



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
ALIÇ (CRATAEGUS) VE GOJİ BERRY (LYCIUM
BARBARUM)'NİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SAFİYE ŞEYMA TANER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2016

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
ALIÇ (CRATAEGUS) VE GOJİ BERRY (LYCIUM
BARBARUM)'NİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**SAFİYE ŞEYMA TANER
YÜKSEK LİSANS**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ**

**Jüri Üyesi
Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN**

**Jüri Üyesi
Doç. Dr. Ali Erdiñç YALIN**

KAHRAMANMARAŞ 2016

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Safiye Şeyma TANER tarafından hazırlanan “Renal iskemi reperfüzyon hasarında Alıç (crataegus) ve Goji berry (lycium barbarum)’nin koruyucu etkilerinin araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 28/06/2016 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr Ergül BELGE KURUTAŞ

Tıbbi Biyokimya A.B.D, K.S.Ü Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

Tıbbi Biyokimya A.B.D, K.S.Ü Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Ali Erdinç YALIN

Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D MERSİN Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç.Dr. MEHMET BOŞNAK

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Safiye Şeyma TANER

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2014/1-9 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğitimim süresi boyunca her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini aldığım ve fikirlerinden faydalandığım saygı değer hocam Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'a

Eğitimim sırasında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam Prof. Dr. Metin KILINÇ ve Öğretim üyeleri hocalarım Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN ve Doç. Dr. Ahmet ÇELİK 'e,

Tez çalışmamda çok değerli katkıları olan, Prof. Dr. Figen DORAN ve Doç. Dr. Fatih YÜZBAŞIOĞLU hocalarımıza Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma laboratuvarı personelimiz Abdullah YILMAZ'a,

Her zaman maddi manevi yanımda olan saygı değer babama, sevgili anneme, aileme, arkadaşım Meliha KARAGENÇ 'e ve her türlü desteğini üzerimden hiç bir zaman eksik etmeyen çok değerli müstakbel eşim Erhan ÖZCÜ 'ye en içten teşekkürü bir borç bilirim.

Bu araştırma, 2014/1-9 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Haziran-2016

Safiye Şeyma TANER

**RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA ALIÇ (CRATAEGUS) VE
GOJİ BERRY (LYCIUM BARBARUM)'NİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Safiye Şeyma TANER

ÖZET

Renal iskemi-reperfüzyon hasarı (I/R) yoğun bakım ünitelerinde, böbrek nakli, kardiyovasküler ve ürolojik cerrahilerde sık karşılaşılan bir durumdur. Akut böbrek yetmezliği (ABY) özellikle hastanede yatan hastalarda sık karşılaşılan bir durumdur. Son 50 yılda sağlık alınındaki gelişmelere rağmen ABY'ye bağlı mortalite ve morbidite oranlarında azalma görülmemiştir. ABY'nin en sık nedeni akut tübüler nekrozdur ve altta yatan etyoloji renal iskemi ve/veya renal hipoperfüzyondur.

Biz de ilk kez yapılan çalışmamızda böbrek I/R hasarında Goji berry ve Alıç 'ın koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda Wistar Albino türü 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar sham, kontrol, Alıç, Goji berry ve Alıç+Goji berry (kombine grup) olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Sham grubundaki sıçanlara sadece laparotomi yapıldı ve 120 dk beklendi, kontrol grubuna (I/R) 60 dk iskemi sonrası 60 dk reperfüzyon uygulandı. Alıç, Goji berry ve kombine gruplara ise I/R dan 10 gün önce ekstreler oral gavaj yöntemiyle 200 mg/kg/gün olarak verildi ve 60 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyon gerçekleştirildi. Reperfüzyon sonrasında genel anestezi altında sıçanlar sakrifiye edildi ve böbrek dokuları çıkarıldı. Doku örneklerinde oksidatif stresin indikatörü olarak malondialdehit (MDA) düzeyleri ve enzimatik antioksidan savunma sistemlerinden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Böbrek doku örneklerinde histopatolojik incelemeler yapılarak histopatolojik skorlama elde edildi.

I/R grubunda; SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin anlamlı olarak azaldığı ($p<0,05$), buna karşın MDA düzeylerinin arttığı ($p<0,05$) görüldü. I/R grubunun böbrek dokularının histopatolojik incelenmesinde ise nekroz ve kast bulgularında artma izlendi.

Goji Bery, Alıç ve kombine grupta, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin anlamlı olarak arttığı ($p<0,05$), buna karşın MDA düzeylerinin azaldığı ($p<0,05$)

görüldü. Böbreklerin histopatolojik incelenmesinde nekroz ve kast bulgularında azalma tespit edildi.

Sonuç olarak, böbrek İ/R hasarında oksidatif stresin önemli rol oynadığı ve bu hasara karşı Goji Bery ve Alıç verilmesinin koruyucu rol oynadığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon, sıçan, alıç, goji berry, malondialdehit, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz.

Sayfa Adedi: 98

Danışman: Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ



**INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF CRATAEGUS
(HAWTHORN), AND LYCIUM BARBARUM (GOJI BERRY) IN RENAL
ISCHEMIA REPERFUSION INJURY**

Master Thesis

Safiye Seyma TANER

ABSTRACT

Renal ischemia-reperfusion injury (I/R) is commonly seen in intensive care units, renal transplantation, cardiovascular and urologic surgeries. Acute renal failure (ARF), is also a common condition especially in hospitalized patients. During the last 50 years, despite developments in the field of health mortality and morbidity rates were not decreased as expected. The most common cause of ARF is acute tubular necrosis and underlying etiology is renal ischemia and/or renal hypoperfusion.

The aim of our study was to investigate the protective effects of goji berry and hawthorn. A total of 40 male Wistar Albino rats were used in our study. The rats are divided into five groups as sham, control, Hawthorn, Goji Berry and combined groups. Sham group was subjected to laparotomy, and 120 min was waited, control group is subjected to 60 min. Reperfusion after 60 minutes of ischemia, and also Hawthorn, Goji Berry and combined groups are given extracts by gavage 200 mg/kg/day doses and are carried out 60 minutes ischemia, after 60 minutes reperfusion. Rats were sacrificed under general anesthesia after reperfusion, and then kidney tissues were removed. Malondialdehyde (MDA) levels as an indicator of oxidative stress and enzymatic antioxidant defense systems such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) activities in tissue samples were measured by spectrophotometric. Histopathological scoring was obtained through histopathological examination that was performed in kidney tissue samples.

In I/R group; While SOD, CAT and GSH-Px activity decreased significantly ($p < 0.05$), MDA levels increased ($p < 0.05$). Furthermore, the histopathologic examination of kidney tissue was observed as increased necrosis and caste findings in I/R group. In Goji berry, hawthorn and the combined groups; SOD, CAT and GSH-Px activities increased significantly ($p < 0.05$). However, MDA levels decreased in these groups.

Also, decreased necrosis and caste findings were detected in the histological examination of the kidneys.

As a result, oxidative stress play an important role in renal I/R injury, and it was showed that goji berry and hawthorn application may play a protective role against to this damage.

Key words: Ischemia-reperfusion, rats, hawthorn, goji berry, malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.

Page Number: 98

Supervisor: Prof. Dr. Ergul BELGE KURUTAŞ



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ AMAÇ.....	1
1.1. İskemi/ Reperfüzyon.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Böbreğin Yapısı ve Fonksiyonları.....	3
2.1.1. Böbreğin temel fonksiyonları.....	6
2.2. Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	6
2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı.....	8
2.3.1. İskemi reperfüzyon hasarının mekanizması.....	8
2.3.2. Endotel hücresinin rolü.....	11
2.3.3. Nötrofillerin rolü.....	12
2.4. Serbest Radikaller.....	14
2.4.1. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri.....	16
2.4.1.1. Reaktif oksijen türleri.....	16
2.4.2. Serbest radikallerin üretimi.....	21
2.4.3. Endojen serbest radikal oluşum mekanizmaları.....	22
2.4.4. Eksojen serbest radikal oluşum mekanizması.....	25
2.4.5. Serbest Radikallerin Etkileri.....	26
2.4.5.1. Hücre İçi Etkileri.....	26
2.4.5.1.1. Lipit Peroksidasyonu.....	26
2.4.5.1.2. Nükleik asitler üzerine etkileri.....	27
2.4.5.1.3. Karbonhidratlara etkileri.....	28
2.4.5.1.4. Proteinlere etkileri.....	28
2.4.5.2. Hücre Dışı Etkiler.....	28

2.4.5.2.1. Kemotaksi	28
2.4.5.2.2. Rolling.....	29
2.4.5.2.3. Antiadhezyon molekülleri inhibisyonu.....	29
2.5. Antioksidanlar	30
2.5.1. Antioksidan savunma sistemleri.....	30
2.5.1.1. Doğal antioksidanlar (Endojen)	30
2.5.1.2. Eksojen Antioksidanlar	31
2.5.1.3. Gıda antioksidanları	32
2.5.1.4. Enzimatik antioksidanlar	32
2.5.1.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	32
2.5.1.4.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).....	33
2.5.1.4.3. Glutasyon redüktaz (GR).....	34
2.5.1.4.4. Glutasyon-S-transferaz (GST).....	34
2.5.1.4.5. Katalaz (CAT)	35
2.5.1.5. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri	35
2.5.1.5.1. E vitamini (α - tokoferol)	35
2.5.1.5.3. Karotenoidler (β -Karoten).....	36
2.5.1.5.4. Glutasyon (GSH)	37
2.5.1.5.5. Ürik asit (Ürat)	37
2.5.1.5.6. Melatonin	37
2.5.1.5.7. Seruloplazmin.....	38
2.5.1.5.8. Flavonoidler	38
2.6. Alıç	39
2.6.1. Alıçın kimyasal içeriği.....	40
2.7. Goji Berry.....	41
3. MATERYAL VE METOD.....	43
3.1. Deney Hayvanları	43
3.2. Deney Grupları	43
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	44
3.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	45
3.5. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı Modeli	45
3.6. Homojenat Hazırlama	48
3.7. Protein Düzeyinin Tayini	48
3.8. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini	50

3.9. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	52
3.10. Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) Aktivite Tayini	56
3.11. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	57
3.12. Histopatolojik Değerlendirme	59
3.13. İstatistik	61
4. BULGULAR	62
4.1. Böbrek Dokusundaki MDA Düzeyleri	62
4.2. Böbrek Dokusundaki SOD Aktiviteleri	63
4.3. Böbrek Dokusundaki GSH-Px Aktiviteleri	65
4.4. Böbrek Dokusundaki CAT Aktiviteleri	66
4.5. Histopatolojik Bulgular	67
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
7. KAYNAKLAR	74
8. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	80
9. TABLOLAR DİZİNİ	81
10. RESİMLER DİZİNİ	82
11. EKLER	83
12. ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
PMNL	: Polimorfonükleer Lökositler
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
İ/R	: İskemi reperfüzyon
O₂^{·-}	: Süperoksit Anyon Radikali
HOCl	: Hipoklorik Asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
ROR	: Reaktif Oksijen Radikalleri
KSÜ	: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
O₂	: Oksijen
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
OH[·]	: Hidroksil Radikali
¹O₂[·]	: Singlet Oksijen
H[·]	: Hidrojen Radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
ROO	: Peroksil Radikali
MDA	: Malondialdehit
GSSG	: Okside Glutatyon
GSH	: Redükte Glutatyon
GR	: Glutatyon Redüktaz
OD	: Optik Dansite
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri

