hücre dışında bulunur ve düşük aktiviteli olduğu ileri sürülmüştür (Çakır, 2012).

Süperoksit Dismutaz 1

Bütün hücrelerin sitozolünde bulunan bir homodimer protein olarak bulunur. Memelilerde Cu-ZnSOD karaciğer, eritrosit, beyin ve nöronlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur.

Süperoksit Dismutaz 2

Manganez içeren SOD (Mn-SOD), Cu-ZnSOD ile aynı role sahiptir, fakat süperoksit radikalleri hücresel kaynağı olan mitokondri de bulunur. Memelilerde bu

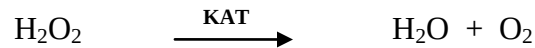
enzim kalp, beyin, karaciğer ve böbreklerde yüksek konsantrasyonlar da bulunur. MnSOD bir homotetramerdir, her bir ünite 196 aa içerir.

Süperoksit dismutaz 3

Sekretuar bir enzim olan ekstrasellüler SOD (ECSOD/SOD3) hem bakır hem de çinko içeren tetramerik bir glikoproteindir. ECSOD, aktivitesinin en büyük kısmından sorumlu olduğu plazma, lenf ve eklem sıvısında bulunur, fakat bu enzim başlıca endotel hücre yüzeylerindeki heparan sulfat proteoglikanlarına gömülü olarak yer alır (Biçim, 2013).

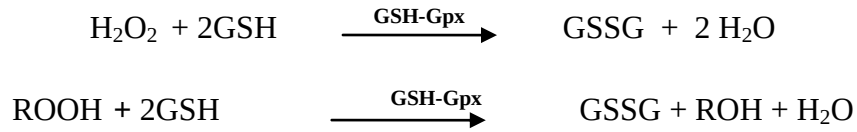
Katalaz (KAT) : KAT memeli ve memeli olmayan, sitokrom sistem içeren aerobik hücrelerde antioksidan bir enzimdir. KAT, ilk olarak sığır karaciğerinden daha sonra kandan, bakteriyel ve bitkisel kaynaklardan izole edilmiştir. (Deisseroth and Dounce, 1970). Bu enzim her molekülde 4 ferihemoprotein grubu içerir. Bu enzimin moleküler kütlesi 240kDa'dur. KAT aktivitesi dokular arasında fazlasıyla değişir. En yüksek aktivite karaciğer ve böbrekte ve en az bağ dokusunda bulunur. Bu enzim ökaryotik hücrelerde peroksizom olarak isimlendirilen hücre içi organellerde bulunur (Zamocky and Koller, 1999).

KAT, SOD' a benzer bir dismutasyon mekanizması ile hidrojen peroksiti, su ve moleküler oksijene parçalar (Akkuş, 1995).



Hidrojen peroksit hücreler için oldukça toksiktir ve onun birikmesi hücresel oksidasyonuna neden olur. KAT'ın indirgeyici aktivitesi H_2O_2 ile metil etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllu lipid hidroperoksitlerine karşı ise etki etmez (Akkuş,1995).

Glutasyon peroksidaz (Gpx): Gpx, sitozolik bir enzim olup, dört selenyum atomlu tetramerik bir enzimdir (Çakır, 2012). Gpx, hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir (Akkuş,1995). Bunu gerçekleştiren indirgenmiş glutasyonu substrat olarak kullanarak, reaksiyon sonucunda oksitlenmiş glutasyon (GSSG) ve su molekülü oluşur (Çakır, 2012).



Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunurken % 25-40'ı ise mitokondrilerindedir.

GPX'in selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki yapısı vardır. Farklı substratları kullanırlar. Selenyum bağımlı formu sitoplazma da bulunur ve düşük bir kapasiteye sahiptir. Selenyum bağımsız formu ise organik hidrojen peroksitleri kullanır ve daha yüksek bir aktiviteye sahiptir (Biçim, 2013).

İnsanlarda Gpx'in 4 alt tip izoenzimi bulunmaktadır. Gpx- 1 en sık bulunandır.

1. Glutasyon peroksidaz 1 (GPx1): Selenyum içeren GPx1 birbirinin aynı olan 4 alt birim içeren bir selenosistein yapılarından oluşmaktadır. İnsanlardan izole edilen bu enzim; vücutta her yerde üretilirken eritrosit, karaciğer ve böbrekte özellikle bol miktarda bulunmaktadır.

2. Glutasyon peroksidaz 2 (GPx2): Selenyum bağımlı sitozolik GPx2 olarak bilinmekte ve primer olarak gastrointestinal dokularda bulunmaktadır.. Memelileri, oral olarak alınan lipid peroksitlerine karşı korumada önemli bir rol oynar.

3. Glutasyon peroksidaz 3 (GPx3): Ekstraselüler GPx3 başlıca plazmada bulunur aynı zamanda böbrek, akciğer, kalp ve plasentada da tespit edilmiştir. GPx4 'e göre

daha az etkin olan enzim (GPx3), fosfatidilkolin gibi lipidlerin hidroperoksitlerini indirgemektedir.

4. Glutasyon peroksidaz 4 (GPx4): Enzim, fosfolipit hidrojen peroksit olarakta isimlendirilir. Birçok dokuda bulunduğu ve hem sitozol hemde membranlarla ilişkili olduğu saptanmıştır. Diğer GPx'ların aksine monomer halinde bulunmaktadır. Küçük boyutu ve hidrofobik yüzeyi nedeniyle membrandaki peroksidize olmuş fosfolipidleri ve kolesteroleri indirgemektedir (Biçim, 2013).

b. Enzim olmayan endojen kaynaklı antioksidanlar

Melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutasyon, sistein, metiyonin, albumin vb. moleküller yer alır (Basım, 2005; Şener ve Yeğen, 2009).

2.4.2.2. Eksojen antioksidanlar

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. İlaçlar ve belli başlı gıda antioksidanları da bu grupta sınıflandırılabilirler.

Gıdalarda doğal olarak bulundukları gibi, gıda sanayisinde ürünlerin kalitesini korumak ve besinsel değerlerini muhafaza etmek amacıyla sonradan eklenebilirler. Besinlerin acılaşmasını, çürümesini geciktirici özelliğe sahip bir grup kimyasal maddelerdir. Ortamda pek az miktarda bulunsalar bile etkin olan maddelerdir. Bir antioksidanın, besin maddelerinde kullanılmadan önce sağlığa zararı olmadığı kesin olarak saptanmalıdır (Tufan, 2012).

2.5.Monoterpenler Ve Geraniol

2.5.1. Monoterpenler

Terpenler, doğada çok yaygın olarak bulunan gruplardan hidrokarbonların geniş bir sınıfını oluştururlar. Genellikle bitkilerde ve özellikle iğne yapraklılar tarafından üretilmekle beraber bazı böceklerde de terpenlerin salgılandığı görülmüştür. Uçucu yağların büyük çoğunluğu terpenlerden oluşmuştur (Güneş, 2010).

Terpenler, gıdalarda tat ve koku bileşenleri olarak kullanılır ve biyolojik olarak aktif maddelerdir. Biyolojik aktif terpenoidlerin büyük çoğunluğu sekonder metabolittir (Takechi and Miyazawa, 2005). Terpenler bitki dokularında çoğunlukla serbest olarak, bazıları glikozitleri ya da organik asit esterleri halinde, bazen de proteinlerle birleşmiş olarak bulunmaktadır (Işık, 2005). Limonen ve sitral (her ikisi de limonda bulunur), pinen (çam ağaçları), ögenol (karanfil), geraniol (gül) ve mentol(nane) en yaygın bilinen terpenlerdir.

Doğal terpenlerin değiştirilmiş yapıları ve türevleri, parfümeri ve gıdalarda tatlandırıcı katkı maddesi olarak kullanılır. Terpenler kimyasal olarak değişime uğratıldıklarında, örneğin yükseltgenme veya karbon iskeletinin düzenlenmesi ile meydana gelen bileşiklere genel olarak terpenoid adı verilir. Kimyasal anlamda terpenler, değişik sayıdaki izopren (2 metil buta-1,3 dien) moleküllerinin “kafa-kuyruk” şeklinde birleşmesi sonucu meydana gelmektedir (Umay, 2007) (Çizelge 2.3). Terpenler, izopren (2-metil-1,3-butadien) oligomerleri olarak tanımlanabilirler. İzopren oligomerlerinden; C10 olanlara monoterpenler denir. C15 olanlara seskiterpenler denir. C20 olanlara diterpenler denir. C30 olanlara triterpenler denir. C40 olanlara karotenoidler denir.

Çizelge 2.3.Karbon Sayılarına Göre Terpenler (Güneş, 2010)

	Terpenler	İzopren birimler	Karbon Atomu sayısı
1	Monoterpenler	2	10
2	Seskiterpenler	3	15
3	Diterpenler	4	20
4	Sesterpenler	5	25
5	Triterpenler	6	30
6	Karotenoidler	8	40
7	Kauçuk		> 100 > 500

Terpenlerin çoğu hidrokarbonlardır; ancak alkoller, ketonlar veya aldehitler gibi oksijen içeren bileşikler de olabilirler. Bu türevler çoğunlukla terpenoids olarak adlandırılırlar. Monoterpenler ve seskiterpenler esansiyel yağların temel bileşenleridir. Diğer terpenler ise reçine, mum ve kauçuğun ana bileşenleridirler (Güneş, 2010).

Monoterpenler genelde uçucu yağların yapısında bulunurlar. Bugün uçucu yağlarda 150' den fazla monoterpen bulunmuştur. Çoğu serbest haldedir (Umay, 2007).

ANTİOKSİDANLAR

ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

SOD,
Katalaz,
GSH-Px,
Glutasyon Redüktaz

ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR

Terpenler			
Dieterpenler		Triterpenler	
Karotenoidler		Sesterpenler	
Sesquiterpenler		Kauçuk	
Monoterpenler			
Geraniol	Mentol	Sitral	Nerol

Mineraller	Vitaminler	Karotenoidler
Çinko, Selenyum	Vitamin A,C,E,K	Beta-Karoten, Likopen, Lutein
Organosülfür Bileşikleri	Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar	Antioksidan Kofaktörler
Allium, Allil Sülfid,	Glutasyon, Ürik Asit,	Koenzim Q10

Fenolik Asitler	
Hidroksi-sinnamik asit	
Ferolik,	p-kumarik
Hidroksi-benzoik Asit	
Gallik Asit,	Ellagik Asit

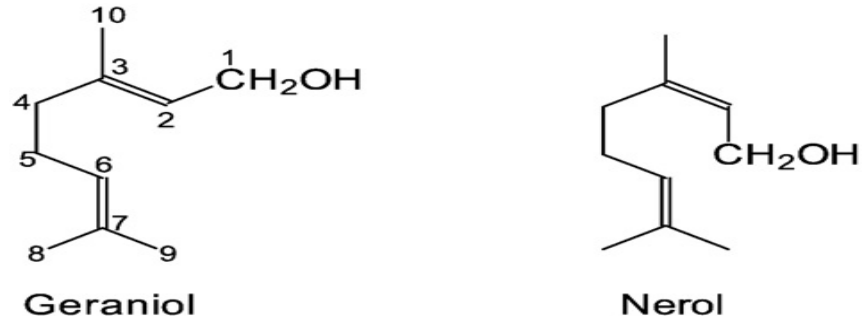
Flavanonlar	Flavonollar	Flavonlar
Hesperitin	Quercetin, Kaempferol	Krisin
Antosiyanidinler	Flavanollar	İsoflavanoidler
Siyanidin, Pelagonidin	Katesin,	Genistein,

Şekil 2.7 Antioksidanların sınıflandırılması (Özkaya, et al. 2010; Güneş, 2010)

2.5.2. Geraniol

Geraniol bilinen en eski organik bileşiklerden biridir (Takechi and Miyazawa, 2005). Monoterpenler sınıfına ait olan geraniol, asiklik monoterpenoid alkoldür (Bkz. Şekil 2.7). 10 karbon atomu taşıyan bir moleküler yapıya sahiptir. Kimyasal formülü $C_{10}H_{18}O$ şeklindedir. Molekül ağırlığı 154.25 g/mol, kaynama noktası $229^{\circ}C$, erime noktası $15^{\circ}C$ ve yoğunluğu 0.889 g/cm^3 'dür. Suda çözünmez; alkol, eter gibi organik çözücülerde çözünür (Lapczynski et al., 2008).

Saf geraniol renksiz, gül kokusuna benzer bir kokuya sahip, yağlı ve sıvı bir maddedir (Güneş, 2010). Gül ve palmanosa yağlarının ana bileşenidir. Zencefil, limon, ıhlamur, lavanta, hindistan cevizi, portakal v.b. bitkilerin uçucu yağlarının esasını teşkil eder (Tiwari and Kakkar, 2009).

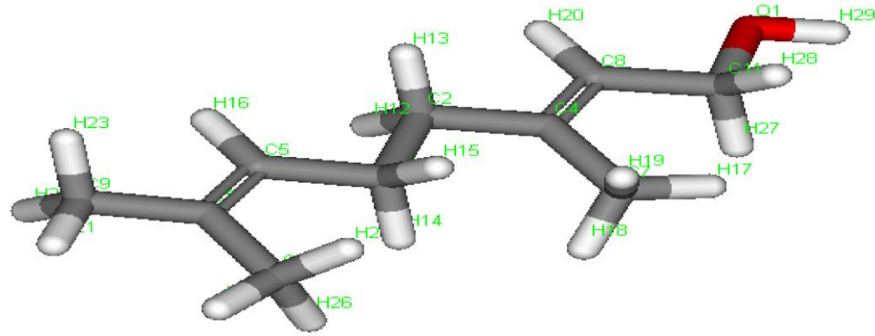


Şekil 2.8 Geraniol ve Nerol 'un kimyasal yapısı (Chen and Viljoen, 2010).

Geraniol ve nerol olmak üzere iki izomeri vardır (Şekil 2.8). Geraniol, koku verici olarak, parfümeri, sabun, şampuan ve krem gibi kozmetik ürünlerde ve dermatolojik kremlerin hammaddesi olarak ilaç sektöründe kullanılır (Chen and Viljoen, 2010).

Tedavi amaçlı ilaç olarak da değerlendirilen geraniolün ülkemizde ticareti de yapılmaktadır. Tat ve aroma verici olarak endüstride kullanılmaktadır (Güneş, 2010).

Vücudumuzu oluşturan her hücrede radikallere karşı ve bunların oluşturduğu hasarlara karşı vücudumuzda antioksidan savunma mekanizması mevcuttur. Bu savunma mekanizmasına yardımcı olan doğal maddelerden biride geranioldur. Geraniol kanser önleyici doğal bir antioksidandır. Yapısındaki hidroksil (-OH) gruplarından dolayı uçucu yağın serbest radikal bağlayıcı özelliğini gösterir (Şekil 2.9). Serbest radikal (SOR) hasarına karşı mitokondri membranını korur (Choi et al., 2000). Son yapılan bir araştırmada da geraniolün genotoksik maddelere karşı insan sağlığını koruyabileceği bildirilmiştir (Wiseman et al., 2007).



Şekil 2.9 Geraniolün yapısı (3,7-dimetil -2,6-oktadien-1-ol)

Geraniol, çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik özellikler gösterir. Birçok çalışmada geraniolün hoş kokusuna ek olarak böcek öldürücü ve kaçırıcı olduğu bilinen ve düşük toksisite sergileyen doğal bir haşarat kontrol maddesi olduğu vurgulanmıştır (Chen and Viljoen, 2010).

Diğer biyolojik aktiviteleri içinde antimikrobal, antioksidan, anti inflamatuvar ve bazı vasküler etkileri vardır. (Lapczynski et al., 2008).

3. MATERİYAL ve METOD

Deneysel çalışmamızın tamamı; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Deney Hayvanları, Moleküler Biyoloji ve Toksikoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)' nun 326/2013 sayılı izni ile yapılmıştır ve Etik Kurul Raporu Ek1'de sunulmuştur.