1. GİRİŞ AMAÇ

1.1. İskemi/ Reperfüzyon

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır (1). İskemi, organı veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişir ve geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku zedelenmesine neden olabilmektedir (2). İskemiye eşlik eden hücrenel ve yapısal değişiklikler ilk olarak mitokondride başlar, daha sonra hücre çekirdeği, endoplazmik retikulum, lizozom ve hücre membranı etkilenir (3). Dokuların iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabildiği halde nöronlarda dakikalar içinde geri dönüşümsüz yıkım ortaya çıkabilir. Ayrıca iskemiye maruz kalmayan bölgelerde de hasar oluşabilir. Kan akımının kesildiği bölgede lokal doku hasarı, bu alan dışındaki bölgelerde ise uzak organ hasarı meydana gelebilir (4,5). Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır (6). Reperfüzyon ile iskemik dokuda enerji ihtiyacı sağlanır ve toksik metabolitler uzaklaştırılır. Yani reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü ve reaktif oksijen radikalleri, dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır. Dokuda İ/R sonucu oluşan hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır (1,4).

Reaktif oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimler ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hücrenel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge oluşturmaktadır (7,8). Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir (8,9).

Çalışmamızda kullandığımız Alıç ve Goji Berry içeriğiyle önemli antioksidan etkiye sahiptir.

Geleneksel Çin tıbbında bitkisel ilaç olarak kullanılan Goji Berry, besin değeri ve antioksidan içeriği ile son birkaç yıldır çok popüler hale gelmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, antioksidan etkisi dışında yorgunluk giderici, anti-aging, pro-apoptotik, anti-tümör, immünomodülasyon, kan şekeri ve serum lipidlerini düşürücü etkilere de sahip olduğunu göstermektedir(10,11) .

Alıç meyvesi flavonoid bileşikleri açısından oldukça zengin olup bu yönüyle bitkiye çok güçlü antioksidan özellikler verir. Kalp-damar sistemi üzerinde pozitif etkiler gösteren bileşikler (triterpenoid saponinler, aminler ve flavonoidler) içerir. Alıç serbest radikal oluşumunu engelleyerek kalp, damar sistemini olumlu yönde etkilemektedir. Araştırmacılar, bu bitkinin kalp ve beyine kan akısını ve kalbin kasılma gücünü artırdığını, kalbi düzensiz atıslara karşı koruduğunu, damar açıcı etkiye sahip olduğunu ve kan basıncını dengelediğini göstermişlerdir (12).

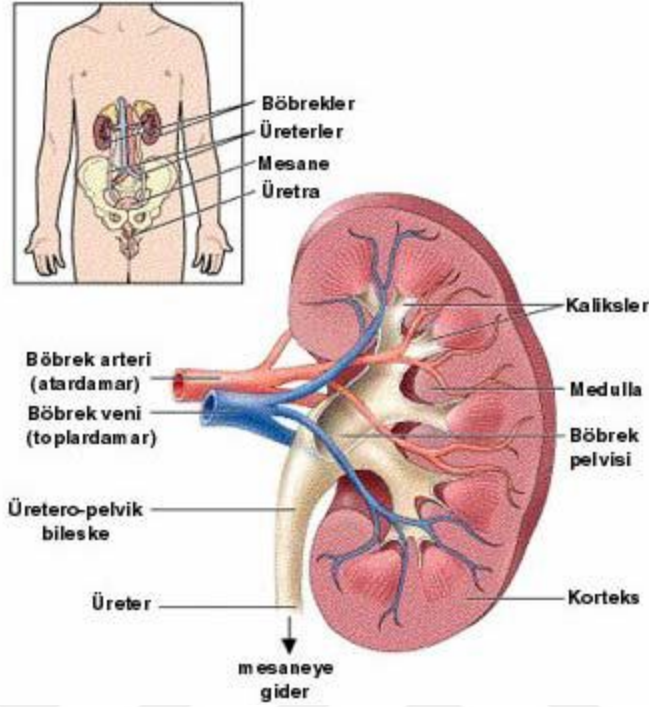
Bu çalışmada; Renal arterin geçici klempajı sonucu oluşacak iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi ya da azatılmasında alternatif tıpta sık kullanılan maddeler olan Goji berry ve Alıç ekstraktlarının renal iskemi – reperfüzyon hasarını önlemedeki etkileri, antioksidan özelliklerin anlaşılması ve aradaki ilişki ortaya konulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Yapısı Ve Fonksiyonları

Böbrekler insan vücudunda retroperitoneal kavitede, paravertebral yerleşimli olup, 12. torasik ve 3. lomber vertebralar arasında uzanırlar. Sağ böbrek, karaciğerin sağ lobunun büyük olması ve basısı nedeni ile sola göre 1-2 cm daha aşağıda bulunur. Her bir böbrek yaklaşık olarak 150-200 gr ağırlığında olup, 12-13 cm uzunluğunda, 6-7 cm eninde ve 2.5-3 cm derinliğindedir. Sağ böbrek üstte sürrenal bez, üst ve önde karaciğer, hilus seviyesinde duodenum, altta ve lateral kenarda kolon ile komşudur. Sol böbrek ise üstte sürrenal bez, önde mide, dalak, pankreas, jejunum ve desendan kolon ile komşudur. Her iki böbrek arkada diafragma, kuadratus lumborum ve psoas kaslarına yaslanır. Her bir böbreğin anterior ve posterior yüzeyleri, medial ve lateral kenarları, superior ve inferior kutupları vardır. Lateral kenar konkav, medial kenar ise konveks şeklindedir. Medial kesimde renal hilus denilen ve içinden renal arter, renal ven, renal pelvis, üreter, lenfatik ve sinirlerin geçtiği bir yarık bulunur. Renal hilus böbrek içinde, 2.5 cm derinliğinde olan ve içinde renal pelvis, renal kaliks, renal damar ve sinirler ile değişik miktarlarda yağ dokusunun bulunduğu renal sinüs olarak devam eder (13,14). Her bir böbrek aortadan köken alan renal arterler ile kanlanır. Renal arter hilustan böbreğe girdikten sonra önce interlobar daha sonra arkuat arterlere ayrılır. Arkuat arterlerden dik olarak interlobüler arterler çıkar. Bu arterlerden glomerüle giden afferent arterioller köken alır. Glomerülü oluşturan kapillerler birleşerek efferent arteriollerini oluşturur. Efferent arterioller daha sonra dallanarak tübülüsleri saran, böbrekteki 2. kapiller ağ sistemi olan peritübüler kapiller ağı oluşturur. Peritübüler kapillerlerden gelen kan venöz sisteme dökülür. Oradan sırası ile arteriyel sistemle paralel olarak interlobüler ven, arkuat ven, interlobar ven ve renal veni takip eder. Renal venler ise inferior vena kavaya drene olurlar. Üreterin üst kısmının genişlemesi ile oluşan renal pelvis ilk önce 3 majör kalikse, majör kaliksler de 8 veya daha fazla minör kalikse bölünür (13). Böbrek sagittal olarak kesildiğinde dışta korteks, içte medulla olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Medulla, medüller piramit ismi verilen 10-18 adet piramidal yapıdan oluşur. Piramitlerin tabanları kortikomedüller bölgede bulunurken, tepe kısımları kaliks içine kadar uzanır. Kaliks içine açılan bu kısımlara papilla ismi verilir. Korteks böbreğin

dış kısmının yanı sıra medüller piramitler arasında da yer alır ve bu kısma Bertini'nin böbrek kolonları denir (14,15).



Şekil 1: Böbreğin anatomik yapısı

Böbrekte idrar oluşumunu sağlayan en küçük yapısal ve anatomik birim nefrondur. Her bir böbrekte, her birinin idrar yapabilme fonksiyonu olan yaklaşık 1 milyon nefron bulunur. Böbrek yeni nefron rejenere edemez. Dolayısıyla renal bir hasar, hastalık veya normal yaşlanma ile nefron sayısında kademeli bir azalma olur. Her bir nefronun iki kısmı vardır:

1) Glomerül; sıvının kandan filtre edildiği kısım,

2) Tübülüsler; filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü proksimal ve distal tübülüsler, Henle Kulpu ile toplayıcı kanallardan oluşan kısımdır. Glomerüller, proksimal ve distal tübülüsler ve dış korteksteki nefronların Henle kulpları kortekste; toplayıcı kanallar, Henle kulpları ve vasa rectalar medüllada bulunur. Nefronlar böbrek dokusunda ilerledikleri derinliğe göre, kortikal ve jukstaglomerüler olmak üzere 2 tiptir. Glomerül, dallanan ve anastomozlar yapan ve epitelyal hücreler ile kaplı kapiller bir yumaktır. Bowman kapsülü denen bir yapı içinde bulunur. Glomerülden filtre edilen sıvı sırasıyla proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı kanallardan geçer, renal papillaların içinden renal kalikse açılır. Oradan da renal pelvise ve üretere geçer (15,16,17).

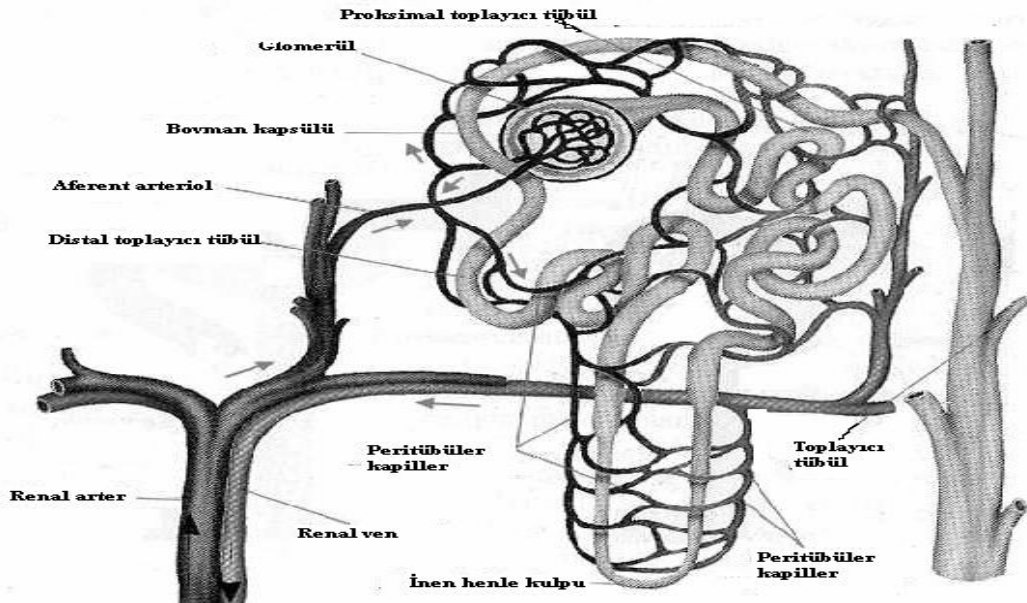
Distal tübülüsün başlangıcı her nefronda afferent ve efferent arteriyoller ile temas halindedir ve bu üç yapı jukstaglomerüler apparatus denen yapıyı oluşturur. Bu apparatusun görevi renin salgılayarak kan basıncı üzerinde etkili olmak, glomerüler filtrasyon ve renal kan akımının regülasyonunu idare etmektir. Jukstaglomerüler apparatusun distal tübülüsteki değişiklik gösteren hücrelerine maküla densa ismi verilir ve distal tübülüsteki sıvınınbirleşimine göre jukstaglomerüler apparatusun aktivitesini ayarlar (14,15).

Nefronların temel işlevi istenmeyen maddeleri plazmadan temizlemektir. Bunun için kullanılan mekanizmalar şunlardır:

1) Glomerüler Filtrasyon: Glomerüldeki kanın plazmasının bir bölümü (yaklaşık 1/5'i) glomerüler membrandan filtre edilir.

2) Tübüler Reabsorpsiyon: Filtre edilen sıvı, tübüllerde ilerlerken su ve diğer gerekli maddeler reabsorbe edilir. İstenmeyen maddeler geri emilmez ve idrar oluşumuna katkıda bulunur.

3) Tübüler Sekresyon: Plazmadaki bazı maddeler tübülleri döşeyen epitel hücrelerince doğrudan tübüler sıvı içine sekrete edilir (14,16).



Şekil 2 : Nefronun anatomik yapısı

2.1.1. Böbreğin temel fonksiyonları

1) Ekskretuar fonksiyonları; idrar oluşumu

*Atık maddelerin eliminasyonu: Metabolik atık maddeler (üre, kreatinin, ürik asit gibi) Ekzojen maddeler (ilaçlar, toksinler ve metabolitleri).

* Total vücut suyunun korunması, plasma osmolalitesinin korunması.

*Elektrolit ve asit baz dengesinin korunması: Sodyum, klorür, kalsiyum, fosfat, potasyum, magnezyum ve asit-baz dengesinin korunması.

2) Metabolik Fonksiyonlar

*Hormonlar ve benzeri maddelerin sentezi: Renin, D vitamini, eritropoietin, prostoglandinler, kallikrein-kinin, büyüme faktörleri.

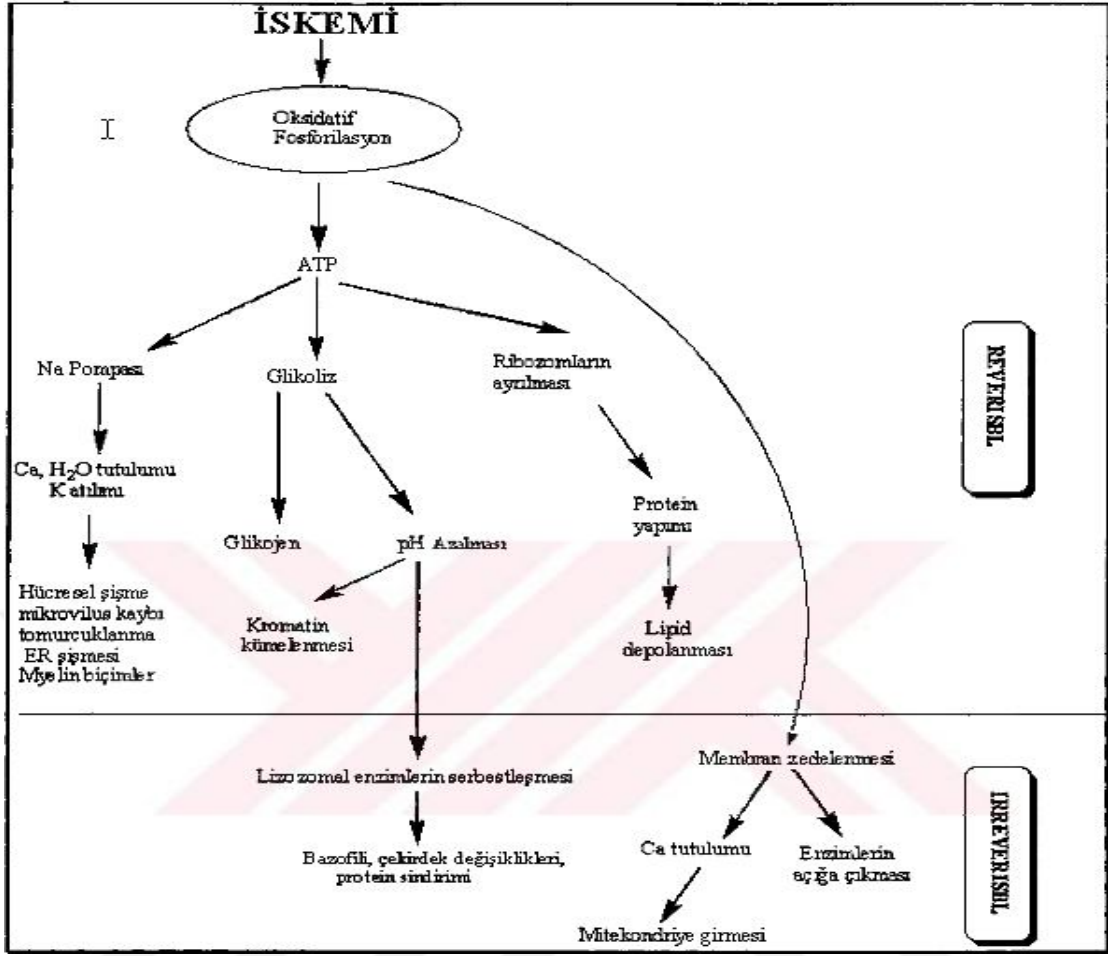
*Peptid yapılı hormonların yıkımı ve katabolizması: İnsülin, glukagon, parathormon, kalsitonin, prolaktin, büyüme hormonu, vazopressin, gastrointestinal hormonlar.

*Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin katabolizması: Hafif zincirler, β -2 mikroglobulindir.

*Diğer metabolik fonksiyonlar: Glukoneogenez, lipid metabolizması (14).

2.2. Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarı

Dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulmasına iskemi denir. İskemide hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücrel ölüm meydana gelir (18,19). Reperfüzyon; dokunun kanlanmasının tekrar başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda, özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler tarafından salınan serbest oksijen radikalleri dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Buna reperfüzyona bağlı doku hasarı denir (18,20).



Şekil 3: İskemik hasarda oluşan reaksiyonlar

SOR 'un potansiyel zararlarına çok sayıda hücre koruyucu enzimleri ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Vücudumuzdaki antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleriyle olan ilişkileri bir denge oluşturmaktadır. Hücrede oksijenin olduğu yerlerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini düşürmek için enzimatik olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada ilk olarak etkin olan enzimatik antioksidanlardır. Bunlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir (19).

İskemi ve reperfüzyon sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca^{+2} artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri oluşarak, oksidatif strese neden olur. İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinde, SOR'nin önemli bir rol oynadıkları bildirilmektedir. Serbest radikaller; lipoproteinler, serbest amino asitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitler, lipitler, ve bağ dokusu makromolekülleri

de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısındaki hemen hemen tüm biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geriye dönüşlü veya dönüşsüz etkiler meydana getirebilmektedirler (18,19). İskemi sırasında küçük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar da lipit peroksidasyonuna yol açarak hasarı arttırmaktadırlar (19,21).

2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücre ölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanması tekrar başlamasıdır. Reperfüzyon durumunda, özellikle dokuya yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salgılanan serbest oksijen radikalleri (SOR) dokudaki yıkımı artırır. Bu döngüye reperfüzyona bağlı doku hasarı denir (20).

İskemi sonucu hipoksi oluşmakta, oluşan hipoksi ise aerobik oksidatif solunumu etkileyerek, son derece önemli ve genel bir hücre zedelenmesi ve ölüm nedeni olmaktadır (20). İskemi uzun süre devam ettiği takdirde enerji eksikliğine bağlı olarak aşağıdaki şu döngüler oluşur: İskemi sonucu oksijenin azalması, krebs döngüsüyle aerobik oksidasyonda azalmaya ve hücrede bulunan adenosin trifosfat (ATP) miktarında düşüşe neden olur. Bu durum adenosin difosfat (ADP) ile fosfat birikimi ve Embden-Meyerhoff yolundaki anaerobik likolizde artışla sonuçlanır. Laktik asit ve pürivik asit birikir laktat artışı ve H⁺ birikimi doku pH'sında düşmeye neden olur. Laktik asit ve düşük pH, protein parçalanması enzim fonksiyonlarında kayıp redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) rejenerasyonunun engellenmesi ve serbest radikal oluşumu gibi iskemik hasar oluşturan etkenlerin gelişimini arttırmaktadır (22).

2.3.1. İskemi reperfüzyon hasarının mekanizması

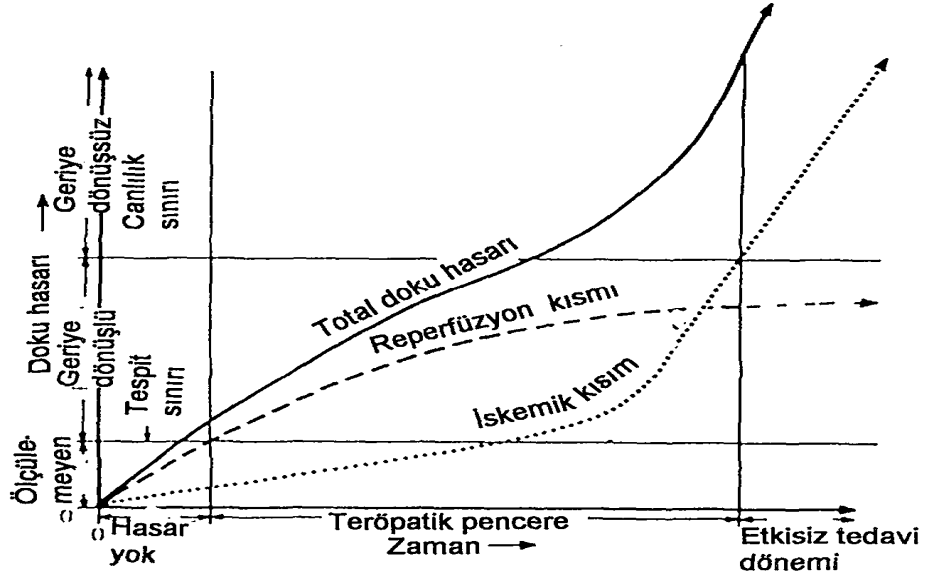
İskemi ve reperfüzyon sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca⁺² artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması

sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşarak, oksidatif strese neden olmaktadır (23,24). İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarının fizyopatolojisinde, SOR'nin önemli rol oynadıkları bildirilmektedir (23,25). Serbest radikaller; canlı organizmaların yapısındaki bir çok biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geriye dönüşlü veya dönüşsüz etkiler meydana getirebilmektedirler (24,26). İskemi sırasında küçük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar da lipid peroksidasyonuna yol açarak hasarı arttırmaktadırlar (27).