3.1. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmamızda *Wistar albino* erkek sıçanlar arasından rastgele seçimle her birinde n=7'ser sıçan olmak üzere toplam 4 grupta 28 adet sıçan kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları KOBAY Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı A.Ş. 'den temin edilmiştir. Deney hayvanlarının 1 hafta süre ile laboratuvar ortamına adaptasyonları sağlanmıştır. Deney hayvanları deney süresince 12; 12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22 ± 2 °C) ve nemi (%45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deney sürecinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart pellet sıçan yemi ile beslenmiş olup, çeşme suyu verilmiştir.

3.2. Deney Grupları

Grup 1 (Sham Grubu): Bu grup deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmenin ardından her hayvanın batin kısmı açılıp iskemi/Reperfüzyon hasarı oluşturulmadan sadece cerrahi strese maruz bırakılmıştır. İşlem sonrası 24 saat yaşatılıp ardından diseksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Grup 2 (İ/R Grubu): Bu grup deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmenin olması beklenilmiştir. İskemi işlemi gerçekleştirilmeden 1 saat önce intraperitoneal olarak serum fizyolojik verilerek 60

dakikalık iskeminin ardından 24 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Reperfüzyonun bitiminde anestezi altında diseksiyon gerçekleştirilmiştir.

Grup 3 (İ/R+ 50 mg/kg geraniol): Bu grup deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanmış ve nefroktami işleminin ardından 15 gün boyunca iyileşmenin olması beklenilmiştir. 15 gün iyileşme periyodunun ardından; 50 mg/kg tek doz geraniol, iskemi işleminden 1 saat önce deney hayvanlarına intraperitoneal olarak verilmiştir. Daha sonra 60 dakikalık iskeminin ardından 24 saat reperfüzyon işlemi uygulanmıştır. Reperfüzyonun bitiminde anestezi altında diseksiyon gerçekleştirilmiştir.

Grup 4 (İ/R+ 100 mg/kg geraniol): Bu grup deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanmış ve nefroktami işleminin ardından 15 gün boyunca iyileşmenin olması beklenilmiştir. 15 gün iyileşme periyodunun ardından; 100 mg/kg tek doz geraniol, iskemi işleminden 1 saat önce deney hayvanlarına intraperitoneal olarak verilmiştir. Daha sonra 60 dakikalık iskeminin ardından 24 saat reperfüzyon işlemi uygulanmıştır. Reperfüzyonun bitiminde anestezi altında diseksiyon gerçekleştirilmiştir.

3.3.Geraniol Uygulaması

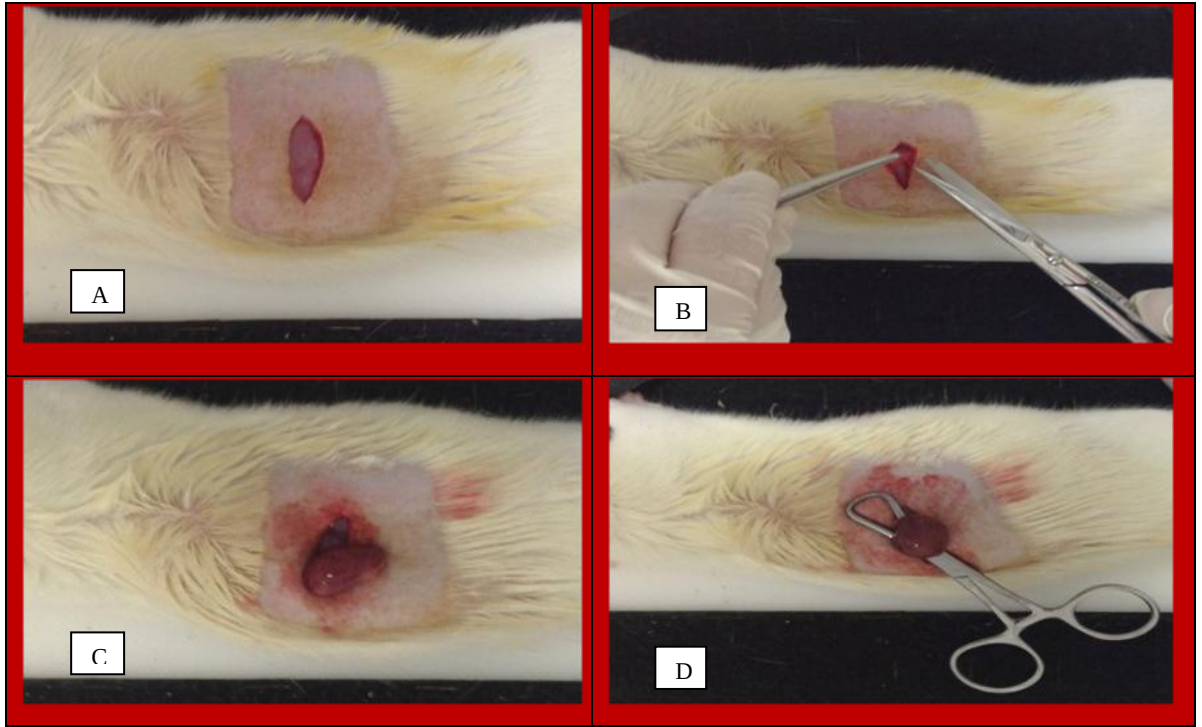
Uygulanacak dozlar, maddelerin güvenlik belgelerinde belirtilen oral LD₅₀ limitleri kapsamında düzenlenmiştir (Lapczynski et al; 2008). Ticari olarak temin edilen geraniol, (Sigma, 163.333) 50 mg/kg ve 100 mg/kg olarak iskemi işleminden 1 saat önce cam enjektörle deney hayvanlarına intraperitoneal olarak verilmiştir.

3.4. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak, hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak 09.00 ile 12.00 saatleri arasında yapılmıştır (Assy, et al., 1998; Karabelyos, et al., 1999; Akino, et al., 2005)

3.4.1. Nefrektomi İşlemleri

Nefrektomi yapılacak sıçanlara intramüsküler olarak 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi uygulanmıştır (Aydoğdu vd., 2005). Her bir deney hayvanı, ılık ve sabit sıcaklıkta olan diseksiyon tablasına sırt üstü pozisyonda tespit edilip, rektal ısı kontrolü yapılmıştır (Stangl, et al., 2009). Cerrahi uygulama bölgesinin temizliği %70'lik etil alkol ile sağlanıp, traş işleminin ardından sağ böbrek nefrektomisi gerçekleştirilmiştir (Waynforth and Flecknell., 1994). Her bir sıçana yapılan nefrektomiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için periton içine steril SF verilmiştir (Kaya, et al., 2002).



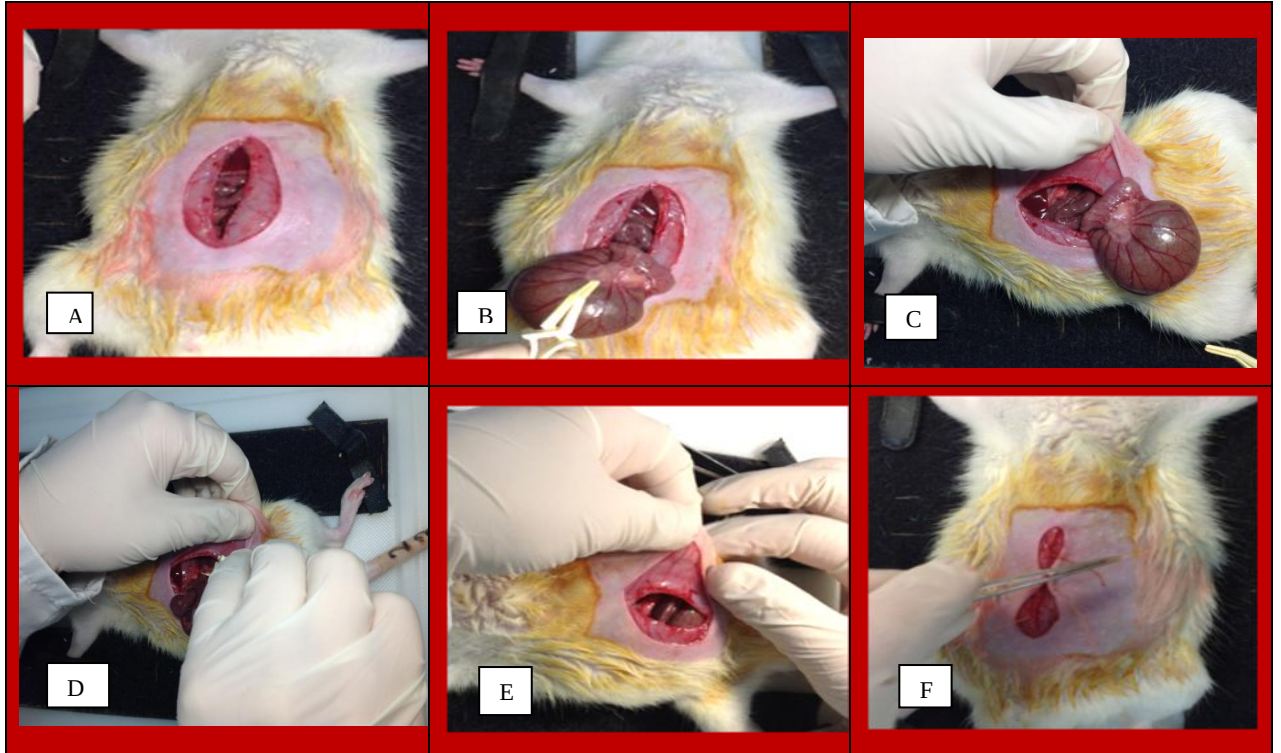
Şekil 3.1 Nefrektami işlemi. (A) Diseksiyon, (B) Kesitin bağ dokularından temizlenmesi, (C) Sağ böbreğin çıkarılması, (D) Sağ böbreğin sütür ile boğumlanıp vücuttan ayrılabilmesi için tutturulması

Kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kesi bölgesi kapatılmıştır. Cerrahi işlem görmüş her bir sıçanın; kimyasal sterilizasyonu

yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli şeffaf kafeslere ayrı ayrı koyularak 15 gün iyileşmesi sağlanmıştır.

3.4.2. İ/R İşlemleri

İskemi reperfüzyon yapılacak sıçanlara ketalar Rompun anestezisi altında midline laparotomi yapılmıştır. Sol renal arter izole edilerek, antitravmatik vaskular klemp yardımıyla 60 dakika süre ile kan akışı durdurulmuştur. 60 dakika iskeminin hemen ardından 24 saat reperfüzyon uygulanmıştır (Aydoğdu vd., 2005). Reperfüzyon süresince kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için periton içine steril SF verilmiştir. Bu işlemin ardından kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kesi bölgesi kapatılmıştır. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı, kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak reperfüzyon süresi boyunca yaşatılmıştır.



Şekil 3.2 İskemi/ reperfüzyon işlemleri. (A)Midline laparotomi, (B-C) sol renal arterin izolasyonu, (D) renal artere klemp takılması, (E) reperfüzyon işlemi, (F) cerrahi bölgesinin kapatılması

3.5 Örneklerin Alınması ve Değerlendirilmesi

Deney gruplarına ait sıçanların, hafif anestezi altında intrakardiyak kan alım yöntemi ile yaşamları sonlandırılmış ve dokuları alınmıştır.

3.5.1. Serum örnekleri

Kan örnekleri MSE Mistral 2000 marka cihaz ile 10 dk, 3000 rpm devirde santrifüjlenerek serumları elde edilmiştir. (Sanz, et al., 1998; Aktay, et al., 2000; Theocharis, et al., 2001). Ependorf tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal miktar analizleri için -80°C derin dondurucuda korunmuştur.

Böbrek hücrelerinin olası fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla biyokimyasal olarak serum örneklerinde BUN ve CRE değerleri ticari kit (Biolabo, Maizy, France) kullanılarak Crony Airone 200 RA otoanalizatör ile belirlenmiştir (Kaya, et al., 2002).

3.5.2. Böbrek doku örnekleri

Tüm gruplarda intrakardiyak kanın alınmasından hemen sonra sol böbrek alınıp $+4^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş serum fizyolojik ile hızlı bir şekilde yıkanmıştır. Böbrek doku örnekleri üç kısma ayrılarak orta kısım histolojik analizler için %10' luk nötralformaldehit fiksasyon sıvısına uygun şekilde konulabilmesi için doku kasetine, diğer kısımlar ise biyokimyasal analizler için polietilen tüplerde -80°C derin dondurucuya koyulmuştur.

Deney hayvanlarının diseksiyonu sırasında histolojik incelemeler için alınan orta kısım böbrek dokularının her biri, doku takip kaseti içerisinde %10'luk

nötralfomaldehit solüsyonunda 24 saat süre ile bekletilmiştir. Kimyasal fiksasyonu tamamlanan dokulara rutin doku takibi yapılmıştır. Daha sonra H&E boyama yapılarak böbrek kesitlerinin Olympus marka, CH40 model ışık mikroskopunda histolojik incelemeleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.1. Böbrek doku örneklerinin biyokimyasal analizleri

Böbrek İR sitotoksitesini aydınlatmak için böbrek doku örneği homojenatlarından Doğal (Native) Jel Elektroforez tekniği ile KAT, GPx, SOD izoenzimlerinin jelde yürümesi sağlanmıştır. Scie-Plus marka mini vertical Electrophoresis ünitesi kullanılarak enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Jayakumar, et al., 2007).

i-Homojenizasyon:

Homojenizasyon için; -80 °C'den çıkarılan böbrek dokusundan küçük bir parça alınarak hassas terazide tartılmıştır. Çıkan tartım sonucunun 4-5 katı miktarda soğuk ekstraksiyon tamponu (PO₄ çözeltisi) içinde böbrek dokusu homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4 °C, 5000 rpm de 1 saat santrifüj (Ependorff Centrifuge marka ve 5804 R model) edilmiştir. Süpernatant kısmı ependorf tüplerine bölünerek Doğal (Native) Jel Elektroforezi' nde kullanılmak üzere -80°C' ye ayrılmıştır.

ii Bradford yöntemi:

Doğal Jel Elektroforezi kullanılarak aktiviteleri belirlenecek olan KAT, SOD ve Gpx izoenzimlerinin total protein miktarları Qubit cihazı ile belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız Qubit testi, 260 nm UV absorbans da kantitatif olarak protein miktarını, boya bağlama (Bradford) yöntemi ile ölçme esasına dayanır. Protein deneyi için bu yöntem de 3 standart protein reaktifi ve çalışma solüsyonu 1:200 oranında seyreltilerek protein tamponu oluşturulmuştur. Bu protein tamponunu oda

sıcaklığında 15 dakika inkübe ettikten sonra cihaz ile (e Qubit® 2.0 Fluorometer), örneklerdeki protein miktarları okunmuştur.

iii-Doğal jel elektroforezi:

Doğal jel elektroforezinde kullanılan tamponlar, deterjan ve diğer denatüre edici maddeleri içermemektedir. Bu yöntem, Laemmli tarafından ilk defa 1970 yılında doğal koşullarda gerçekleştirilmiştir. Tüm çözeltiler deiyonize saf su ile hazırlanmıştır. Tris içeren tamponlar ‘trizma base’ ile hazırlanıp pH’ ları HCl ile ayarlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çözeltiler

A) Fosfat (PO₄) Tamponu (100 ml için)

Na₂HPO₄.7H₂O.....61ml

NaH₂PO₄.7H₂O.....39ml

B) Alt tank tamponu (63 mM Tris, 0.05 N HCl, PH:7.5)

Tris..... 22.7 g

1N HCl.....150ml

H₂O..... 3 litreye tamamlandı.

C) Üst tank tamponu (37.6 mM Tris, 40 mM glisin, PH:8.9)

Tris.....4.56 g

Glisin.....3 g

H₂O.....1 litreye tamamlandı.

D) TBE5x (0.5 M EDTA, PH:8)

Trisma-Base..... 54 gr

Borik Asit.....27.5 gr

EDTA20 ml

H₂O.....1000 ml’ ye tamamlanır.