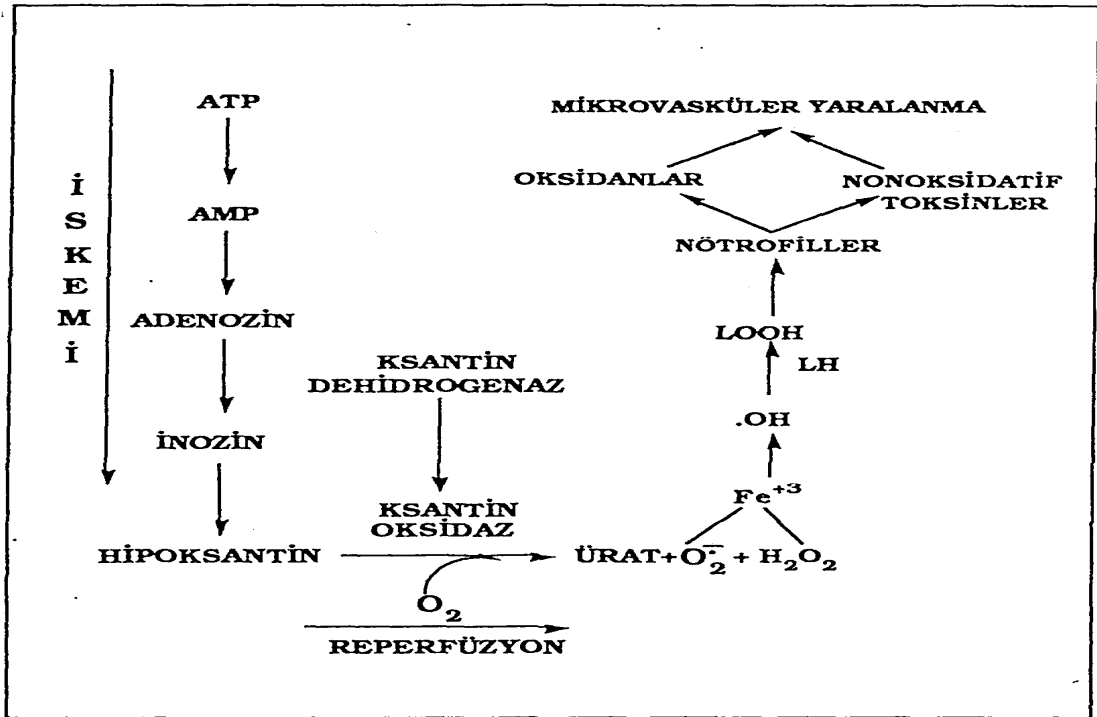
Mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun engellenmesine neden olan hipoksi, hayati önemi olan ATP yapımını durdurur. Kritik noktadan sonra öldürücü membran zedelenmesine neden olur. Aynı zamanda oluşan reperfüzyonda hücrede şu hasarlara neden olmaktadır:

- 1-Ksantin oksidaz kaynaklı serbest radikallerin oluşumu
- 2-Hasarlı endotele nötrofil yapışmasında artış
- 3-Enerji kaybı olan organa reperfüzyon sırasında Ca^{+2} taşınması
- 4-Post iskemik dönemde adenin nükleotit sağlanmasındaki yetersizlik, hücrede enerji açığı.

İskemide ATP, ADP, AMP, inozine ve hipoksantin'e yıkılır. Normalde hipoksantin ksantinoksidaz ile ksantin ve ürik aside okside olur. Bu birikim hipoksantin oksijenizasyonu için substrat fazlalığı yaratmaktadır. Reperfüzyonda ani ve fazla miktarda O_2 sağlandığından, hipoksantin'in ksantine oksidasyonu, süperoksit radikallerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (28).



Şekil 4: İskemi-reperfüzyon hasarının mekanizması

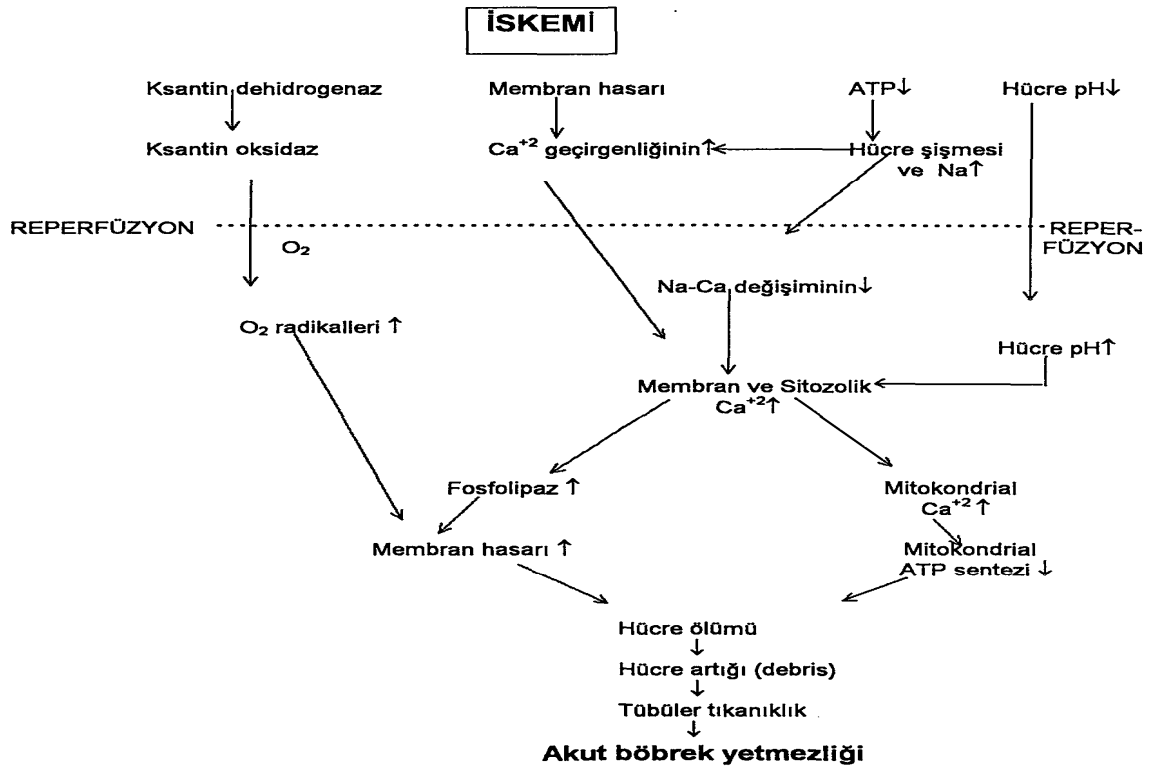


Şekil 5: Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması

Reperfüzyon dönemindeki, hücresel asit-baz dengesindeki değişiklikler ve yeniden oksijenlenme hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırdığı ortaya konmuştur. İskemik dönemdeki düşük pH seviyelerinin, dokuyu iskemik hasardan koruduğu böbrek gibi birçok organda gösterilmiştir. Asidozun, anoksidede artan Ca^{+2} 'un geri emilimini inhibe ederek, dokuyu hasardan koruması ve buna zıt olarak reperfüzyon

döneminde pH yükselmesiyle hücre içi Ca^{+2} 'un artması, hücre içi pH değerlerinin Ca^{+2} 'a bağımlı doku hasarının oluşumunda önemli bir faktör olduğunu düşündürmektedir (33).

İskemi sonucunda ATP düzeylerinin düşmesi, endoplazmik retikulum ve mitokondrinin ATP bağımlı Ca^{+2} 'un sitozolik regülasyonunu oluşturmasına engel olur. İskemi-reperfüzyon döneminde, sitoplazmik Ca^{+2} regülasyonunun sağlanamaması ve hasarlı membranlarda Ca^{+2} geçirgenliğinin artması, fazla Ca^{+2} yüküne maruz kalan böbrek korteksindeki mitokondrilerde, oksidatif fosforilasyon işlevinin bozulmasına neden olur. Mitokondrial solunum yerine getirilemez ve artan Ca^{+2} miktarıyla işlev bozukluğu doğru orantılıdır (33).



Şekil 6: İskemi-reperfüzyon medelinde tübüler epitelde Ca^{+2} 'un rolü ve hasar oluşturucu mekanizmaları

2.3.2. Endotel hücresinin rolü

İskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretmektedir. NO arteriyel dolaşımda ET'in vazokonstriktör

etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olmaktadır (38).

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I2, PG E2), büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan salgırlarlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (34).

Nitrik oksitin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler (39).

2.3.3. Nötrofillerin rolü

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikörlerle yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilededeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir (34).

Bilindiği gibi nötrofiller fagositoz ile canlıyı enfeksiyöz ajanlardan koruyan kan hücreleridir. Yapılan çalışmalarda, iskemik hücrelerin kemoatraktan maddeleri ve adhezyon moleküllerini salgılayarak, nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonuna dolayısıyla inflamatuvar yanıtı yol açtığı gösterilmiştir (40,41).

İskemi -reperfüzyon ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir (42). Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (43). Bunlar:

- 1) Mikrovasküler oklüzyon
- 2) SOR salınması
- 3) Sitotoksik enzim salınması
- 4) Vasküler permeabilite artışı ve
- 5) Sitokin salınmasında artıştır.

Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar (44). Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin gelişmesi, normalde immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir (45). Hücrel ölüm yolağındaki düzensizlikler, iskemi-reperfüzyon hasarının yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir (46) .

Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir (47,48).

Fosfolipaz A2 aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır. SOR üretimi gerçekleşir. Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar (46,49).

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; Aktive nötrofillerde ksantin-oksidadz'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması"nı meydana getirmektedir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksida dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir.

Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerinden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kollajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşmaktadır (46,50).

2.4. Serbest Radikaller

Belli durumlar altında daha önceden iskemik duruma getirilmiş fakat ölmemiş hücredeki kan akımı düzeltildiğinde zedelenme düzeleceğine daha da artar. Sonuç olarak dokular iskemik hasar sonucunda irreversibl olarak kaybolmaya devam eder. Buna iskemi-reperfüzyon zedelenmesi denmekte ve bu doku için önem arz etmektedir (20,50).