E) %8' lik Jel (%40' lık Akrilamid/Bisakrilamid)

H ₂ O.....	5.2 ml
TBE5x.....	0.75 ml
Akrilamid/Bisakrilamid.....	1.5 ml
AP.....	50 µl
TEMED.....	7.5 µl

F) %10' luk Jel (%40' lık Akrilamid/Bisakrilamid)

H ₂ O.....	6.5 ml
TBE5x.....	0.94 ml
Akrilamid/Bisakrilamid.....	1.87 ml
AP.....	62.5 µl
TEMED.....	9.4 µl

G) Polimerizasyon başlatıcı (%10'luk amonyum persülfat çözeltisi)

%10 Amonyum Persülfat(AP).....	0.1 gr
H ₂ O.....	1 ml'ye tamamlandı.

H) Sükroz-boya Çözeltisi [% 50 sükroz, % 0.1 bromofenol mavisi (bromophenol blue)]

Sükroz.....	5 g
% 1 Bromofenol mavisi.....	1 ml
H ₂ O.....	100 ml'ye tamamlandı.

Jeller hazırlanırken, akrilamid ve bis akrilamid (çapraz bağlayıcı) yüzdelerinden hesaplanan %T ve % C_{bis} oranları göz önünde bulundurularak 19:1'lik akrilamid-bisakrilamid, tampon(TBE5x), TEMED ve su 50 ml'lik bir erlende karıştırılmıştır. Polimerizasyon başlatıcı (G çözeltisi) eklenip hafifçe çalkalandı ve elektroforez aletinin jel dökme aparatına, çeşitli kalınlık ve boyutta hazırlanabilmesine olanak sağlayan, iki cam (jel kaseti) arasına Pastör pipeti yardımı ile dökülmüştür.

Örnek uygulama kuyucuklarının oluşumunu sağlayan tarak, hava boşluğu kalmayacak şekilde, yükleme jelinin içine yerleştirilmiştir. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarılmıştır. Kuyucukların içi üsttank tamponu ile teker teker yıkanmıştır. 10 hacim örnek ile 1 hacim süktroz-boya çözeltisi karıştırılmıştır. Örnekler ve standart karışım her bir kuyucukta 15-100µg protein olacak şekilde mikropipet yardımı ile jel yüzeyine uygulanmıştır. Jel kasetleri tanka yerleştirilerek jel kasetlerinin altta kalan kısmına 2.5 litre alt tank tamponu eklenmiştir. Jel kasetlerinin bulunduğu üst bölüm ise üst tank tamponu ile doldurulmuştur. Anot ve katot bağlantıları takılıp sistem çalıştırılmıştır. İzleme boyası bromofenol mavisinden kaynaklanan mavi bant, jelin altına 0.5 cm kalana dek yürüdükten sonra işlem durdurulmuştur. Saptama yöntemleri kullanılarak analiz tamamlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

KAT aktivitesinin belirlenmesi Woodbury ve arkadaşlarının (1971) metoduna göre yapılmıştır. Proteini yürüttüğümüz %8'lik jel 5mM H₂O₂ solüsyonunda 10 dakika bekletilip yıkandıktan sonra %1'lik potasyum ferrik siyanid ve %1'lik ferik kloritten oluşan reaksiyon karışımına koyulup, jel boyanana kadar beklenmiştir. Koyu yeşil zeminde KAT aktivitesi gösteren protein bantları beyaz renkte boyanmıştır.

SOD aktivitesinin belirlenmesi Beauchamp ve Fridovich (1971) metoduna göre yapılmıştır. Proteinleri yürüttüğümüz jel, içerisinde 10 mg Nitro blue tetrazolium (NBT), 1 mg EDTA ve 2 mg riboflavin olan 50 mM Tris-HCl' de (pH:8) karanlık ortamda 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra jel beyaz ışıkla incelendiğinde mavi-menekşe zemin içerisinde SOD aktivitesi gösteren bantlar şeffaf olarak gözlenmeye çalışılmıştır.

Gpx izoenzim aktivitesini ölçmek için Lin ve arkadaşlarının (2002) metodu kullanılmıştır. Proteinleri yürüttüğümüz jel, içinde 200 mg glutatyon ve %30 H₂O₂ 50mL, 50 mM Tris HCl buffer (pH:8) karışımlı çözeltide 30 dakika bekletildikten sonra, içerisinde 25 mg NBT ve 25 mg PMS bulunan 50 mL 50 mM tris-HCl buffer (pH:8) bulunan çözeltiye aktarılmıştır. Gpx izoenzim aktivitesinin olduğunu gösteren beyaz renkte bantlar gözlenmeye çalışılmıştır.

Tüm deney grubu hayvanlarının böbrek dokularına ait olan KAT, GPx ve SOD enzim aktiviteleri sonucu jelde ortaya çıkan bantlar Kodak Gel Logic 1500 Imaging System Jel görüntüleme sisteminde Kodak Molecular Imaging Software paket programı kullanılarak fotoğraflandırılmıştır. Jel üzerinde enzim aktiviteleri sonucu oluşan bölgelerin alanları deney grupları arasında karşılaştırmalar yapılmak üzere sayısal olarak ölçülmüştür.

3.5.2.2.Böbrek doku örneklerinin histolojik analizleri

Deney hayvanlarının diseksiyonu sırasında histolojik incelemeler için alınan böbrek dokularının her biri doku takip kaseti içerisinde %10 tamponlanmış formaldehit solüsyonunda 24 saat süre ile bekletilmiştir. Tespit işlemi sonrasında rutin histolojik takip metodu kullanılarak parafin içine gömülen doku örneklerinden mikrotom yardımı ile 5µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler hematoksilin eozin boyama metodu kullanılarak boyandı ve preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. H&E boyanmış böbrek kesitlerinin ışık mikroskobu düzeyinde histolojik incelemeleri yapılmıştır.

Hazırlanan tüm doku kesitleri Olympus marka, CH40 marka ışık mikroskobunda incelenerek Spot Insight marka 3.2.0. model dijital kamera ve Spot advanced, 4.0.6 version program yardımıyla fotoğraflandırılmıştır.

3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 20.0 for Windows” versiyonu bilgisayar paket programı ile One Way Anova – Tukey testi kullanılmıştır. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal olarak ortaya çıkan değer (P) açısından gruplar karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklar $P < 0.05$ veya $P < 0.001$ olduğunda anlamlı görülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analiz sonuçları; “Serum örneklerinde biyokimyasal analizler” ve “Böbrek doku örneklerinde elektroforetik analizler” başlıkları altında değerlendirilmiştir.

4.1.1. Serum örneklerinde biyokimyasal analizler

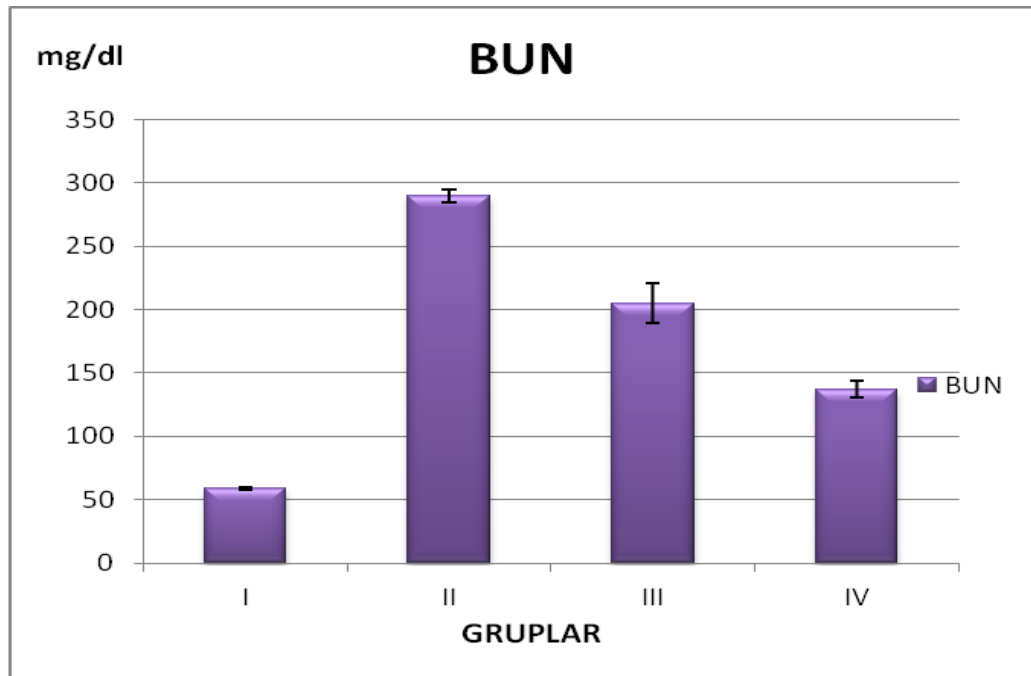
Grup I, II, III ve IV’deki deney hayvanlarına ait kan serumlarının biyokimyasal analizlerinden elde edilen BUN ve CRE miktarları bu gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen BUN ve CRE miktarlarının ortalama değerleri $\pm$ standart hata değerleri (n=7).

Gruplar	n	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)
I	7	58,95 $\pm$ 1,176	0,47 $\pm$ 0,035
II	7	289,67 $\pm$ 5,410 ^a	4,02 $\pm$ 0,200 ^a
III	7	205,12 $\pm$ 16,132 ^{ab}	1,34 $\pm$ 0,206 ^b
IV	7	136,88 $\pm$ 6,569 ^{abc}	0,74 $\pm$ 0,036 ^b

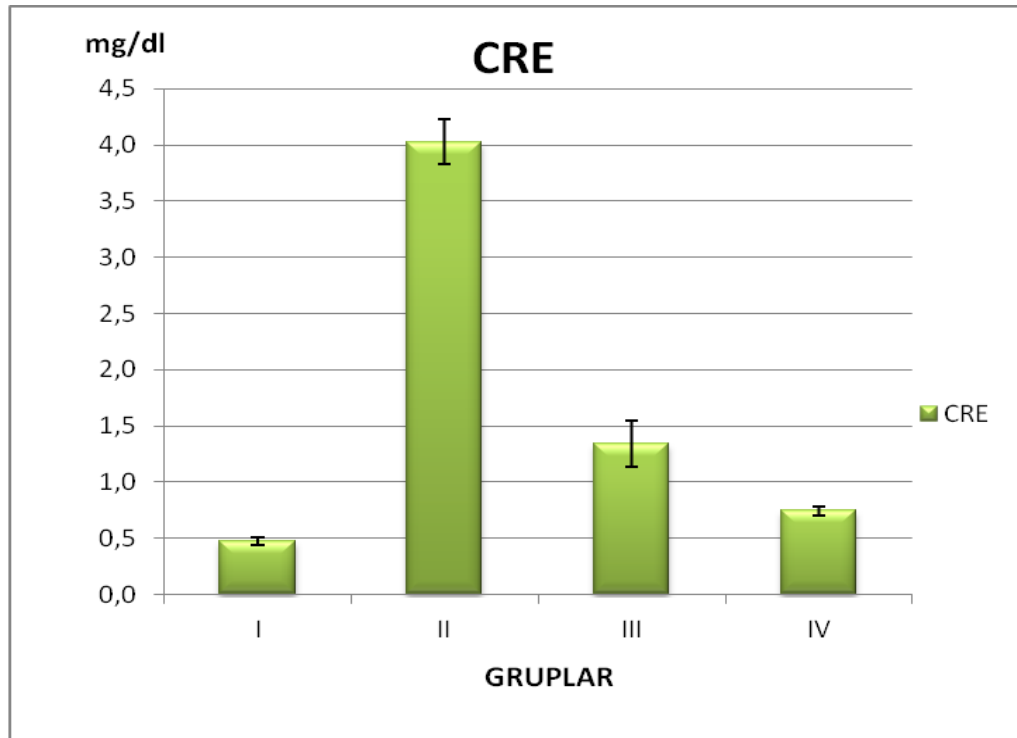
P < 0.05 **a:** Grup I’den; **b:** Grup II’den; **c:** Grup III’den anlamlı fark vardır.

Serum BUN değerleri İ/R grubunda sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Grup II, III, ve IV'ün; Grup I'den istatistiksel olarak önemli derecede artış göstermesi anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$ ve Çizelge 4.1). Grup II ile Grup III, IV'ün BUN miktarları karşılaştırıldığında ise Grup IV ve Grup III, Grup II'ye göre istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir ($p<0.05$). Grup IV, Grup I ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak yakın bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Grup I, II, III ve IV'e ait serum BUN seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

Kan serumlarında belirlenen kreatinin (CRE) seviyelerine bakıldığında; Grup II değeri, Grup I değerinden önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($P<0.05$ ve Çizelge 4.1). Grup III ve Grup IV'ün, Grup I ile karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Aynı zamanda Grup III ve Grup IV, Grup II' den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2.Grup I, II III ve IV'e ait serum CRE seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

4.1.2. Böbrek Doku Örneklerinde Elektroforetik Analizler

Tüm deney gruplarına ait böbrek doku örneği homojenatlarında Doğal (Native) jel Elektroforez tekniğiyle Scie-Plas marka küçük dikey elektroforez ünitesinde KAT, SOD ve Gpx izoenzimlerinin jelde yürümesi sağlanarak substrat ile tepkimelerine göre aktivitesi belirlendi ve jel üzerinde görüntülenerek ölçülen sayısal alan değerleri elde edildi (Çizelge 4.2).

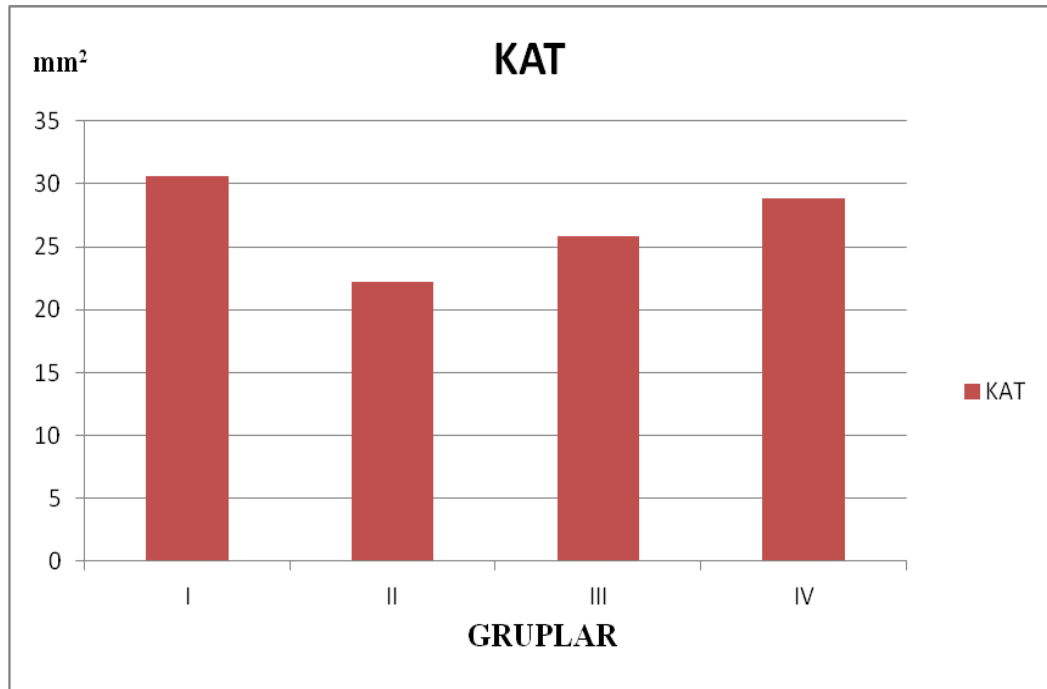
Çizelge 4.2. Deney gruplarına ait hayvanların böbrek dokusu örneklerinde belirlenen KAT, SOD ve Gpx enzim aktiviteleri sonucu oluşan bant alanlarının ortalama değerleri (mm²)

GRUPLAR	KAT mm ²	SODmm ²			GPx mm ²			
		SOD1	SOD2	SOD3	Gpx1	Gpx2	Gpx3	Gpx4
I	30,56	17,45	13,87	10,77	4,77	12,72	8,43	10,70
II	22,18	14,20	8,85	8,39	3,12	8,56	8,68	7,38
III	25,82	15,08	10,68	8,97	4,42	8,68	9,19	8,38
IV	28,82	14,50	10,68	12,16	4,36	7,38	10,02	9,90

KAT enziminin elektroforetik analiz sonuçlarında tüm gruplarda tek bir bant ortaya çıktı. Grup II'e ait böbrek dokusundaki bant alanı; Grup I, III ve IV'deki bant alanlarından düşük iken Grup I'deki bant alanı; tüm grupların bant alanından yüksek bulundu (Çizelge 4.2). Grup IV'de bant alanı Grup I'e yakın iken Grup III'deki bant alanı Grup II'ye yakın ölçüldü. (Şekil 4.3; Şekil 4.4).