Serbest radikallerin oluşması sonrasında yeni hasar gelişir. Bu hasar oksijenin yeniden kullanımı ile veya o bölgeye gelen inflamatuvar hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri, mitokondrial permeabilite değişimini daha ileri yönlendirebilir. Bu hücrelerde antioksidan mekanizmalarda etkilenmiştir (20,54).

Tekrar kanlanma ile kalsiyum ortama gelir ve hücre içi kalsiyum dengesi sağlanamadığından Ca^{+2} etkili yollar aktive olur ve hücre bütünlüğünün kaybolmasına yol açar. İskemik hasar sitokinlerin üretimi, hipoksik parankimal ve endotelial hücrede artmış adhezyon molekülleri ekspresyonu ile birlikte dir. Bu ajanlar inflamasyona neden olur ve hücreler direkt hasar yanı sıra serbest radikallerin artışına da yol açarak ek zedelenmeye neden olur. Son verilere göre kompleman sistemi de bu duruma karışmaktadır (20).

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Oksijen hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşemez ve süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur .

Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşur (50)

1- Normal bir molekülün kovalent bir bağının her kısmında ortaklanmamış bir elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması

2- Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi

3- Normal bir moleküle tek bir elektron ilavesi

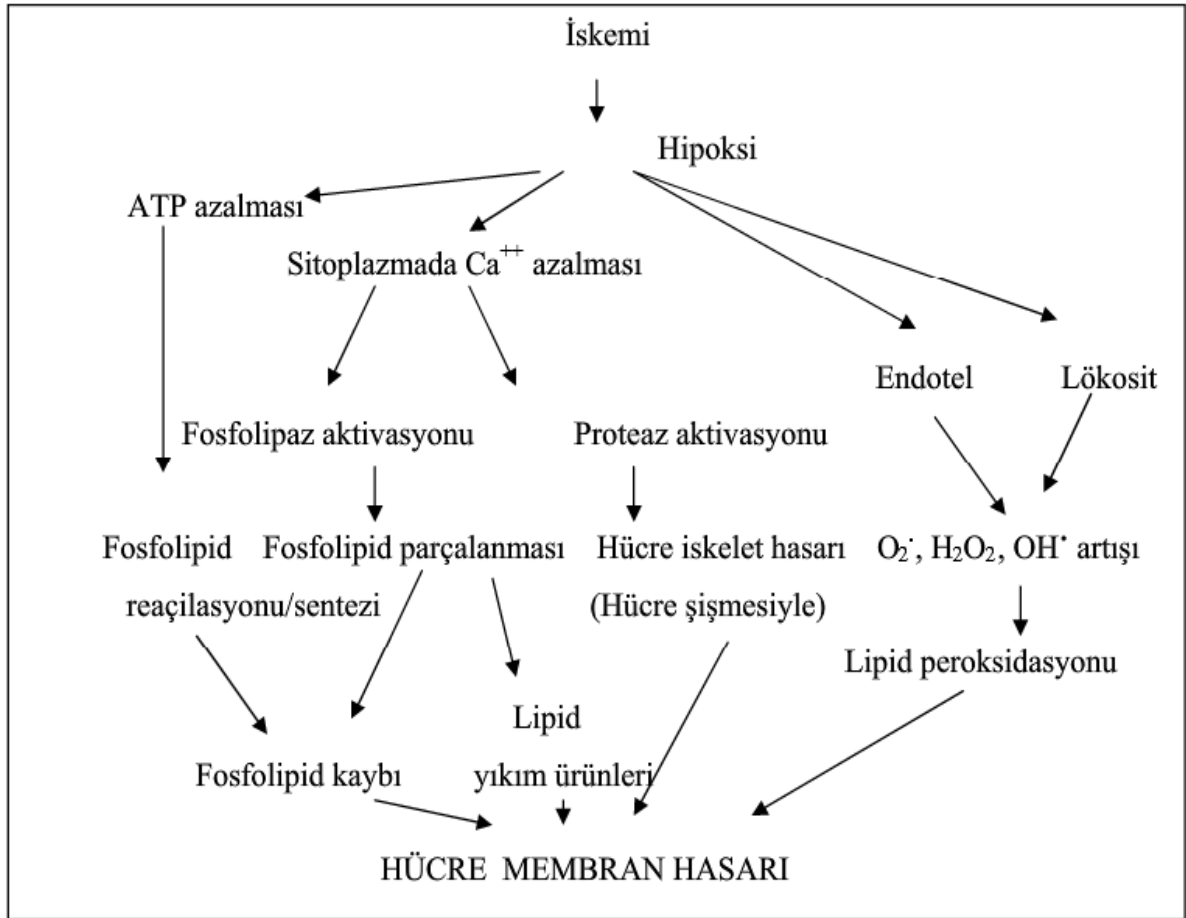
Serbest radikaller pozitif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler
38. Elektron transferi ile radikal oluşumu: $A + e^- \rightarrow A^-$

Homolitik füzyonla radikal oluşumu: $X : Y \rightarrow X^- + Y^+$

Heterolitik füzyonla radikal oluşumu: $X : Y \rightarrow X^- + Y^+$

Biyolojik sistemlerde elektron transferi ile radikal oluşumu homolitik füzyondan daha yaygındır. Homolitik füzyon; yüksek sıcaklık, ultraviyole ışığı veya iyonize radyasyondan elde edilecek enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Heterolitik füzyonda ise serbest radikaller oluşmamakta ve ürün olarak sadece yüklü gruplar meydana gelmektedir (38).

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasında denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır.



Şekil 7: İskemi sürecinde membran hasarı

2.4.1. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri

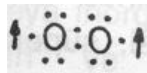
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Orbitali doldurup stabil hale gelmek için başka elektrona ihtiyaç duyduğundan ortaklanmamış elektronlar serbest radikalleri oldukça reaktif hale getirir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir (37).

Oksijen, dış orbitalde iki tane eşleşmemiş elektronu ile biyolojik sistemlerde önemli bir yeri olan serbest radikaldir. O_2 ile reaksiyona giren moleküllerin oluşturduğu serbest radikaller de biyolojik sistemde önemli bir yere sahiptir (26).

2.4.1.1. Reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen radikalleri; normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan **süperoksit radikali ($O_2\cdot^-$)**, **hidrojen peroksit (H_2O_2)** ve **hidroksil radikali ($OH\cdot$)**'dir Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler. Aşağıda serbest radikal oluşumu gösterilmiştir şekil(8).

O_2

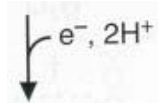


Moleküler oksijen

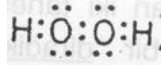


Süperoksit radikali

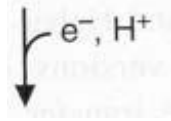
(süperoksit anyonu)



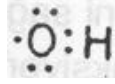
H_2O_2



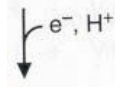
Hidrojen peroksit



H₂O + OH•

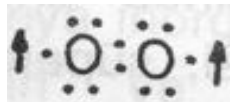
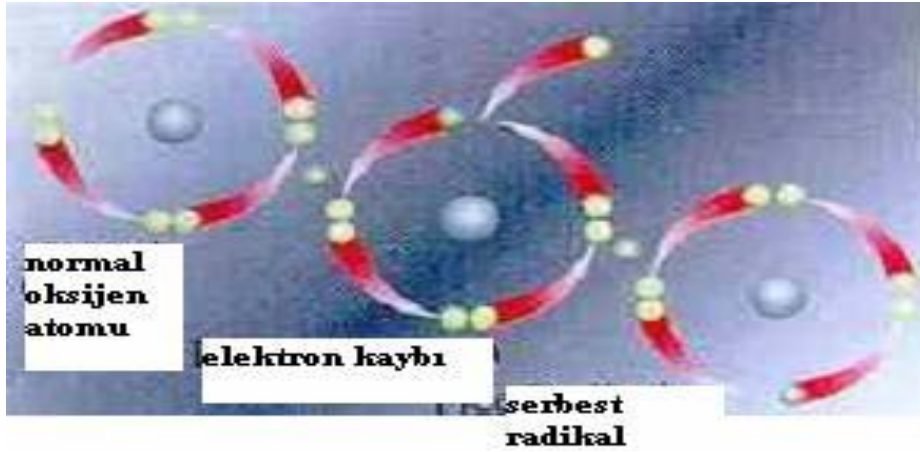


Hidroksil radikali



H₂O (Su)

Şekil 8: Serbest radikal oluşumu



Şekil 9: Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu

Moleküler oksijen (O₂), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir (37). Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanırlar. Ancak Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ ve Mo⁵⁺ gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (kation), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer (4).

Tablo 1: Reaktif oksijen partikülleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit anyon radikali (O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil (HO^\cdot)	Singlet oksijen ($*O_2$)
Peroksi(ROO^\cdot)	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^\cdot)	Hipokloroz asit ($HOCl$)
Nitrik oksit(NO^\cdot)	Lipit hidroperoksit ($LOOH$)
Semikinon radikali (HQ^\cdot)	Peroksinitrit ($ONOO^\cdot$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)

Moleküler oksijen her aşamada indirgenerek yukarıda tanımladığımız reaktif O_2^- metabolitlerinin oluşumuna yol açar. O_2^- tek başına hücre yıkımına neden olan reaksiyonları başlatabildiği gibi, esas olarak daha reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna da yol açarak hücre toksisitesinde rol oynamaktadır (26).

Reaktif oksijen metabolitlerinden en sık karşılaşılanlar şunlardır.

Süperoksit Radikali (O_2^-)

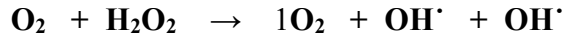
Süperoksit radikali hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu, süperoksit radikali oluşumuna neden olur. Süperoksit radikali direkt zarar vermez. Bu radikalin önemi, hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metallerinin indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir (37).

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz aracılığı ile hidrojen peroksit'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (32).

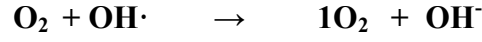
Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir (38).

1. Ortamdaki bir protonu alarak perhidroksi radikali (HO_2^\cdot) oluşturabilir.
2. Hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil radikali (OH^\cdot) ve singlet

oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturabilir.

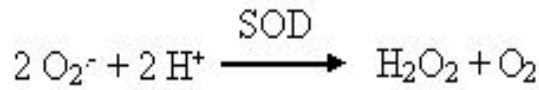


3. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olur.



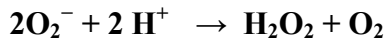
Serbest radikallere karşı organizmanın uzun süreli korumasız kalması bu maddelerin düşük konsantrasyonlarında bile biyolojik açıdan önemli moleküllerin tahribatı ile sonuçlanır ve sonuçta DNA' da mutasyona, doku tahribatına ve hastalıklara yol açar (26).

SOD, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit dönüşümünü katalize eden önemli bir enzimdir.



Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni şu şekilde oluştururlar:



Oksijen iki elektronla indirgenmesi sonucu H_2O_2 ortaya çıkar.

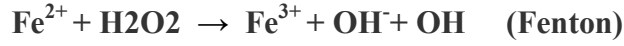


Bu reaksiyon; radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden, dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen radikali (ROR) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında en önemli serbest oksijen radikali olan OH^\cdot radikalinin oluşumunu sağlar. H_2O_2 'nin diğer önemli bir görevi de hücre içi sinyal molekülü olarak görev almasıdır. H_2O_2 oluştuktan sonra katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler adında üç enzim sistemi tarafından uzaklaştırılırlar (26).

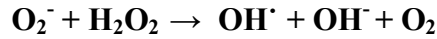
Hidroksil Radikali (OH[·])

Hidroksil biyolojik sistemlere diğer ROS' lardan daha fazla hasar veren, biyomoleküllerle reaksiyona girebilen güçlü bir radikaldir. Oluşması için ortamda geçiş metalleri gereklidir. Şu yollarla oluşabilir (47).

1. Fe (Demir) Katalizli - Haber Weiss reaksiyonu (Fenton Reaksiyonu)



2. Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonunda ise, süperoksidin direk olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesiyle oluşabilir²⁶.



Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen radikallerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS[·]), karbon merkezli organik radikaller (R[·]), organik peroksitler (RCOO[·]) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.

Singlet Oksijen (*O₂)

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronlarını değiştirerek aynı veya farklı orbitale yerledebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen denir. Reaktif olmayan ancak reaktif oksijen radikallerinden biri olan singlet oksijenin sigma ve delta diye iki tipi vardır (26). Sigma formu çok enerjik olduğundan yarı ömrü kısadır, hızlıca bozularak delta formuna dönüşür.

Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi *invivo* olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz reaksiyonlarıyla da oluşabilmektedir. Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2-5 difenilfuran, 1,4 diazbisikloalefan, singlet oksijeni temizleme görevi yaparlar. Singlet oksijen, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve sterollerini kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur.

Hidroperoksil Radikali (HO₂[·])

Süperoksit ve hidroperoksil relatif konsantrasyonları ortamdaki H⁺ konsantrasyonu üzerine dayanır. Çeşitli biyokimyasal ve inflamatuvar reaksiyonlar sonucu oluşumu önemli derecede artan süperoksit, asidik ortamda daha reaktif bir

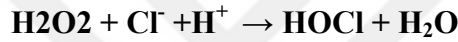
radikal olan hidroperoksile çevrilir. HO₂⁻ nin dismutasyon hızı yüksek olduğu için H₂O₂ oluşumu da büyük oranda artar.

Hidroperoksil radikalının lipitte eriyebilirliği süperoksit'e göre daha fazladır ve daha kuvvetli bir oksidandır. Ayrıca hidroperoksil radikali asidik pH da süperoksit'e göre 108 kat daha hızlı olarak H₂O₂ 'e dönüşür.

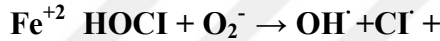
Hipokloröz Asit (HOCl)

Hipokloröz asit de radikal olmadığı halde ROT arasında yer almaktadır. Fagositik hücreler, bakterileri defektinde önemlidir. Aktive olan nötrofiller, monosit ve makrofajlar, eozinofiller O₂⁻ üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofillerde bulunan myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla O₂ 'in dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirilerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür.

Myeloperoksidaz:



Hipokloröz asit Fe⁺² bağımlı ve Fe⁺² bağımsız bir reaksiyon ile OH⁻ oluşumunu artırabilir⁴¹.



2.4.2. Serbest radikallerin üretimi

Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. Serbest radikaller metabolizma dışından gelebileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak oluşmaktadır. Serbest radikallerin endojen şeklinde yapımı çeşitli yollarla meydana gelmektedir. Buna karşılık, canlı organizmalar da serbest radikallerin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini savunmak için çeşitli mekanizmalara sahiptir (48).

Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları olup, hücrel metabolizma sırasında sürekli olarak üretilmektedir. Mitokondrial elektron transport zinciri, oksidan enzimler (ksantin oksidaz, siklooksijenaz), fagositler, nötrofiller, FeP⁺² ve epinefrin'nin hücrel otooksidasyonu endojen kaynaklar olup, okside ilaçlar (CClB4B, asitaminofen), sigara, radyasyon, glutasyonu oksidize eden maddeler ise eksojen kaynaklardır (50).

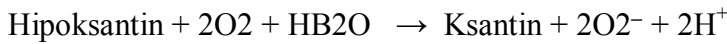
2.4.3. Endojen serbest radikal oluşum mekanizmaları

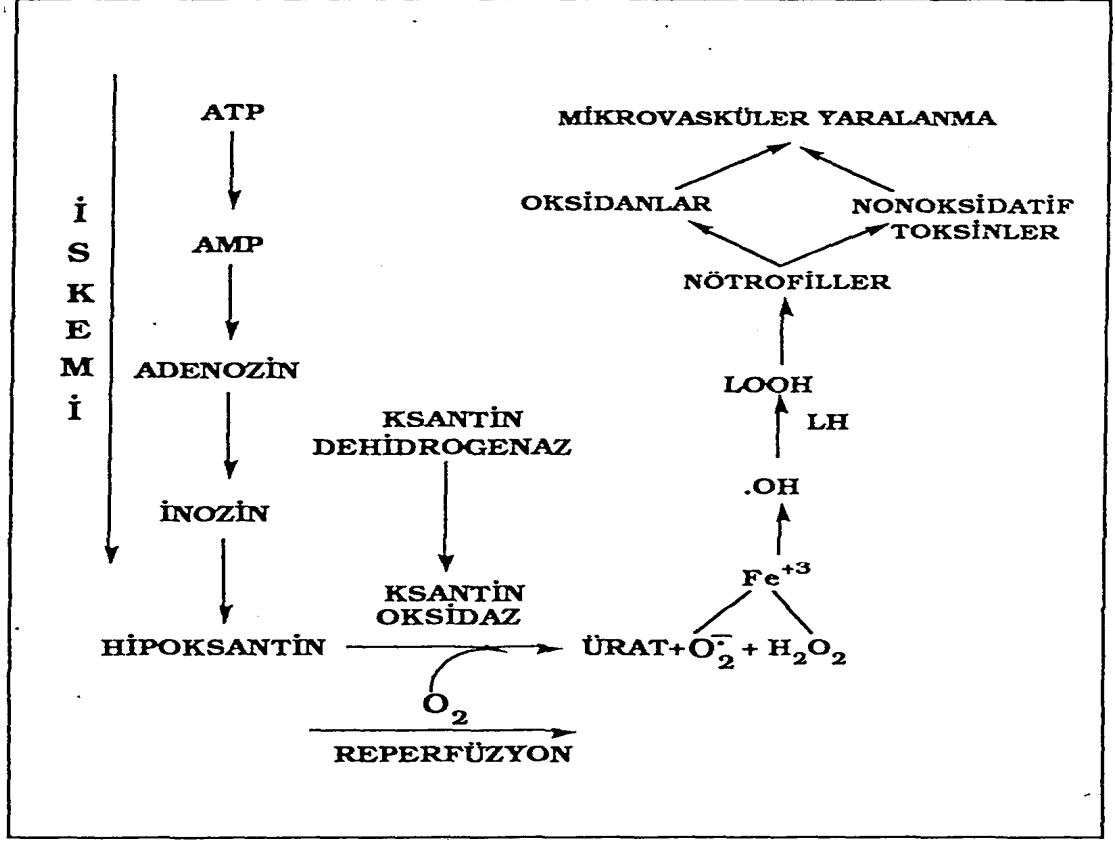
Otooksidasyon; atmosferik oksijenin katalizlediği serbest radikal reaksiyonudur. Serbest radikallerin oksijen ile reaksiyonu gayet hızlıdır. Böyle reaksiyonların başlangıcı için çeşitli mekanizmalar belirlenmiştir.. Özellikle fosfolipidler ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) otooksidasyona meyillidir. Otooksidasyonda ilk oluşan ana ürünlerin hidroperoksit (ROOH) ürünleri olduğu düşünülmektedir (48).

Mitokondrial elektron transport zinciri; normal şartlarda hücrel metabolizmada serbest radikaller üretilmektedir. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP üretimi için moleküler O_2^- suya dönüşür. Fakat O_2^- 'nin %1-5'i bu yoldan kaçarak serbest oksijen radikallerinin olduğu başka biyokimyasal yollara katılır. Ayrıca mitokondrial elektron transport zinciri ve otooksidasyon da serbest radikal üretimine katkıda bulunur. İç mitokondrial membranda yer alan elektron transport enzim kompleksi H_2O_2 üretirken, ubiquinone-cytochrom b bölgesi O_2^- üretiminden sorumludur. Mitokondrial solunum arttığında serbest radikal üretimi de artmaktadır. Ayrıca hipokside olduğu gibi terminal sitokrom azaldığında da mitokondrial elektron transport zincirinde O_2^- üretimi artmaktadır (49).

Ksantin Oksidaz(XO) ;canlı sistemde ROS oluşturan başlıca enzimatik kaynaklardan biridir. XO, pürin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside okside ederken NAD^+ 'ye elektron transferini gerçekleştiren bir dehidrogenaz enzimi olmasına karşın, dokuda belli stres koşulları altında tiyol gruplarını okside eden ve proteolizise neden olan bir oksidaz enzimine dönüşür. XO'nun faaliyeti sonucunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri oluşmaktadır. Ksantin oksidazın beyinde ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi oksidatif hasarlara neden olduğu ayrıca hepatit ve beyin tümörü vakalarında da XO'nun serum düzeylerinin arttığı aktarılmaktadır (48).

Sitoplazmik bir enzim olan ksantin oksidaz purin metabolizması sırasında O_2^- 'nin indirgenmesi ile O_2^- üretir .





Şekil 10. Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması

Araşidonik Asit Kaskatı ;Plazma membranında araşidonik asitin prostoglandin, tromboksan ve lökotriene dönüşümünden sorumlu olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimler yer alır. Bu reaksiyonlar sırasında serbest yağ asiti radikalleri oluşur (50). Membran fosfolipidlerinin parçalanması sonucu serbest yağ asitleri oluşur. Serbest yağ asitlerinin en önemlisi araşidonik asittir. Araşidonik asit, serbest radikallere, prostoglandinlere ve lokotrienlere metabolize olabilir. Bu maddeler, nötrofillerin endotelyuma adhezyonunu arttırarak, iskemide reperfüzyon hasarının oluşmasında etkili olurlar. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "**enzimatik lipid peroksidasyonu**" denir (26).