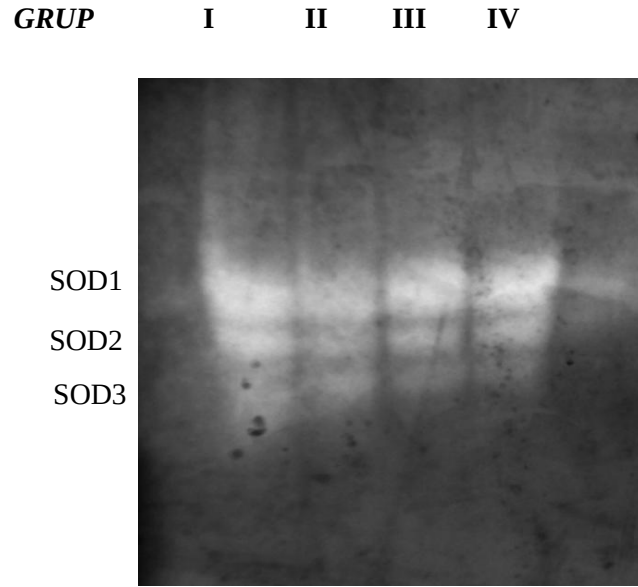
GRUP**I****II****III****IV****KAT**

Şekil 4.4.Gruplara ait KAT izoenziminin elektroforetik bantlar

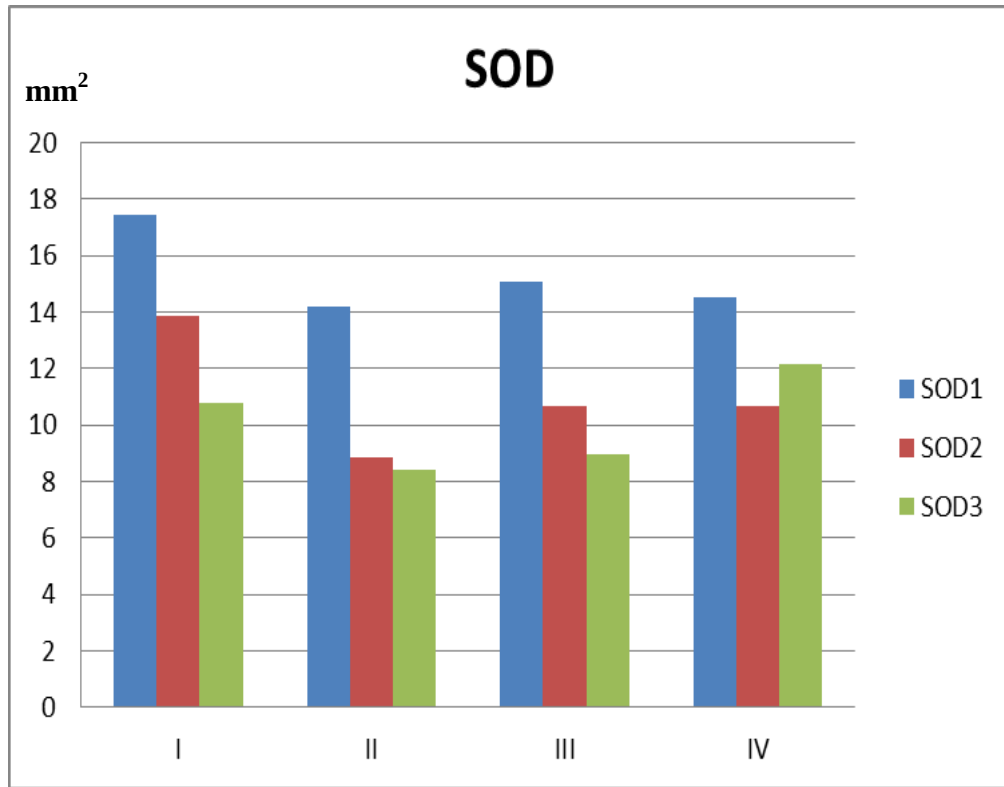


Şekil 4.3 Grup I, II, III, IV'e ait böbrek dokusu örneklerinde belirlenen KAT enzim aktivitesi sonucu oluşan bant alanlarının ortalama değerleri (mm²).

Böbrek dokusunda SOD enziminin jel üzerinde belirli alan ölçülerine sahip SOD1, SOD2 ve SOD3 olmak üzere üç izoenzimi görülmüştür. Tüm izoenzimler incelendiğinde Grup I' de bant alanları yüksek bulunurken, Grup II bant alanları tüm gruplardan düşük bulunmuştur. Grup III ve IV' ün benzer bant alanı oluşturdıkları ve Grup III ve IV' ün bant alanlarında, Grup II'ye göre yükselme tespit edilmiştir. Bunun yanında Grup IV bant alanı Grup I bant alanına yakın görülmüştür. (Şekil 4.5; Şekil 4.6).

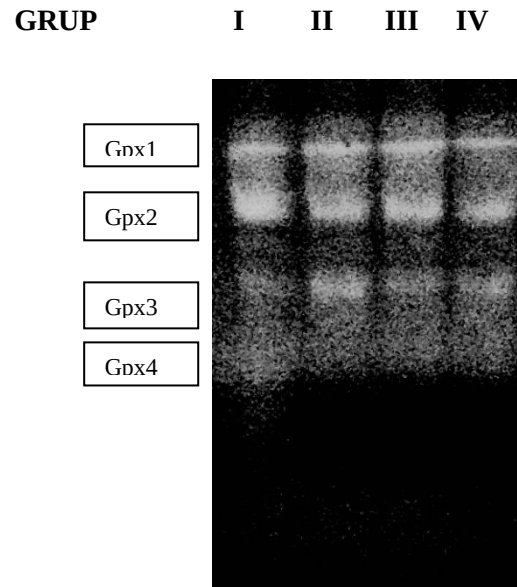


Şekil 4.5. Gruplara ait SOD izoenzimlerinin elektroforetik bantları

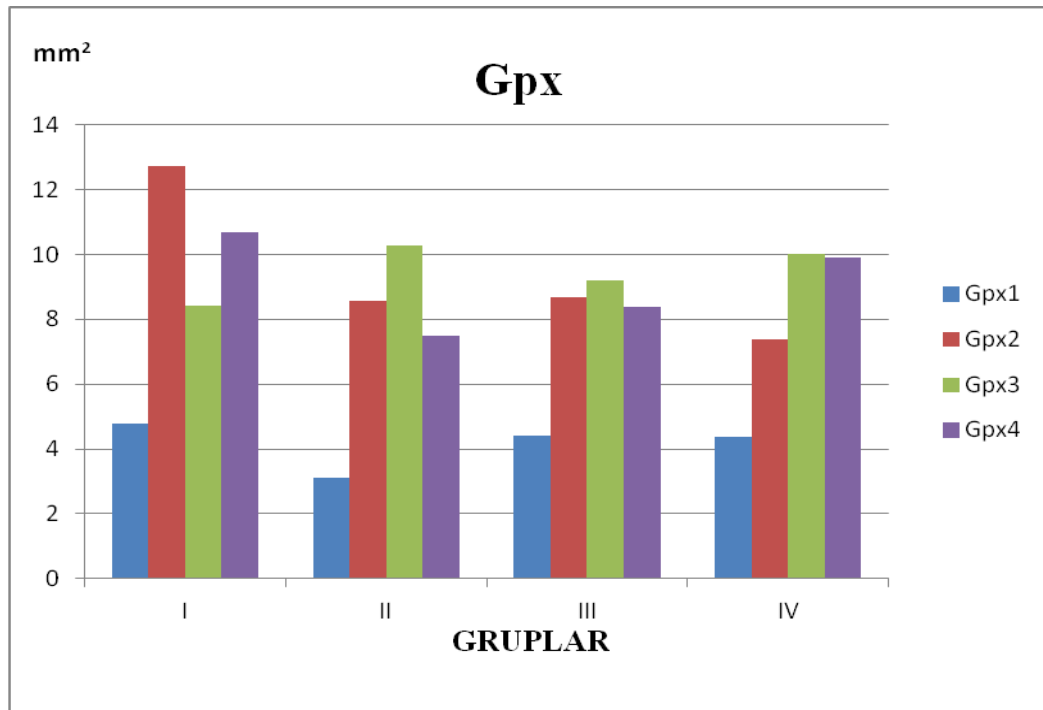


Şekil 4.6. Grup I, II, III, IV'e ait böbrek dokusu örneklerinde belirlenen SOD1, SOD2, SOD3 enzim aktivitesi sonucu oluşan bant alanlarının değerleri (mm²).

Böbrek dokusunda Gpx enziminin; Gpx1, Gpx2, Gpx3 ve Gpx4 olmak üzere dört izoformu tespit edilmiştir. Gpx1 bant alanının Grup II'si; tüm gruplara göre yüksek bant alanı gösterilmiştir. Gpx2 ve Gpx3 bant alanlarının Grup II'sinde de diğer gruplara göre artma belirlenmiştir. Gpx4 bant alanı Grup II'ye göre Grup III ve IV'de azalmıştır. Tüm izoenzimlere total olarak bakıldığında GrupII'nin bant alanı yüksek bulunmuştur (Şekil 4.7.; Şekil 4.8)



Şekil 4.7 Gruplara ait Gpx izoenziminin elektroforetik bantları



Şekil 4.8 Grup I, II, III, IV'e ait böbrek dokusu örneklerinde belirlenen Gpx enzim aktivitesi sonucu oluşan bant alanlarının ortalama değerleri (mm²).

4.2.Histolojik Analizler

Çalışmamızda uzun süreli İ/R hasarına karşı geraniolün doza bağlı koruyucu etkisi, H&E ile boyanmış böbrek dokularında detaylı olarak incelenmiştir.

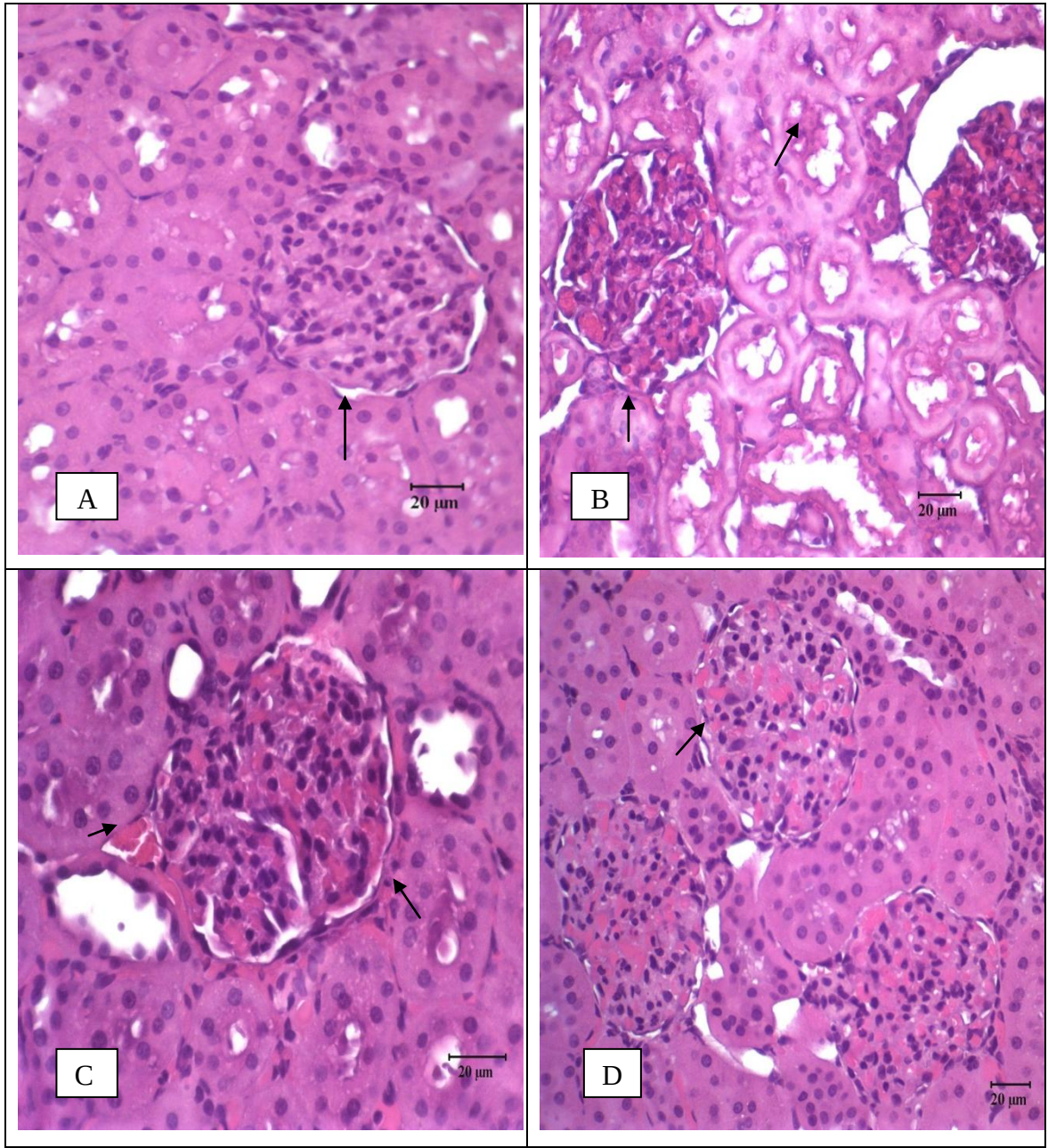
Deneyssel çalışmamızın kontrol grubu olan Grup I sıçanlarına ait H&E ile boyanmış böbrek kesitleri incelendiğinde glomerul yapısı, bowman kapsülü ve aralığı ile tübüllerin normal görünümde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9-A).

Grup II' ye ait hayvanların böbrek kesitlerinde glomerullerde yaygın kanama alanları ve tübül yapılarında bozulmalar tespit edilmiştir. Ayrıca tübül hücrelerinde şişme ve buna bağlı olarak tübüller içerisinde sıvı birikimi ve hücre döküntülerinin oluşturduğu tübüler deformasyon görülmüştür (Şekil 4.9-B).

50 mg/kg geraniol verilen Grup III böbrek dokularında ise IR grubuna göre tübüllerde biraz daha az şişme ve hücre apikallerindeki sitoplazma kaybında azalma görülmüştür. Bunun yanı sıra vakuolizasyon, tübüller arasında kısmi kanlanmalar devam etmektedir (Şekil 4.9.-C ve Şekil 4.12).