Endoplazmik Retikulum; Endoplazmik ve nükleer membranlar serbest radikal üretiminde rol alan diğer hücresel yapılardır. Bu membranlarda, yağ asitlerini oksidize ederek serbest radikal üreten sitokrom p-450 sistemi bulunmaktadır (50). Endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 O₂ kullanarak birçok substratı oksitler. O₂'nin bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır. Kimyasal ajanların

serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur (47) .

Peroksizomlar; çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda, hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitozole ne kadar hidrojen peroksit geçtiği bilinmemektedir (40).

Plazma Membranı; Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir (3,4).

Redoks Döngüsü Hücre içinde pek çok çözünür sitozolik moleküller oksidasyon-redüksiyon reaksiyonuna uğrar. Tioller, hydroquinonlar ve katekoller redoks reaksiyonuna girerek O_2^- P üretimini sağlarlar. Tiol ve askorbat ise Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirger. Fe^{+2} 'nin otooksidasyonu sırasında O_2^- oluşur. O_2^- 'nin spontan dismutasyonu ile de H_2O_2 meydana gelir (50).

Fagositoz Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Fagositik lökositler opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman fragmanı, lökotrien B^4 , bakteriyel orijinli N-formil oligopeptitler gibi partiküler ya da çözünebilir bir uyarıcıyla uyarıldıklarında lizozomal komponentleri dışarıya vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagosite edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler (3,4).

Fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünosupresif ve mutajenik etkiler gösterirler. Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukozun oksidasyonunda artışa yol açar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin süperoksit radikaline indirgenmesi sonucu $NADP^+$ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur. Heksoz monofosfat

yolunun aktivasyonuna neden olan NADP^{+} 'nin diğer kaynağı hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir. Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-hem içeren miyeloperoksidaz enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler miyeloperoksidaz içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır, bunlar biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler (3,4,50).

Tablo 2: Fagositlerin ürettiği bazı reaktif oksidan ürünler

Trombositler	H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}
Eozinofiller	H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , HOCl
Makrofajlar	H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , HOCl, NO^{\cdot}
Nötrofiller	H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , HOCl

Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zarar vermelerine karşı hassastır. Bununla birlikte kendilerini oksidanlarına karşı koruyabilirler. Fagositlerin antioksidan sistemleri, süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren süperoksit dismutaz hidrojen peroksidi suya indirgeyen katalaz, hidrojen peroksidi detoksifiye edici glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemi, antioksidan vitaminlerden α -tokoferol (vitamin E) ve askorbik asit (vitamin C) gibi antioksidanlardır (3).

2.4.4. Eksojen serbest radikal oluşum mekanizması

Eksojen serbest radikaller, Çok doymamış yağ asitlerince beslenme, alkol, fazla kalorili beslenme (obesite), hayvansal proteinlerce zengin beslenme, Sigara dumanı, hava kirliliği (O_3 , NO_2 , SO_2 , Hidrokarbonlar), radyasyon diğer kirleticiler (asbest, pestisitler, vs.) ve antikanser ilaçlar gibi eksojen nedenlerle de oluşabilir (37,47).

2.4.5. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin etkileri hücre içi ve hücre dışı etkiler olmak üzere iki başlıkta incelenebilir.

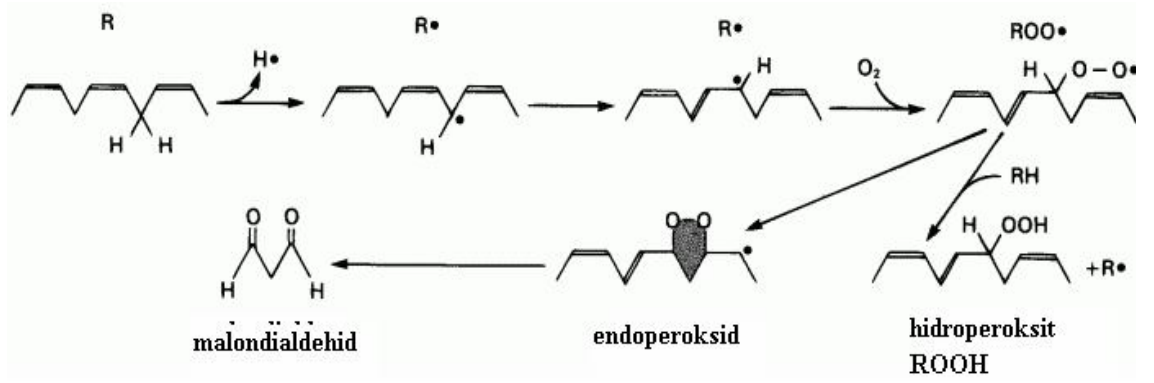
2.4.5.1. Hücre İçi Etkileri

2.4.5.1.1. Lipit Peroksidasyonu

Biyolojik moleküllerin hepsi serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler serbest radikal hasarından en fazla etkilenen biyomoleküllerdir. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ve kolesterolün oksidatif hasarlanmasına lipit peroksidasyonu denilmektedir. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (50) .

Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri ve lipit peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipit peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitleridir. Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid radikali (R^{\bullet}) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (R^{\bullet}) moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri (ROO^{\bullet}) oluşur.

Lipid peroksit radikalleri membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($ROOH$) dönüştürler ve böylece reaksiyonlar kendi kendini katalizleyerek devam eder (47).



Şekil 11: Lipid peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu

Lipid peroksidasyonu yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehytlar oluşur. Bunlar, ya hücre düzeyinde metabolize uğrarlar yada başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olarak hücrenin öbür kısımlarına hasarı gönderirler. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit meydana gelir. Bu bileşik kanda, idrarda vuku bulur. Yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir.

Membrana, ürettiği reaktif aldehytlarla zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (3,4).

Lipit Peroksidasyonu'nun Organizmadaki Bazı Etkileri;

Lipit peroksidasyonu sonucu membran akışkanlığı azalır ve normalde hücre içine geçemeyen maddelerin hücre içine girişleri artar.

Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri de lipit peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA'nın replikasyonu yapılamaz.

Lipit peroksidasyonu ve alkoksil radikaller, triptofan ve sistein gibi protein kısımlarına ataklar yaparak protein yapısını bozar ve hasar meydana getirirler.

Bazı aldehytlar biyolojik sıvılarda kemotaktik etki gösterirler.

MDA gibi aldehytlar, LDL'yi modifiye ederek metabolik yolu değiştirebilirler (50).

2.4.5.1.2. Nükleik asitler üzerine etkileri

Radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA üzerine etki ederek hücrede ölüme, mutasyona yol açarlar. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiriboz kolay bir şekilde reaksiyona girerek değişikliklere sebep olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan

hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (4,50).

2.4.5.1.3. Karbonhidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanmada rol oynarlar (3).

2.4.5.1.4. Proteinlere etkileri

Proteinler, serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerine göre daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi amino asit bileşimine bağlıdır. Yapısında kükürt bulunduran triptofan , histidin, tirozin, fenilalanin ,metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bunun neticesinde özellikle karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Serbest radikallerin hasarında, yapılarında çok sayıda içerisinde disülfid bağı içeren immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobinde bulunan hem proteinleri serbest radikallerden etkili şekilde zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (47).

2.4.5.2. Hücre Dışı Etkiler

2.4.5.2.1. Kemotaksi

Serbest radikaller, kemotaktik faktör ya da proinflamatuvar moleküller olarak adlandırılan endotel hücrelerden olan histamin, platelet aktive edici faktör (PAF),LTB4 salgılamasına yol açarlar. Böylece bu kemotaktik faktörlerin etkisi, dolaşımda bulunan lökositlerin patoloji bölgesinde yoğunlaşmalarını ve endotel ile ilişkilerinin artmasını sağlar (41).

2.4.5.2.2. Rolling

Normal koşullarda dolaşımdaki lökositler, damar endoteli ile nadiren temasta bulunurlar. Endotelin, iskemi reperfüzyonu ile oluşan radikaller tarafından uyarılması sonucu lökositler ve özellikle de nötrofiller, kendi etraflarında yuvarlanmaya başlarlar. Bu yuvarlanmayı aynı gruptan üç molekül yönlendirir. Bunlar lökositlerde bulunan L-selektin, endotel hücrelerinde yer alan P ve E selektindir. L-selektin, lökositlerin çoğunda bulunmakla beraber en yoğun olarak bulunduğu grup nötrofillerdir. L-selektin, aktive olmamış nötrofillerin uyarılmış endotel hücrelerindeki P ve E selektinlerle birleşip ilk Rolling durumunun başlamasından sorumludur. Yuvarlanma L,P ve E selektinlerin etkileşimi sonucu lökositlerde gerçekleşmektedir (43).

2.4.5.2.3. Antiadhezyon Molekülleri İnhibisyonu

Kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen endotel hücreleri İ/R'ın zararlı etkilerine karşı oldukça hassas bir yapıya sahiptirler. Uzamış hipoksinin membran potansiyelini değiştirdiği, iyon dağılımını bozduğu, hücre içi hacmi arttırıp membran akışkanlığını azalttığı ve endotel hücrelerinin yapısal düzenini bozduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bu değişikliklere enerji depolarının tükenmesi, prostasiklin, nitrik oksit (NO) gibi bazı biyoaktif ajanların üretiminde azalma ve endotelin, tromboksan A₂ üretiminde artma eşlik eder. Benzer şekilde hipoksik endotel hücrelerinde bazı genler uyarılırken (örn. adezyon molekülleri ve sitokinler), diğerleri (örn. nitrik oksit sentaz ve trombomodulin) baskılanır. Endotel hücrelerinin hipoksiye yanıtları reperfüzyon ile arttırılır (46) .

Serbest oksijen radikalleri, NO'ı inhibe ederler. NO, kararsız bir nitrat bileşimidir. Damarlarda gevšemeye sebep olması, ilk tesbit edilen fonksiyonu olmakla beraber organizmada birçok biyolojik işlevlerde görev alır. Kas, deri, barsak ve kalp gibi birçok organ sisteminde var olduğu bilinmektedir. Endotel hücreleri, lökositler gibi pekçok hücreden salınabilir. NO, lökosit endotel adhezyonunu önleyen en önemli endojen moleküldür. Ancak NO salınımı, reperfüzyon hasarı sürecinde ortaya çıkan süperoksitin, endotel hücrelerine etkisi ile inhibe olur (37).

Adhezyondan sonra özellikle nötrofiller endotel hücrelerinin arasından diapedez ile dokuya geçerek burada birikirler ve aktif oksijen (respiratuvar patlama), proteolitik enzim ve inflamatuvar sitokinlerle doku hasarını başlatırlar (48).

2.5. Antioksidanlar

2.5.1. Antioksidan savunma sistemleri

Serbest radikaller, organizmada normal metabolik yolların işleyişleri sırasında sürekli oluşan ve endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından etkisizleştirilen maddelerdir. Oksidan moleküller belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluştuklarında veya antioksidan sistemin yetersizliğinde serbest radikal molekülleri, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipit, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (49).