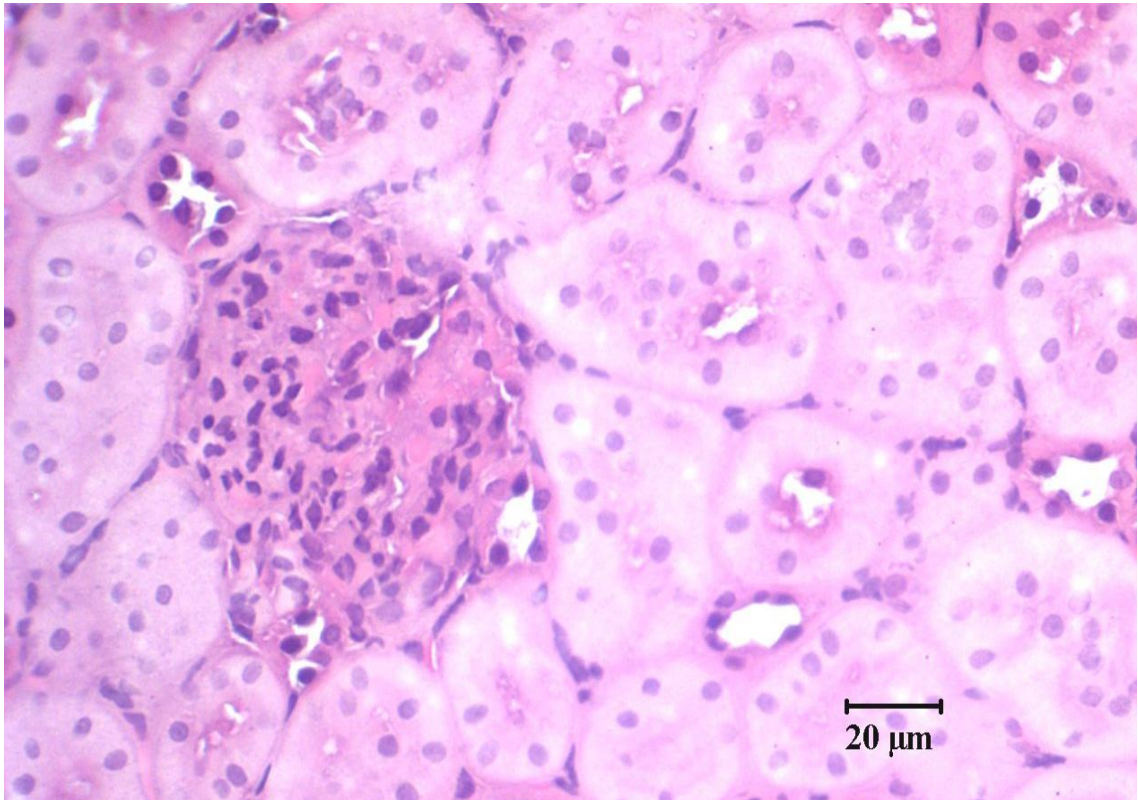
100 mg/kg geraniol verilen Grup IV hayvanlarının böbrek histolojisi incelendiğinde; İ/R hasarından büyük ölçüde koruyabildiğini gösterir nitelikteydi. 100 mg/kg verilen geraniol'ün tübüler sıvı birikiminde ve kanama görülen bölgeler de azalma tespit edilmiştir. Bu görünümlere ek olarak tübül hücrelerive glomerüler yapı Grup I' e yakın bulunmuştur (Şekil 4.9-D ve Şekil 4.13).

Gruplardaki böbrek histolojik doku örneklerinde; glomerül ve bowman kapsülünde değişim, glomerül ve bowman kapsül aralığı karşılaştırılmalı olarak şekil 4.9' de incelenmiştir.



Şekil 4.9 Grup I(A), II(B), III(C), IV(D)'e ait Böbrek tübül hücreleri ve glomerülün genel görünümü (↑)

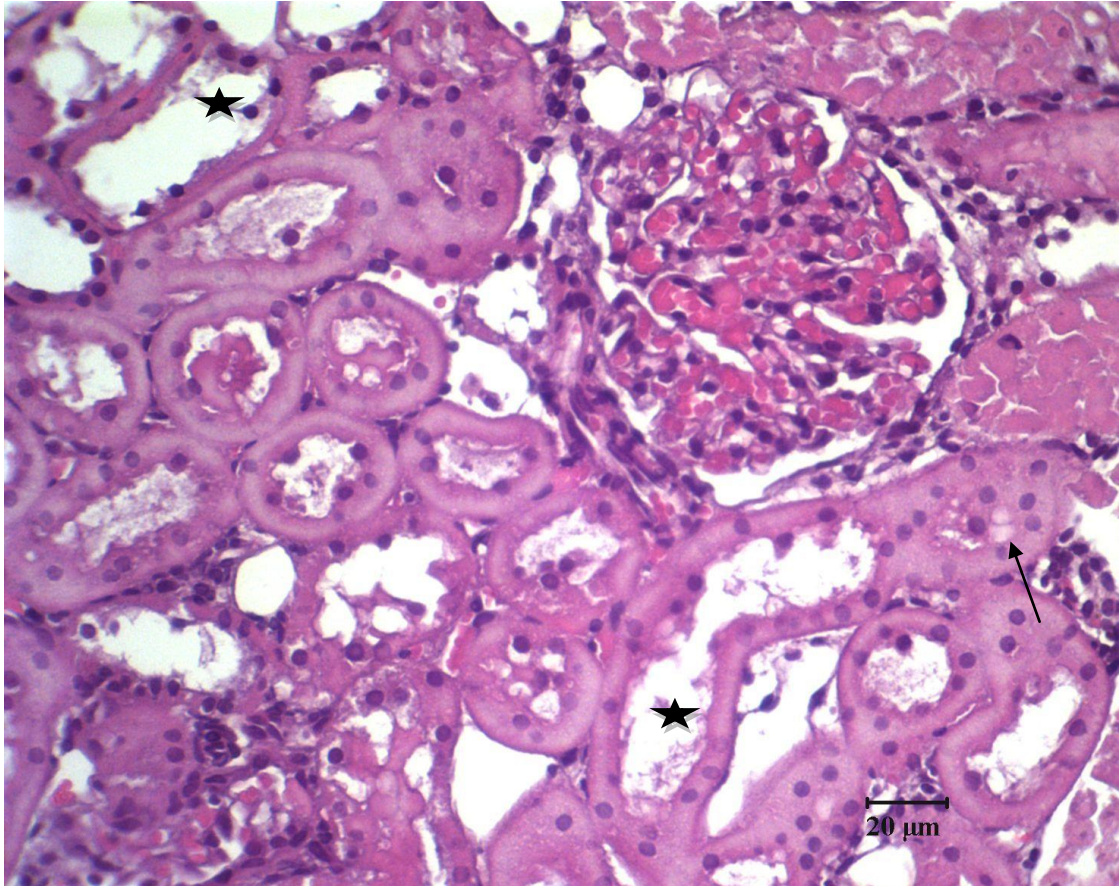
Sham grubu olan Grup I sıçanlarına ait H&E ile boyanan böbrek kesitleri incelendiğinde glomerül yapısının, bowman kapsülü ve aralığı ile tübüllerin normal yapı gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10 Grup I'e (sham grubu) ait Böbrek tübül hücrelerinin ve gromerülün görünümü H&E.

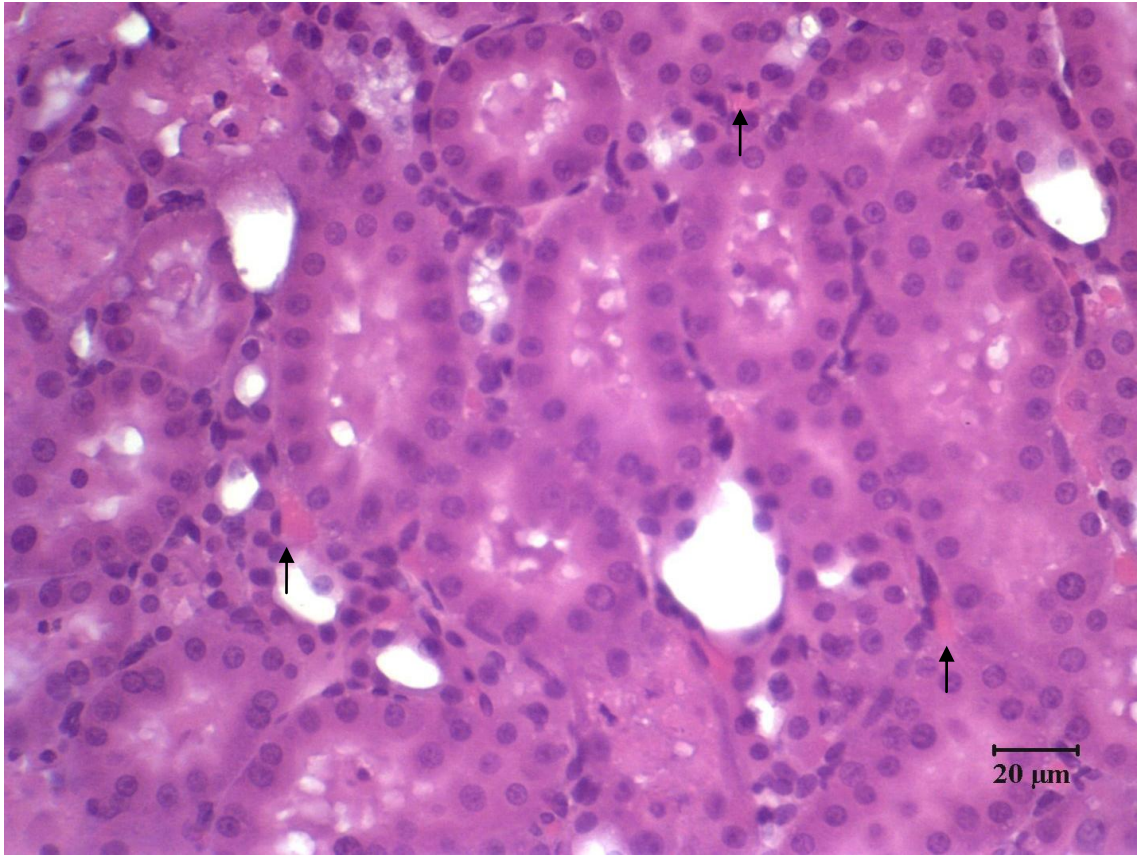
IR grubu olan Grup II' ye ait hayvanların böbrek kesitleri incelendiğinde glomerül ve bowman aralığında genişleme görülmüştür. (Şekil 4.11). Grup II'de ayrıca tübüllerde dejenerasyon ve hücre parçalanmaları ve yine tübül hücrelerinde şişme, buna bağlı olarak tübüller içerisinde sıvı birikimi ve vakuolizasyon gözlenmiştir. (Şekil 4.11).

Bununla birlikte yoğun olarak tübüller arasında kanlanma olduğu görülmüştür. (Şekil 4.11).



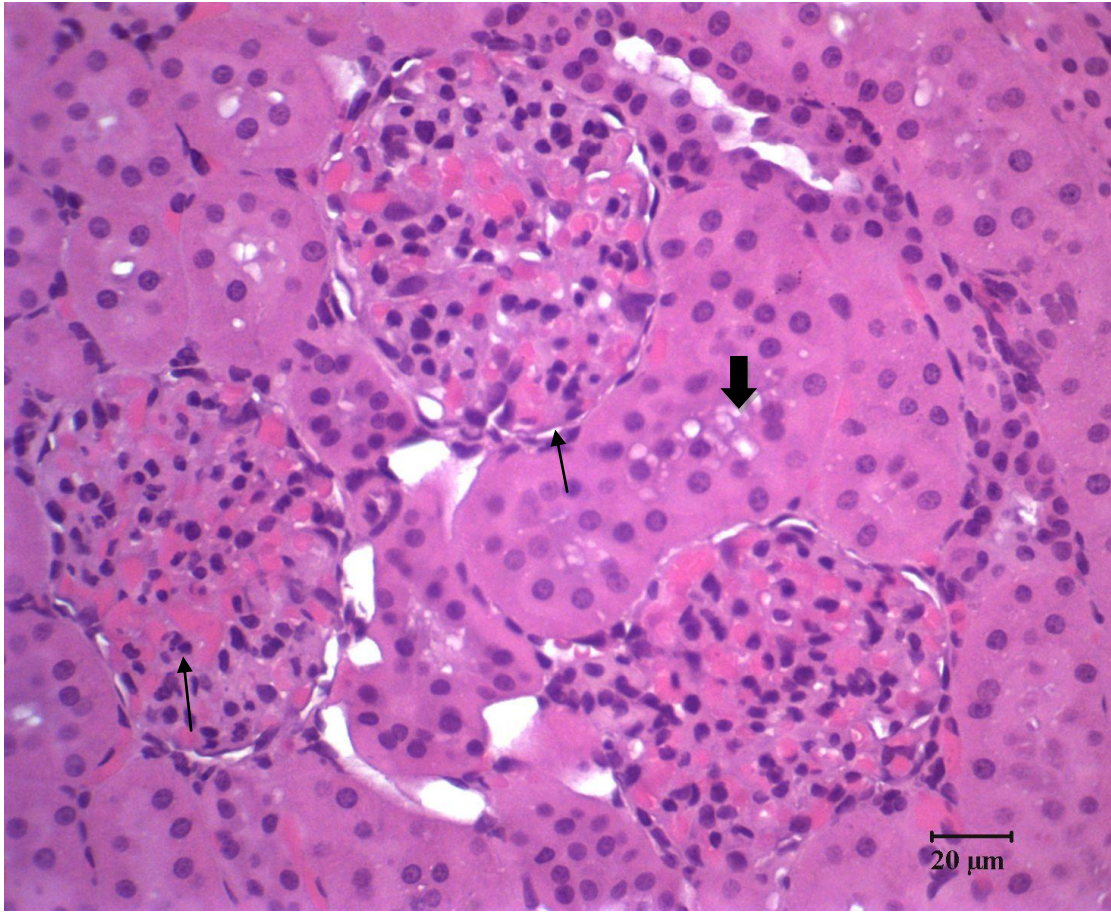
Şekil 4.11 Grup II'e (İ/R grubu) ait böbrek doku örneklerinde vakuolizasyon (↖) ve tübül hücre dökülmesi (★) (H&E).

50 mg/kg geraniol verilen Grup III böbrek dokularında, tübül hücrelerinde kısmi bir koruma görülmüştür. Bunun yanı sıra tübüller arasında kanlanma ve ara ara vakuolizasyonlar gözlenmektedir (Şekil 4.12.). Grup IV ile karşılaştırıldığında 50 mg/kg geraniol dozunun; 100 mg/kg geraniol dozu kadar koruyucu olmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.12 Grup III'e ait böbrek doku örneklerinde, normal görünümlü tübül hücreleri ve hafif kanlanma (↑) (H&E).

100 mg/kg Geraniol verilen Grup IV' de böbrek histolojik dokularından elde edilen görüntüler sham grubu ile yakın bulunmuştur. Buna göre; glomerül ve böbrek tübülleri normal görülmekte olup, hücre dökülmeleri gözlenmiştir. Fakat hafif vakuolizasyon ve kanlanma görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Grup IV'e ait böbrek doku örneklerinde glomerül (↑) , vakuolizasyon (↓) ve hafif kanlanma (H&E).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Organizmada çeşitli etkenlere bağlı olarak, organların kan akımından yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi; hücrel enerji depolarının boşalmasına, hücre içi haberleşme sisteminin bozulmasına ve hücrelerde zincirleme reaksiyonlar sonucu meydana gelen toksik metabolitlerin birikmesine neden olmaktadır (McCord, 1985.; Şener ve Yeğen, 2009).

İskemik dokuya hem hücrenin yenilenmesi hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı (reperfüzyon) gereklidir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu ile oluşan hasar, iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi düzeydedir (Zimmerman and Granger, 1992). İskemi reperfüzyon hasarına sebep olan birçok faktörün yanı sıra bu hasarın temel nedenin SOR (süperoksit radikalleri) olduğu düşünülmektedir (Zapletal, et al., 2008; Montalvo-Jave, et al., 2008). SOR salınımı doku reperfüzyonu esnasında kandaki oksijen miktarının hızlı artışına bağlıdır (Aktoz, 2004) SOR salınımı sonucu hücrede çeşitli fonksiyon bozuklukları meydana gelir (Sroka and Cisowski, 2003).

SOR oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücudumuzda birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar “Antioksidan Savunma Sistemi” olarak bilinir (Akkuş, 1995). Organizmada SOR’ların oluşum hızı ile antioksidan savunma sisteminin etkisizleştirme hızı dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşın savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı artarsa bu denge bozulmakta ve SOR’a bağlı zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır (Dündar ve Aslan 2000).

Oluşan SOR'lar antioksidan savunma mekanizmaları ile enzimatik (Süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz, Katalaz) veya nonenzimatik (polifenoller, flavonoidler, terpenler v.b.) yol aracılığıyla zararsız duruma getirilebilir (Aktoz, 2004).

Bu çalışmada kullanılan geraniol (3,7-dimetil -2,6-oktadien-1-ol) yapısında hidroksil molekülü içeren monoterpenoid bir alkoldür. Geraniol kimyasal yapısında hidroksil (-OH) grupları bulundurmasından dolayı iyi bir antioksidan özellik gösterir (Choi, et al., 2000).

Geraniol maddesi, ülkemizde bol miktarda bulunan ve Rosaceae (gülgiller) ailesinden güzel kokulu bir bitki olan gülün (*Rosa damascena*) taze çiçeklerinin distilasyonu ile elde edilen doğal gül yağının içerisinde bulunmaktadır (Iijima, et al., 2004). Svoboda ve ark. (1998) esansiyel yağ içerisinde bulunan bileşiklerden carvacrol, citronellol, eugenol, geraniol ve limonenin besin maddelerinin genetik değişime etki yapmaksızın besinlerin korunmasında etkili olduklarını göstermişlerdir.

Böbreklerde deneysel iskemi-reperfüzyon hasarının etkilerinin ortaya çıkması için belli bir iskemi süresine gerek vardır. Sıçan böbreğinde yapılan çalışmaların bazılarında 45 dakikalık, bazılarında ise 60 dakikalık iskemi süresinden sonra reperfüzyon hasarının ortaya çıktığı gözlenmiştir (Akkoç 2010). Literatürde, renal iskemi reperfüzyon hasarının, doku örneği ve serum analiz çalışmaları ile en erken 4. saatte ortaya çıktığı, tepe noktasına da 24 saatte ulaştığı rapor edilmiştir (Paller, et al., 1984). Bu çalışmada da renal iskemi reperfüzyon hasarının etkilerini net olarak araştırmak istediğimiz için çalışmamızda 60 dakika iskemi 24 saat reperfüzyon süresini literatüre uygun şekilde tercih ettik.

Çalışmamızda, doğal bir antioksidan olan geraniol'un uzun süreli iskemi/reperfüzyon hasarına karşı olası koruyucu etkisi, biyokimyasal ve histolojik olarak elde edilen bulgularla değerlendirilmiştir.

Protein metabolizmasının yıkım ürünü olan, toksik etkili amonyağın detoksifikasyonu ile oluşan üre, böbrek fonksiyonlarının bir göstergesidir (Altıntaş ve Bilgili, 1992; Duman ve Erden, 2004). Üre suda çözünebilir ve böbrek yoluyla idrardan atılır. Biyokimyasal analiz sonuçlarında üreden ziyade BUN (Kan Üre Azotu) terimi kullanılır. BUN, kandaki ürenin azot kısımlarının miktarını ifade eder. Bu da toplam üre miktarının yaklaşık % 46'sıdır.

Plazma BUN düzeyinin artması, bozulmuş böbrek fonksiyonunun sonucudur. Bu artışı sağlayan sadece böbreğe bağlı nedenler değildir. Yüksek proteinli diyet alımı, kalp yetmezliği, aşırı tuz ve su kayıpları, enfeksiyonlar, cerrahi girişimler, yanıklar, yüksek ateş ya da doku yıkımı plazma BUN düzeyinin yükselmesine neden olabilir (Duman ve Erden, 2004). Kolayca filtre olan ürenin %40-50 kadarı proksimal tübüllerden geri emilmektedir (Onat, 2006).

Çalışmamızda İ/R sonrası serum BUN düzeyi incelendiğinde tüm gruplarda Grup I (sham grubu)'e oranla anlamlı derecede yükselme görüldü. Grup I (sham grubu) ile Grup II (İ/R grubu) karşılaştırıldığında anlamlı farklar gözlemlendi ($p<0.05$). Bu durum İ/R işleminin amaca uygun olarak böbrek fonksiyonlarını olumsuz etkilediğini düşündürdü. Tedavi gruplarından olan Grup III (50 mg/kg geraniol) ve Grup IV (100 mg/kg geraniol) BUN değerlerinin ise; Grup II (İ/R grubu)'ye göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha düşük bulunması geraniol'ün koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Kan üre düzeyini tek başına değerlendirmek yerine, kreatinin ile birlikte değerlendirmek böbrek fonksiyonları açısından daha doğru olur. Kreatinin, iskelet kaslarındaki kreatin'in su kaybetmesi ile oluşur (Duman ve Erden, 2004). Serum kreatinin düzeyi renal (glomerular) fonksiyonun bir belirleyicisidir. İR hasarı sonrasında serum kreatinin seviyesinde gözlenen yükselme, böbrek proksimal tübül hücrelerinde meydana gelen fonksiyon bozukluğunun bir göstergesidir (Thiemerman, et

al., 2003). Kreatinin dolaşımından özellikle glomerüler filtrasyona uğrayarak uzaklaştırılır. Bunun yanı sıra tübülerden geri emilime uğramamaktadır (Onat,et al. 2006). Dolayısıyla glomerüler filtrasyon ve renal kan akımı değişikliklerinden kolaylıkla etkilenir (Duman ve Erden, 2004).

Serum CRE düzeyi bakımından Grup II, III, IV; sham grubu ile karşılaştırıldığında artışları, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p<0.05$). CRE düzeyinde kaydedilen artış Grup II (İ/R grubun)'de yüksek iken, Grup III ve Grup IV' de Grup II'ye göre anlamlı derecede düşüş gözlenmiştir. Özellikle tedavi grubu olan Grup IV (100 mg/kg geraniol)'de görülen CRE düzeyinin, Grup I CRE düzeyine anlamlı derecede yaklaşması, geraniolün 100 mg/kg dozunun iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu gösterdi.

Gönüllü ve arkadaşları yaptığı çalışmada (2013), sağ nefroktami uygulanmış sıçanlarda; sol böbreğe 60 dk. iskemi, 45 dk reperfüzyon yapmış olan Koçoğlu, et al., (2009)'ün çalışmasını model almıştır. Çalışmasında iskemi süresini 60 dk., reperfüzyon süresini ise hasarın maksimum etki gösterdiği 24. saat olarak belirlemiştir. Çalışma sonunda ise serum BUN, CRE seviyelerinin İ/R grubunda arttığı, deksmedetomidin verilen grupta ise düşüş olduğunu rapor etmişlerdir.

Williams ve ark. ise, bilateral renal arter ve veni klempleyerek oluşturdukları iskemi modelinde iskemi süresini 45 dk. tutup reperfüzyondan sonraki 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 24. saatlerde ve 1 hafta sonra İR hasarının kan BUN ve CRE düzeyleri ile böbrek histolojisine etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar renal hasarın 45 dk.'lık iskemiye takiben en erken 4. saatte başladığını ve hasarın 24. saatte maksimum etki yaptığını bildirmişlerdir.

Aydoğdu ve ark. 'nın yaptığı (2005) 60 dk. iskemi, 24 saat reperfüzyon çalışmasında; serum BUN, CRE düzeylerin arttığı rapor edilmiştir. Bu da bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Benzer sonuçlar Şahin (2011)'in yaptığı

çalışmada da gözlenmiştir. Bu çalışmada koruyucu madde olarak pioglitazon kullanılmıştır. İ/R süreleri ise 60 dk / 24 saat olarak belirlenmiş ve böbrek üzerine koruyucu etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak İ/R grubunda serum kreatinin miktarları en yüksek iken, tedavi gruplarında ise düşüş olduğu rapor edilmiştir.

Yanarates ve ark. (2008) sıçanlarda 60 dk. iskemi ve 6 saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarda serum üre ve kreatinin düzeyleri ile histopatolojik böbrek hasarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğunu bildirmişlerdir.

Benzer çalışmalarla da böbrek İ/R'nun neden olduğu hasarda serum BUN ve CRE değerlerinin kontrol gruplarına göre zamana bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Şahsıvar, 2007).

Çalışmamızda saptanan böbrek serum BUN ve CRE düzeyleri literatür bilgisiyle uyumlu olup, SOR 'a bağlı uzun süreli böbrek İ/R hasarında serum BUN ve CRE düzeylerinin anlamlı derecede yükseldiğini göstermektedir.

SOR oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinir (Akkuş, 1995). Süperoksit (O_2^-) radikallerinin yol açtığı oksidatif hasara karşı antioksidan savunmada rol alan ilk enzim SOD'dır. SOD enzimi O_2^- radikallerini H_2O_2 ve O_2 'e dönüştürür. KAT ya da Gpx ise H_2O_2 'i zararsız yan ürünlere dönüştürür. Bu yüzden hücrel hasarın şiddetinde önemli rol oynarlar.

Böbrek dokusundaki KAT enziminin elektroforetik analiz sonuçlarında tüm gruplarda tek bir bant ortaya çıktı (Bkz. Şekil 4.1). Grup I' e ait böbrek doku örneğinde bant alanı yüksek yoğunlukta iken Grup II' de bant alanı düşük yoğunlukta bulundu. Grup II deki bant alanının düşük bulunması, uzun süreli İ/R hasarı ile KAT antioksidan enzim aktivitesinin inhibasyonunun hızlanmış olabileceğini düşündürdü. Grup III ve

IV' de birbirine yakın bant alanları ölçüldü (Bkz. Şekil 4.4.). Grup III (50 mg/kg geraniol) ve Grup IV (100 mg/kg geraniol) kendi içinde karşılaştırıldığında 50 mg/kg geraniol verilen Grup III'ün, Grup IV'e göre bant alanı daha düşük görüldü. Bu da bize 50 mg/kg geraniol miktarının koruyucu özelliğinin yeterli olmadığını ve Grup IV'ün antioksidan savunma sistemine destek olduğunu ortaya koydu.

Böbrek dokusunda SOD izoenzimine bakıldığında üç izoformu görüldü (SOD1, SOD2 ve SOD3) (Bkz. Şekil 4.5). SOD1 bant alanının Grup I' de bant alanı yüksek bulunurken, Grup II bant alanı en düşük bulundu. Grup III ve IV' ün benzer bant alanı oluşturdıkları belirlendi. SOD2 açısından bant alanları değerlendirildiğinde Grup I' de en yüksek bant alanı, Grup II' de düşük bant alanı görüldü. Grup III ve IV' ün bant alanında Grup II'ye göre yükselme tespit edildi. SOD3 açısından bant alanları değerlendirildiğinde Grup I bant alanı, Grup II'den yüksek bulundu. Bunun yanında Grup IV 'de en yüksek bant alanı görüldü. (Şekil 4.5; Şekil 4.6). SOD izoenzimlerinin her birini kendi içerisinde değerlendirdikten sonra genel SOD aktivitesini incelediğimizde tüm izoenzimlerin Grup I' de bant alanları yüksek bulunurken, Grup II bant alanları tüm gruplardan düşük bulundu

Böbrek dokusunda Gpx enziminin; Gpx1, Gpx2, Gpx3 ve Gpx4 olmak üzere dört izoenzimi tespit edildi. Tüm gruplar içinde izoenzimler karşılaştırıldığında Grup II'nin bant alanı yüksek bulundu (Şekil 4.7.; Şekil 4.8). . Bu durum KAT ve SOD enzim aktivitesi sonuçları ile paralellik gösterdi.

Canlı dokularda bulunan KAT, SOD, Gpx çok önemli antioksidan savunma mekanizmalarıdır. KAT, H_2O_2 ' nin detoksifikasyonundan sorumlu iken SOD, O_2^- radikalini katalizler, aksi durumda biyolojik yapı ve membranları hasar görür. Gpx' de H_2O_2 ' yi su ve oksijene dönüştürür. Tüm bunlar hücrel hasarın şekillenmesinde önemli rol oynarlar. Bu enzimlerin aktivitesinin azalması yüksek reaktif serbest radikallerin toplanmasıyla ilgilidir. Bu enzimlerin azalması serbest radikallerinin artmasına neden olur. Sonuçta hücre membranlarının fonksiyonları ve bütünlüğü için antioksidan enzimler ile serbest radikaller belli bir denge içinde olmalıdır. Bunun yanı

sıra uzun süreli doku hasarları sonucunda serbest radikallarının artması ile gelişen biyokimyasal olaylarda antioksidan sistem yetersiz kalmaktadır. İskemik dokuda oksidanlara bağlı olarak SOD, KAT ve GPx gibi enzimlerin inaktivasyonunun hızlandığı ve buna bağlı olarak hücrelerin reperfüzyon sırasında hızla oluşan oksijen radikallerinin etkisine daha duyarlı hale geldiği rapor edilmektedir.(Aydoğdu ve ark., 2005)

Dobashi ve ark. (2000) sol böbrekte iskemi (30,60,90 dk) ve reperfüzyonunu (2, 24,72,120 saat) farklı sürelerde yaptıkları çalışmada; 60 dk iskemi 24 saat reperfüzyon uyguladıkları grupta, SOD, KAT, ve GPx aktivitelerinde anlamlı bir azalma ve lipid peroksidasyon düzeyinde artma olduğunu bildirmişlerdir.

Akkoç ve arkadaşlarının (2010) kalsiyum dobesilat uyguladıkları çalışmada; erkek wistar sıçanlarda renal İ/R (45 dk/24 saat) sonrası İ/R grubunda KAT, SOD ve GPx aktivitelerinde diğer gruplara göre önemli azalma kaydetmişlerdir.

Suyarı'ni (2006) yapmış olduğu çalışmada SOD düzeyini en yüksek kontrol grubunda bulmuştur. Hem İ/R hem de tedavi grubunda SOD aktivitesi anlamlı olarak düşüş göstermiştir. Bu durum İ/R hasarı'nın antioksidan enzim sistemi üzerinde önemli bir baskılayıcı rol oynadığını düşündürmektedir. Bu durumu Suyarı ve arkadaşlarıda I/R modellerinde kısa zamanlı SOD aktivitesinde artış olmadığı buna karşın uzun iskemi (60 veya 90 dakika) uygulanan I/R modellerinde anlamlı SOD artışı olduğunu gösteren çalışmalara bağlamıştır. Bu nedenle uygulanan iskemi süresi SOD aktivitesinin belirginleşmesinde önemli gibi görünmektedir.

Jayakumar ve arkadaşları (2006) yapmış oldukları çalışmalarında KAT, SOD ve Gpx izoformlarını native page elektroforezi ile değerlendirdiklerinde bu izoformların tedavi grubunda İ/R grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Bu sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda da iskemi sonrası antioksidan enzim aktivitesi önemli derecede azalma göstermiştir. Diğer yandan

İ/R sonucunda antioksidan enzimlerin yükseldiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalara bakıldığında İ/R sonrası artan enzim aktivitesinin oksidatif stresle ilişkilendirildiği vurgulanmaktadır.

Rasoulıan ve arkadaşları (2008), yaptıkları çalışmada erkek wistar sıçanlarda renal İ/R (40 dk/24 saat) sonrası İ/R grubunda KAT, SOD seviyelerinde önemli artma kaydetmişlerdir. Benzer bir çalışmada Kapan ve arkadaşları (2009), aortik İ/R sonrası iskemi grubunda SOD, KAT aktivitelerinde anlamlı derecede yükselme bulmuşlardır.

Yapılan çalışmalar arasındaki farklılıkların büyük olasılıkla metod, tür ve iskemi modellerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabileceğini söyleyebiliriz.

Bu izoenzim formları hücre metabolizmasının düzenli çalışmasında önemli rol oynar (Akkoç, 2010). Ancak oksidatif stres esnasında bu antioksidan enzim izofromlarının gen ekspresyonu ile ilgili çalışmalarının ortaya konması sonuçların farklılığının netleşmesinde oldukça önemlidir.

Yapılan histolojik incelemelerde (HE) kontrol grubu olan Grup I böbrek doku örneklerinde; korteks-medulla, böbrek tübül hücreleri ve glomerüller düzgün yapı göstermektedir. İ/R hasarı oluşturulmuş Grup II'ye ait böbrek örneklerinde ise vakuolizasyon, glomerül boşluğunda genişleme ve kanama, böbrek tübül hücre sıralarında bozulmalar gözlemlendi. 50 mg/kg geraniol verilen Grup III böbrek histolojik incelemelerinde ise genel görünüm normal olmakla birlikte glomerüler boşlukta ve tübüller arasında yer yer kanamalar gözlemlendi. Bu durum korunmanın yeterli olmadığını düşündürdü.

100 mg/kg geraniol verilen Grup IV böbrek doku örneklerinde ise glomerül boşluğunda genişlemenin ve epitel dökülmelerinin görülmemesi aynı zamanda kanamanın Grup II'ye göre gözle görülür düzeyde azalması oluşan hasara karşı olası koruyucu etkisini gösterir.

İ/R hasarının önlenmesinde SOR radikallerinin etkisini ortadan kaldıran bir ajan olarak Geraniol'ün kullanıldığına ilişkin herhangi bilimsel kayıta rastlanmamıştır. Yalnız son zamanlarda araştırmacılar antioksidan olarak uçucu yağlar ya da serbest radikal temizleyicilere odaklanmışlardır

Choi ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada 34 farklı narenciyede uçucu yağlar ve radikal süpürücüler üzerinde 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) kullanılarak bir standart ile antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada işaretlenmiş Geraniol 'ün DPPH'a karşı radikal süpürücü etkisi rapor edilmiştir.

Tiwari ve Kakkar 2008 yılında Wistar albino sıçanların alveolar makrofajları üzerinde yaptıkları çalışmada tsigniertiary-bütıl hidroperoksit kullanılarak Geraniol'ün anti-oksidan potansiyelini araştırmışlardır. Geraniol hücre canlılığını önemli ölçüde korumuş ve süperoksit dismutaz aktivitesinde % 45, glutatyon miktarında % 120 artış göstermiştir ve mitokondrial membran potansiyelini de onardığı gözlenmiştir. Aynı zamanda oksidatif strese maruz kalan hücre ile Geraniol verilen hücreler karşılaştırıldığında Geraniol'ün serbest NO salınımını azalttığı ve lipit peroksidasyonunu da engellediği görülmüştür. Bu sonuçlar oksidatif stres ile oluşturulmuş akciğer iltihabı hastalıklarında Geraniol'ün farmakolojik potansiyelinin kritik kontrol noktası olduğunu gösterdi.

Güneş, 2010 yılında yaptığı çalışmada; H₂O₂ vererek oksidatif stres oluşturmuş olduğu ratlarda geraniol ve geraniolden sentezlenmiş olan geraniol ksantat maddelerinin eser elementler üzerine etkilerini incelemiştir. Bu çalışmada Geraniol ve geraniol ksantat verilen dokularda genel olarak H₂O₂ ' in zararlı radikal etkisini azaltarak, eser elementler düzeyinde (Fe⁺², Ca⁺², Zn⁺² ve Mn⁺²) olumlu etkilerinin rol oynadığını bildirmişlerdir.

Geraniol'ün çeşitli kanser hücrelerine karşı *in vivo* ve *in vitro* antitümör etkinliği ni gösteren çalışmalar da vardır. Monoterpenlerin deneysel koşullarda doğrudan ve dolaylı kullanılarak antikanserojen etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Güneş, 2010).

Çeşitli çalışmalar da İ/R hasarı sonucu oluşan oksidatif strese karşı farklı antioksidanların etkili olduğunu göstermiştir (Canbek et al., 2008; Senturk, et al., 2008; Baykara et al., 2009). Aynı şekilde benzer çalışmalar yapılarak diğer monoterpen türevli maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri araştırılabilir. Ayrıca Geraniol'ün İ/R hasarı ile oluşturulan oksidatif stres üzerine uygun yollar çalışarak serbest radikalleri azaltma etkisi araştırılabilir.

Sonuç olarak biyokimyasal ve histolojik analiz verileri göz önüne alındığında, böbrek İ/R hasarından önce geraniolün 100 mg/kg intraperitoneal dozunun koruyucu etkili olduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adalı, M., 1998, Hipertiroidli hastalarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan duruma propitiourasil, propanol ve vitamin E'nin etkisi, Osmangazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B. Dalı, Uzmanlık. Tezi, 105 s.
- Ağgöl, A.G., 2012, Diyabetli ratlarda zeytin yaprağı ekstresinin etkilerinin incelenmesi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 136 s.
- Akino, K., Akita, S., Mizuguchi, T., Takumi, I., Yu, R., Wang, X., Rozga, J., Demetriou, A.A., Melmed, S., Ohtsuru, A., and Yamashita, S., 2005, A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration, The Journal of Surgical Research, 129, 142-146 p.
- Akkoç, A., 2010, Ratlarda böbrek iskemi reperfüzyon hasarında Proflaktik Kalsiyum Dobesilatın etkinliği, Uzmanlık Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, İzzet Baysal Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, 84s.
- Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Konya, Mimoza Yayınları, 156 s.
- Aksoy, A., 2007, Alkolik sıçan karaciğeri üzerine karvakrolün etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 107 s.
- Aktay, G., Deliorman, D., Ergun, E., Ergun, F., Yeşilada, E. And Çevik C., 2000, Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury, Journal of Ethnopharmacology 73, 121-129 p.
- Aktoz, T., 2004, Sıçanlarda Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarına Melatonin ve E vitamininin Antioksidan Etkisi İle Hücrel Değişiklikler, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı, 78 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Aliyev, E., 2005, Atrisorb uygulanmış ve Radikal Süpürücü Enzimler(Süperoksiddismutas (SOD) ve Katalaz (KAT)) verilmesi köpeklerin dişeti dokularında radikal süpürücü enzimler (Süperoksiddidmutas (SOD) ve Katalaz (KAT)) aktivitelerinin zamana göre değişimi, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 120 s.
- Altıntaş, A., Bilgili, A., 1992, Melez köpeklerde kan ve idrarda Üre, Kreatinin, Na ve K normal düzeyleri ile yaş, cinsiyet ve ağırlığın etkisi, 100.Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 3, 1-2.
- Anafarta, K.; Göğüş, O.; Bedük, Y. ve Arıkan, N., 2008, Temel Üroloji, Güneş Kitabevi, 826 s.
- Arslan, K.,2012, Alt ekstremitenin deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde geliş reperfüzyona bağlı böbrek hasarına Papaverin ve Vitamin C (Askorbik Asit)'nin etkilerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 69s.
- Assy, N., Gong, Y., Zhang, M., Pettigrew, N.M., Pashniak, D. And Minuk, G.Y., 1998, Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats, J Lab Clin Med, 131, 251-256 s.
- Aydoğdu, N., Kaymak, K., & Yalçın, Ö., 2005, Sıçanlarda böbrek iskemi reperfüzyon hasarında N-Asetilsisteinin etkileri, Fırat Tıp Dergisi, 10(4) 151-155 s.
- Baykara, B., 2006, Karaciğer iskemi reprfüzyon hasarında karnozin ve melatoninin koruyucu etkileri, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilmi Dalı, 68 s.
- Baykara, B., Tekmen, I., Pekçetin, C., Ulukuş, C., Tuncel, P., Sağol, O., Ormen M. and Özoğul, C., 2009, The protective effect of carnosine and melatonin in ischemia-reperfusion injury in the rat liver, Acta histochemica , 111, 42-51 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Basım, S., 2005, Alt ekstremitelerde iskemi-reperfüzyon oluşturulan ratlarda *Ginkgo biloba* EGB 761'in barsak anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi, Uzmanlık Tezi, T.C.Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, 50s.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analysis Biochemistry*, 44: 276-87.
- Berne, RM, Levy, M.N., Koeppen, B.M., and Stanton, B.A., 2008, Fizyoloji,(Çev. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği K. Kaymak),Güneş Tıp Kitabevi, 1014 s.
- Biçim, G., 2013, Oksidatif stres ve antioksidan kapasite ile ilişkili gen polimorfizmlerinin değişik yöntemlerle belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, 105s.
- Canbek, M., Uyanoglu, M., Bayramoglu, G., Senturk, H., Erkasap, N., Koken, T., Uslu S., Demirüstü C., Aral E. and Hüsnü Can Baser K., 2008, Effects of carvacrol on defects of ischemi-reperfusion in the rat liver, *Photomedicine* , 15, 447-452
- Cebeci, O. Ö., 2007, Ratlarda böbrek iskemi-reperfüzyon hasarının erken döneminde sildenafil sitratin etkinliği, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, 51 s.
- Chen, W. and Viljoen, A.M., 2010, Geraniol — A review of a commercially important fragrance material, *South African Journal of Botany* 76(4), 643-651 p.
- Chen, Y.W., Li, C.H., Zhang, A.Q., Yang, S.Z., Zang, W.Z. and Dong, J.H., 2011, Preserving hepatic artery flow during portal triad blood inflow occlusion reduces liver ischemia-reperfusion injury in rats, *Journal of Surgical Research*, 1-7p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Choi, H.S., Song, H.S., Ukeda H. and Sawamura M., 2000, Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1- -diphenyl-2picrylhydrazyl, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48(9), 4156-4161.
- Çabuk, M., Alçiçek, A., Bozkurt, M. ve İmre, N. 2003. Aromatik bitkilerden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal özellikleri ve alternatif yem katkı maddesi olarak kullanım imkanı, *Yem Magazini*, 35: 39–41 s.
- Çakır, M., 2012, Sıçanlarda böbrek iskemi reperfüzyonu ile oluşturulan oksidatif hasara karşı deksmedetomidin etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Entitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, 70 s.
- Çavdar, C., Sifil, A., & Çamsarı, T, 1997,. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Trasplantasyon Dergisi*, 3-4:92-95 s.
- Deisseroth, A. and Dounce, A.L., 1970, catalase Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role *Physiology Review* 50,319-375p.
- Demir, S. and Inal-Erden M., 1998, Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury, *Clinica Chimica Acta* 275(2) 127-135
- Demirkıran, H., 2011, Ratlarda Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarına Ketaminin Farklı Dozlarının Etkileri, Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı, 64 s.
- Dobashi K., Ghosh B., Orak J. K., Singh I. and Singh A. K., 2000, Kidney ischemia–reperfusion:modulation of antioxidant defences, *Moluculer Cell Biochemtry.*, 205; 1-11.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Duman, C. and Erden, B.F., 2004, Birinci basamak sağlık hizmetlerine yönelik biyokimyasal laboratuvar verilerinin kısa yorumu, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Farmakoloji Anabilim Dalı, cilt 13, sayı 7, 256 s.
- Durmuş, A.S. and Ünsaldı, E., 2005, Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve kırık iyileşmesi, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 8 s.
- Dündar, Y. and Aslan, R., 2000, Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, No:29.
- Eken, A., 2012, Rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD., journal of Clinical and Analytical Medicine, 5s.
- Ergün, O., 1998, Böbreğin iskemi reperfüzyonunu önleyici bir ajan olarak Karnitin'in etkisi, Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, 56s.
- Ergün, Y., 2006, Çizgili kas iskemi-reperfüzyon hasarı ve nitrik oksit ile ilişkisi, 15,133s.
- Gasanov, F., 2010, Sıçanlarda Renal İskemi Reperfüzyon Hasarının Azaltılmasında Fosfodiesteraz Tip 5'in (Tadalafil) Rolü, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, 95 s.
- Gonullu, E., Ozkardeşler, S., Kume, T., Duru, L.S., Akan, M., Guneli, M.E., Ergur, B.U., Meseri, R. and Dora, O., 2013, Comparison of the effects of dexmedetomidine administered attwo different times on renal ischemia/reperfusion injury in rats, Article in Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Göktepe, M., 2012, Quercetin uygulamasının egzersiz, serbest radikal ve antioksidan enzim düzeyleri üzerine etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beden Eğitimi ve Spor Anabilim Dalı, 117s.
- Günaydın, B. and Çelebi, H., 2003, Genel anesteziğin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkileri, Anestezi Dergisi , 11 (2):87-98.
- Güneş, M., 2010 Oksidatif strese maruz kalan ratlarda geraniol ve geraniol ksantat maddelerinin bazı metaller üzerine etkileri. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 102 s.
- Haklar, G., 1994. Kronik böbrek hastalarında oksidan etkinin değişik yöntemlerle ölçülmesi.Marmara Üniversitesi Tıp.Fak.Biokimya A.B.D.,Uzmanlık Tezi, 70s.
- Iijima Y, Davidovich-Rikanati R, Fridman E, Gang DR, Bar E, et al. (2004) The Biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of Basil. Plant Physiol 136: 3724-3736.
- Işık, F.E., 2005, Edirne Bölgesinde Yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *Microcephalum* Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, 133s.
- İnceoğlu, İ., 2008, 2-(3-İyodobütoksi) -3- Metilsikloheks-2-Enon'un sentezi ve serbest radikal reaksiyonlarının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 79s.
- İşcan, Ş., 2012, Alt ekstremitelerde deneysel iskemi/reperfüzyon modelinde gelişen reperfüzyona bağlı akciğer hasarına İloprost'un etkilerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 56s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Jayakumar, T., Ramesh, E., Geraldine, P., 2006, Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 44:1989-96.
- Jayakumar, T., Thomas, P. A., & Geraldine, P., 2007, Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats, *Experimental Gerontology*, 42, 183-191.
- Kadayıfçı, A., 2009, Uzmanlar TUS serisi, Dahiliye, Atlas Kitapçılık, 225-275, 620s.
- Kandilci, H. B. ve Gümüşel, B., 2005, Akciğerlerde iskemi-reperfüzyon hasarı ve iskemik önkoşullama, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 25, 35-49 s.
- Karabelyos, C., Dobozy, O., Szalai, C., Klenjanszki, K., Varju, K., Hadhazy, A., Kiss, A., Fulop, K. A., Madarasz, B., Falus, A., 1999, Elevated Hepatic Glucocorticoid Receptor Expression During Liver Regeneration in Rats, *Cell- and Immunobiology Nagyvarad*, 5, 107-9.
- Karabiga, M., Kiriş, İ., Yılmaz, N., Altuntaş, İ., Karahan, N., Okutan, H., 2007, Aprotinin deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde böbrek hasarına etkisi, 16, 9-18.
- Kapan, Ş., Kiriş, İ., Kılbaş, A., Altuntaş, İ., Karahan, N., Okutan, H., 2009, Eritropoietinin sıçan aortik iskemi reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi, *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg.*, 17; 110-116
- Kaya, Y., Aral, E., Coşkun, T., Erkasap, N., Var, A., 2002, Increased intraabdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *Journal of Surgical Research*, 108, 250-257.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Koca, N. ve Karadeniz, F., 2003, Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları Ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri, Gıda Mühendisliği Dergisi, 32-37.
- Koçoğlu H, Öztürk H, Öztürk H, Yılmaz F ve ark. Effect of Deksmetomidine on ischemia-reperfusion injury in rat kidney a histopathologic study. Ren Fail 2009; 31: 70-74.
- Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L., 2003, Basic Pathology (Temel Patoloji), 7. Edisyon, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic V., Milos, M., 2003, Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil Analytical, Nutritional and Clinical Methods, Food Chemistry, 85, 633–640
- Lapczynski, A., Bhatia, S.P., Foxenberg, R.J., Letizia, C.S., Api, A.M., 2008, Fragrance material review on geraniol. Food and Chemical Toxicology 46. 160–S170.
- Lin, HC., Chen, HJ., Hou, WC., 2002, Activity staining ag glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dedocylsulfate polyacrylomide gels, Electrophoresis, 23: 513-16.
- McCord, JM., 1985, Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl JMed; 312(3):159-63. Epub /01/17.
- Montalvo-Jave, E.E., 2008, Factors in the pahophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury, Journal of Surgical Research , 147, 153-159
- Nur, İ.H. and Yoldaş, A., 2011, Bir Wistar Rat'da A.renalis'in değişik dallanması, Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 8(3) 211-216.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Onat, T., Emerk, K., & Sözmen, E., 2006, İnsan Biyokimyası Palme Yayıncılık,. 45 s.
- Özkaya, A., Çelik, S., Yüce, A., Şahin, Z. And Yılmaz, Ö., 2010 The Effects of Ellagic Acid on Some Biochemical Parameters in the Liver of Rats Against Oxidative Stress Induced by Aluminum. Reseach Article, 16 (2): 823-...,
- Paller, M. S., 1984, Hoidal JR, Ferris TF: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. J Clin Invest; 74(4): 1156-1164
- Parks, D.A., Williams, T.K., Beckman, J.S., 1988, Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a revaluation. Am J Physiology, 254 768-74.
- Peker, K.B., 2011, Ketamin ve Lidokain'in iskemi reperfüzyon hasarını önlemedeki etkileri, Uzmanlık Tezi, Meram Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı, 61 s.
- Rasoulia, B., Jafari M., Noroozzadeh, A., Mehrani H., Wahhap-Aghai H., Hashemi-Madani, S. M. H., Ghani, E., Esmaili, M., Asgari, A. and Khoshbaten, A., 2008, Effects of Ischemia-Reperfusion on Rat Renal Tissue Antioxidant Systems and Lipid Peroxidation, Acta Medica Iranica; 46(5): 353-360.
- Sakon, M., Ariyoshi, H., Umeshita, K., Monden, M., 2002, _schemia-reperfusion injury of the liver with special reference to calcium-depended mechanism, Surgery Today,32, 1-12.
- Sanz, N., Fernandez, C.D., Simon, L.F., Alvarez, A., Cascales, M., 1998, Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide, Biochimica et Biophysica Acta, 1384, 66-78, p.
- Senturk, H., Kabay, S., Bayramoglu, G., Ozden, H., Yaylak, F., Yucel, M., Gürlek Olgun E., Kutlu, A., 2008, Silymarin attenuates the renal ischemia / reperfusion injury-induced morphological changes in the rat liver, World J Urol , 26(4):401-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Sharp, P.E and La Regina, M.C., 1998, The Laboratory Rat, CRC Press, 204 p.
- Siemionow, M. and Arslan, E., 2004., Ischemia/ Reperfusion Injury: A Review In Relation To Free Tissue Transfers. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). 10.1002/micr.20060.
- Sroka, Z., Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, Food and Chemical Toxicology, 41; 753-758.
- Stangl, R., Szijarto, A., Onody, P., Tamas, J., Tatrai, M., Hegedus, V., Blazovics, A., Lotz, G., Kiss, A., Modis, K.Gero, D.,Szabo, C.,Kupcsulik, P. and Harsanyi, L., 2009, Reduction of liver ischemia-reperfusion injury via glutamine pretreatment, Journal of Surgical Research , 1-9.
- Suyarı, E., 2006 Deneysel böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında Everolimus'un oksidan-antioksidan sistemi ve renal histoloji üzerine etkileri, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 76 s.
- Svoboda, K.P., Hampson, J., Hunter, E.A. 1998, Production and bioactivity of essential oils in secretory tissues of higher plants. Proceedings of The World of Aromatherapy II Conference of the National Association for Holistic Aromatherapy (NAHA), 25 – 28 September, St. Louis, Missouri, USA, 105 – 127.
- Şahin, F., 2011, Pioglitazon'un böbrek iskemi reperfüzyonu üzerine olan koruyucu etkisinin incelenmesi, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, 49 s.
- Şahsıvar, O.,2007, Renal arterde oluşturulan iskemi/reperfüzyon sonrası böbrekte gelişen fonksiyon bozukluğuna iloprostun etkisi, Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 79 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Şener, G., Yeğen B.Ç., 2009, İskemi reperfüzyon hasarı. Klinik Gelişim; 22 (3): 5-13.
- Şentürk, H., 2008, Renal iskemi reperfüzyon sırasında sıçan böbreğinde oluşan oksidatif stres hasarına silimarin ve likopen etkisi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı, 93 s.
- Şıktar, E., 2008, Farklı oda sıcaklıklarında uzun süre egzersiz yaptırılan ratlarda Melatonin ve ısı stresinin serbest radikal ve antioksidan düzeylerine etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beden Eğitimi Ve Spor Anabilim Dalı, 114s.
- Takechi, H., Miyazawa, M., 2005, Biotransformation of Geraniol by the Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*), Journal of Olea Science, 3, 143-149, p.
- Tanagho, E.A., McAninch, J.W., 2009, Genel Üroloji, Nobel Tıp Kitabevi, 756 s.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevi.
- Thiemermann, C., Patel, S.A., Kvale, E.O., Cockerill, G.W., Brown, A.J., Stewart, K.N., Cuzzocrea, S., Britti, D., Mota-Filipe, H., Chatterjee, P.K., 2003, High Density Lipoprotein (HDL) reduces renal ischemia/reperfusion injury, J. Am. Soc. Nephrol., 14, 1833–1843.
- Theocharis, S.E., Margeli, A.P., Skaltsas, S.D., Spiliopoulou, C.A., Koutselinis S., 2001, Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study, Toxicology 161, 129-138, p.
- Tiwari, M., Kakkar, P., 2009, Plant derived antioxidants – Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stres. Toxicology in Vitro, 23; 29

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Tufan, A.N.,2012, Tahıllarda Spektrofotometrik Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Ve Antioksidan Bileşenlerin Kapiler Elektroforezle Saptanması, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, 107s.
- Tümay, A.,2010, Retinitis Pigmentosa’da Serbest Radikallerin Rolü, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 131s.
- Umay, A.,2007, *Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 55s.
- Ünal, T., 2012, Diş Hekimliği Öğrencileri İçin Temel Patoloji,Bölüm II, Hücre Zedelenmesi Adaptasyon Ve Ölüm, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 35s.
- Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, et al., 2002. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. Circulation; 105: 1332-6
- Waynforth, H.B., Flecknell, P.A., 1994, Experimental and surgical technique in the rat, Chapter, 29,174-175.
- Watanabe, M., Yamaguchi, K., Chijiwa, K., & Tonaka, M., 2001, Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion, Journal of Surgical Research , 101, 146-151.
- Williams P, Lopez H, Britt D, Chan C and ark., 1997, Characterization of renal ischemiareperfusion injury in rats. J Pharmacol Toxicol Methods; 37: 1-7.
- Wiseman,DA, S R Werner, P L Crowell, 2007, Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21 Cip1 and p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics320(3), 1163-1170

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahman, M.A., 1971, An improved procedure using ferricyanide for detecting KATalse isozymes, Anal. Biochem., 44:301-5.

Yanarateş, O., Güven, A., Sizlan, A., Uysal, B., Akgul, O., Atim, A., Özcan, A., Korkmaz, A. Kurt, E., 2008, Ameliorative Effects of Proanthocyanidin on Renal Ischemia/Reperfusion Injury. Renal Failure, Vol. 30, No. 9: Pages 931-938.

Yavaşer, R., 2011, Doğal Ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerinin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 124s.

Yaylak, F., Canbaz, H., Caglikuleci, M., Dirlik, M., Tamer, L., Ogetman, Z., Polay, Y., 2008, Liver tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and lipid peroxidation in experimental hepatic ischemia reperfusion injury stimulated with lipopolysaccharide: the role of amino guanidine, Journal of Surgical Research, 148, 213-214.

Yüzer, H., 2008, Ketamin, Tiopental, Proforol, Etomidat Ve, İntralipid' in Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarına Etkileri, Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı.

Zamocky, M., and Koller, F., Progress in Biophys.Mol. Biol., 72, 19-66 (1999).

Zapletal, C., Heyne, S., Breitreutz, R., Gebhard, M.-M. and Golling, M., 2008, The influence of selenium substitution on microcirculation and glutathione metabolism after warm liver ischemia/reperfusion in a rat model, Microvascular Research, 76, 104-109.

Zimmerman, B.J. and Granger DN., 1992, Reperfusion injury. Surg Clin North Am; 72: 65-83.

<http://hastaneciyiz.files.wordpress.com/2011/01>

http://www.populerbilgi.com/genel/res_insan/144-2

7. EKLER

7.1 Ek1: Etik Kurul Raporu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 27. 03. 2013
TOPLANTI SAYISI	: 56
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 326
KARAR NUMARASI	: 326
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Mediha CANBEK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Yüksek Lisans Öğrencisi Senanur CAN Arş. Gör. Dr. Hakan ŞENTÜRK
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Wistar albino (erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Mediha CANBEK**'in araştırma yürütücüsü olduğu 326/2013 kayıt numaralı ve “**Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol ‘ün Koruyucu Etkisi**” konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmani DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Mediha CANBEK**'in araştırma yürütücüsü olduğu 326/2013 kayıt numaralı ve “**Sıçanlarda Uzun Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniol ‘ün Koruyucu Etkisi**” konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Çalışmada Wistar albino erkek sıçanlar arasından rastgele seçimle her birinde n=7’şer sıçan olmak üzere toplam 4 grupta 28 adet sıçan kullanılacaktır. Bu gruplar;

Grup 1 (Sham): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmenin ardından her hayvanın batin kısmı açılıp iskemi işlemi yapılır gibi yapılacak ve diseksiyonları gerçekleştirilecektir.

Grup 2 (Hasta kontrol): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanarak 15 gün iyileşmenin olması beklenecektir. İskemi işlemi gerçekleştirilmeden 1 saat önce serum fizyolojik intraperitoneal olarak verilerek 60 dakikalık iskeminin ardından 24 saat reperfüzyon uygulanacaktır. Reperfüzyonun bitiminde anestezi altında diseksiyon gerçekleştirilecektir.

Grup 3 (İ/R+ 50 mg/kg tedavi grubu): Bu grup deney hayvanlarına nefrektami işlemi uygulanacak ve nefrektami işleminin ardından 15 gün boyunca iyileşmenin olması beklenecektir. 15 gün iyileşme periyodunun ardından; 50 mg/kg geraniol, iskemi işleminden 1 saat önce deney hayvanlarına intraperitoneal olarak verilecektir. Daha sonra 60 dakikalık iskeminin ardından 24 saat reperfüzyon işlemi uygulanacaktır. Reperfüzyonun bitiminde anestezi altında diseksiyon gerçekleştirilecektir.

Grup 4 (İ/R+ 100 mg/kg tedavi grubu): Bu grup deney hayvanlarına nefrektami işlemi uygulanacak ve nefrektami işleminin ardından 15 gün boyunca iyileşmenin olması beklenecektir. 15 gün iyileşme periyodunun ardından; 100 mg/kg geraniol, iskemi işleminden 1 saat önce deney hayvanlarına intraperitoneal olarak verilecektir. Daha sonra 60 dakikalık iskeminin ardından 24 saat reperfüzyon işlemi uygulanacaktır. Reperfüzyonun bitiminde anestezi altında diseksiyon gerçekleştirilecektir.

Geraniolün Uygulaması

Uygulanacak dozlar maddelerin güvenlik belgelerinde belirtilen oral LD50 limitleri kapsamında düzenlenecektir (Lapczynski et al; 2008). Deney hayvanlarına iskemi işleminden 1 saat önce cam enjektörle intraperitoneal olarak verilecektir.

Cerrahi İşlemler

İskemi/reperfüzyon yapılacak deney hayvanlarına intramüsküler olarak 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi uygulanacaktır. Her bir deney hayvanı, ılık ve sabit sıcaklıkta olan diseksiyon tablasına sırt üstü pozisyonda tespit edilip, rektal ısı kontrolü yapılacaktır (Stangl, et al., 2009). Cerrahi uygulama bölgesinin temizliği %70’lik etil alkol ile sağlanıp steril şartlar altında sağ böbrek nefrektomisi gerçekleştirilecektir. Her bir sıçana yapılan nefrektomiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için karın boşluğuna steril SF verilecektir. Kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kesi bölgesi kapatılacaktır. Cerrahi işlem görmüş her bir hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli şeffaf kafeslere ayrı ayrı koyularak 15 gün iyileşmesi sağlanacaktır.

İskemi reperfüzyon yapılacak sıçanlara ketalar Rompun anestezisi altında midline laparotomi yapılacaktır. Sol renal arter izole edilerek, antitravmatik vasküler klemp yardımıyla 60 dakika süre ile kan akışı durdurulacaktır. 60 dakika iskeminin hemen ardından 24 saat reperfüzyon uygulanacaktır.

Reperfüzyon süresince kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için karın boşluğuna steril SF verilecektir. Bu işlemin ardından kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kesi bölgesi kapatılacaktır.

Böbrek iskemî-reperfüzyonunda sitotoksitenin aydınlatılması için deney gruplarımızdaki sıçanlardan anestezi altında uygun teknikler kullanılarak kalpten kan ve böbrek doku örnekleri alınacaktır. Biyokimyasal çalışmalar için alınan kan örneklerinin MSE Mistral 2000 marka cihaz ile 10 dk 3000 rpm devirde santrifüjlenerek serumları elde edilip Ependorf tüplere aktarılan serum örnekleri analiz süresine kadar -80 0C derin dondurucuda korunacaktır. Alınan kan örneklerinin serumlarında üre ve kreatinin değerleri Crony Airone 200 RA Otoanalizatör ile ticari kit (Biolabo, FRANCE) kullanılarak belirlenecektir.

Histolojik çalışmalar için alınan böbrek doku örnekleri; 1., 2., 3., ve 4. gruplarda diseksiyondan hemen sonra sol böbrek alınıp üç kısma ayrılarak orta kısım histolojik analizler için %10' luk nötralfomaldehit fiksasyon sıvısına uygun şekilde konulabilmesi için doku kasetine, diğer kısımlar ise biyokimyasal analizler için polietilen tüplerde -80C' derin dondurucuya koyulacaktır.

Deney hayvanlarının diseksiyonu sırasında histolojik incelemeler için alınan orta kısım böbrek dokularının her biri doku takip kaseti içerisinde %10 tamponlanmış nötralfomaldehit solüsyonunda 24 saat süre ile bekletilecektir. Kimyasal fiksasyonu tamamlanan dokular rutin etil alkol serisinde yapılacak olan takipten sonra parafine gömülecektir. Parafin içine gömülerek bloklar haline getirilen doku örneklerinden mikrotom yardımı ile 4-6µm kalınlığında kesitler alınacaktır. Alınan kesitler hematoksilin eosin (H&E) boyama metodu kullanılarak boyanacak ve preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilecektir. H&E boyanmış böbrek kesitlerinde ışık mikroskobu düzeyinde histopatolojik incelemeleri yapılacaktır.

Diğer kalan dokular böbrek I/R sitotoksitesini aydınlatmak için elektroforez analizinde kullanılmak üzere +4 °C de çözülerek; doku örneklerinde homojenizasyon yapıldıktan sonra SOD, CAT ve Gpx enzim aktivitelerine bakılacaktır.

Böbrek dokularının homojenizasyonu için; -80 0C'den çıkarılan böbrek dokusundan küçük bir parça alınarak hassas terazide tartılıp PO4 çözeltisi içinde homojenize edilecektir. Homojenatlar +4 0C 5000 G'de 1 saat santrifüj (Ependorff Centrifuge marka ve 5804 R model) edilip süpernatant kısmı elektroforez için ayrılacaktır. Böbrek doku örneği homojenatlarında Doğal (Native) Jel Elektroforez tekniğiyle Scie-Plas marka mini vertical Electrofophoresis ünitesi kullanılarak SOD, CAT ve Gpx izoenzimlerinin jelde yürümesi sağlanıp substrat ile tepkimelerine göre aktivitesi belirlenecektir (Jayakumar, et al., 2007). Doğal Jel Elektroforezi kullanılarak aktiviteleri belirlenecek olan SOD, CAT ve Gpx izoenzimlerinin total protein miktarları belirlenecektir.

Nefrektomiden sonra analjezik verilmeli. 24 saat reperfüzyon anestezi altında olmayacak gibi görünüyor. Analjezik verilmelidir.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.