Hücrede oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu özellikle daha çok enzimatik mekanizmalarla gerçekleşir. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını O_2^{\cdot} radikalini ve H_2O_2 temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar radikal süpürücü olarak adlandırılan SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz enzimleridir (40).

Antioksidanların dört farklı şekilde etkileri vardır:

1) Toplayıcı etki: Reaktif oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme şeklindedir. Antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.

2) Bastırıcı etki: Reaktif oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme şeklindedir. Flavanoidler, vitaminler etkiye sahi bastırıcı etki grubunda olan antioksidanlara örnektir.

3) Zincir kırıcı etki: Reaktif oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Hemoglobinin, mineraller, seruloplazmin zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklindedir (4).

2.5.1.1. Doğal antioksidanlar (Endojen)

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler. Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler. Endojen antioksidanlar ise enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır (4,3)

- 1) Süperoksit dismutaz (SOD),
- 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px),
- 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST),
- 4) Katalaz (CAT),
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi,
- 6) Hidroperoksidaz.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: (4,3,50)

- 1) Melatonin
- 2) Seruloplazmin
- 3) Transferin
- 4) Miyoglobin
- 5) Hemoglobin
- 6) Ferritin
- 7) Bilirubin
- 8) Glutasyon
- 9) Sistein
- 10) Metiyonin
- 11) Ürat
- 12) Laktoferrin
- 13) Albümin

2.5.1.2. Eksojen Antioksidanlar

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır (4,3) :

- 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenyline iodonium)
- 3) Rekombinant süperoksit dismutaz
- 4) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- 5) Trolox-C (vitamin E analogu)
- 6) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- 7) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)

- 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri
- 9) Sitokinler (TNF ve IL-1)
- 10) Demir şelatörleri
- 11) Barbitüratlar

2.5.1.3. Gıda antioksidanları

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar şunlardır (4,3)

- 1) Butylated hydroxytoluene (BHT)
- 2) Butylated hydroxyanisole (BHA)
- 3) Sodium benzoate
- 4) Propylgalate
- 5) Ethoxyquin
- 6) Demir(Fe)-superoxyde dismutase

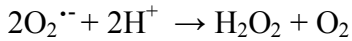
Vitamin eksojen antioksidanlar^{4,3}:

- 1) α-tokoferol (vitamin E)
- 2) β-karoten(vitamin A)
- 3) Askorbik asit (vitamin C)
- 4) Folik asit (folat)

2.5.1.4. Enzimatik antioksidanlar

2.5.1.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur, süperoksidin H₂O₂ dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. SOD süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü aşağıdaki reaksiyonla katalizleyen antioksidan enzimdir (41,10).



Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimi ile gerçekleşir. SOD, O₂'radikalini metabolize eder ve daha zararlı olan hidroksil radikalının oluşumunu engeller.

O₂'radikalini H₂O₂'ye ve moleküler O₂'ye dönüştürür. Tepkime ürünü olan H₂O₂ tarafından inhibisyona uğrar .

SOD enzimi metalloprotein yapısındadır. Hücrelerde farklı şekillerde bulunmaktadır. Bunlar:

SOD-1:Cu-Zn SOD, stoplazmada bulunur.

SOD-2:Mn-SOD, mitokondride bulunur.

SOD-3 :Fe-SOD, Bazı bakterilerde rastlanmıştır.

SOD-4 : Ni-SOD, Bazı bakteri türlerinde bulunur.

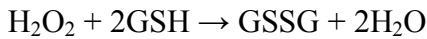
İnsanlarda ise SOD enzimi: Sitolitik Cu/Zn-SOD; mitokondrial Mn-SOD; plazma, lenf ve sinovyal sıvılarda bulunan ekstrasellüler SOD olmak üzere 3 formda bulunur ⁴¹.

SOD, O₂'molekülleri ile spontan olarak dismutasyona uğrayabilir. Sulu ortamda kendiliğinden ve hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak O₂ ve H₂O₂ oluşturur. SOD varlığı dismutasyon hızını 10⁴ kat artırır. Böylece O₂'radikalinin potansiyel substratla reaksiyona girmesi ve OH[·] gibi daha toksik ürünlerin oluşması SOD tarafından önlenmiş olur. Organizmada oksidatif stresin ve dokuda pO₂'nin arttığı durumlarda SOD enzim aktivitesi artmaktadır.

Hidrojen peroksit, Fenton reaksiyonu veya Haber-Weiss reaksiyonları ile çok daha reaktif olan OH[·] radikali oluşturabilir. Oluşan H₂O₂'e karşı ikinci savunma CAT ve GSH-Px enzimleriyle sağlanır.

2.5.1.4.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardandır. İntrasellüler glutasyon olarak bulunan en güçlü thiol bileşigidir. GSH- Px enzimi, glutatyondan ayırarak H₂O₂'yi suya dönüştürür, selenyuma bağlı sitoplazmik bir enzimdir, H₂O₂'yi detoksifiye ederek su ve okside glutatyona dönüştürür .



GPx'in antioksidan aktivitesini göstermesi, hücre içinde yeterli konsantrasyonda glutasyon redüktaz, GSH ve nikotinamid adenin dinükleotid bulunmasına bağlıdır .

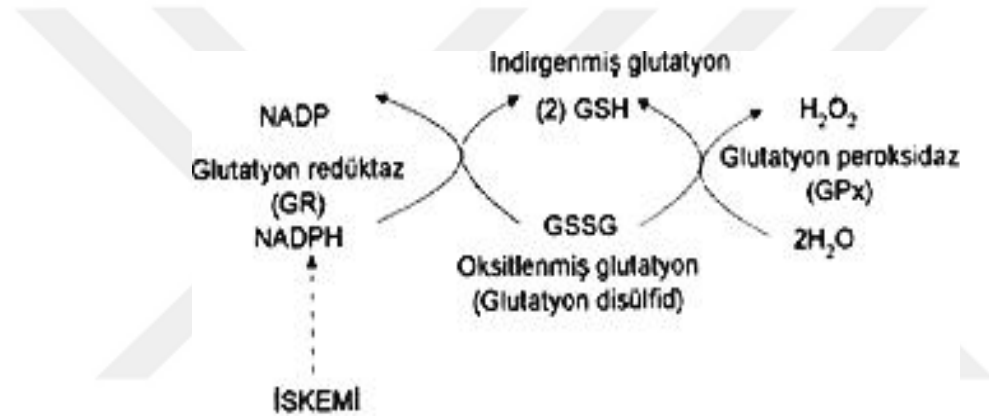
Glutasyon peroksidaz sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Ayrıca Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.



Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz membrana bağı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler (3).

2.5.1.4.3. Glutatyon redüktaz (GR)

Glutatyon redüktaz, bir flavin enzimidir, hem sitozolde hemde mitokandride bulunur, koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD'dır. GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü şu şekilde katalize eder (3).



Şekil 12: İskemide glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın rolü

2.5.1.4.4. Glutatyon-S-transferaz (GST)

Glutatyon S-transferazlar, her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Bunlar hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir. GST, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması gösterir. GST'ler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'ler, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler (3).

GST ailesi ayrıca ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler GSH-Px aktivitesi gösterirler (41).

GST

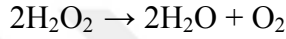


Glutasyon-S-transferazlar, glutasyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlarlar (42).

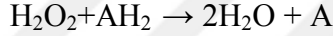
2.5.1.4.5. Katalaz (CAT)

Katalaz 60 kDa ağırlığında 4 tane aynı yapıda (tetramerik yapıda) hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, katalaz enzimi bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini ise oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (3,25).

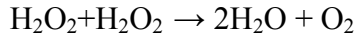
CAT



Katalaz enzimi peroksizomlarda yerleşmiş olup kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Katalaz önemli bir aktivite olarak düşük hızlarda hidrojen peroksidin oluştuğu durumlarda ya da ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğu peroksidatif tepkime ile hidrojen peroksidi suya dönüştürür.



Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise aşağıdaki katalitik tepkimeyle H_2O_2 yi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmış olur (34).



2.5.1.5. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri

2.5.1.5.1. E vitamini (α -tokoferol)

Vitamin E çok güçlü bir antioksidandır, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur (52). Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka bu moleküle antioksidan özellik kazandırır (44). Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu, vitamin E vasıtasıyla şu yolla sonlandırılabilir: Vitamin E okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutasyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Vitamin E ve C verilmesinin, yaşlı kişilerde ortalama kan lipid

peroksit konsantrasyonlarında bir azalma sağladığı saptanmıştır. Glutasyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutasyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller (34).

2.5.1.5.2. C vitamini (Askorbik asit)

Vitamin C organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapar ayrıca Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β -hidroksilaz basamağında görev alır. Tirozin yıkılımında p-hidroksi fenil pirüvatın homogenizata oksidasyonunda rol alır. Safra asitlerinin sentezindeki 7- α -hidroksilaz başlangıç basamağında rol alır. Lizinden karnitin sentezinde rol alır. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici olarak rol oynar, midede ferri demiri ferro demire indirger. İmmünite ve yara iyileşmesinde etkilidir (3).

Vitamin C, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdaki temizler. Askorbik asitin antioksidan etkisinin varlığı gibi oksidan etkisinde mevcuttur. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Vitamin C nin ,sayılan özelliklerinden dolayı serbest radikallerin önemli bir katalisti yada bir prooksidanı olarak görev aldığı söylenebilir.Fakat bu etkinin gözlemlenebilmesi için sadece düşük konsantrasyonda olması gerekir, çünkü yüksek konsantrasyonlarda C vitamini güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir.C vitamini fagositoz esnasında önemlidir (5).

2.5.1.5.3. Karotenoidler (B Karoten)

Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır (3).

Karotenoidler (β -karoten, Likopen, Zeaksantin, Lutein, Violaksantin), genelde sarı ve turuncu renkli bileşikler olup bazı bakteriler ve alglerde, çoğu zaman ise bitkilerde bulunan pigmentlerdir. İnsan ve hayvanlar karotenoid biyosentezini gerçekleştiremedikleri için bu bileşikleri diyetle alırlar. Karotenoidler organizmada, triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama, singlet oksijeni baskılama ve bazı oksijen

radikallerini temizleme gibi koruyucu etkilere sahiptir. Bununla birlikte karotenoidler, lipit membranlara lokalize olarak membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltır (45).

2.5.1.5.4. Glutasyon (GSH)

Glutasyon karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan güçlü bir antioksidan ve bir tripeptittir. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (32,46).

Organizmada temel olarak; peroksidaz aracılı peroksitlerin katabolize edilmesi, hücrel tiyol ve redoks potansiyelinin düzenlenmesi, Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH; yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar ayrıca eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada GSH hayati öneme sahiptir.

2.5.1.5.5. Ürik asit (Ürat)

Normal plazma konsantrasyonunda ürat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Ürik asit ksantin oksidaz 'ın oksipürünleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi sonucu oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır. Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. Ayrıca albümin lipit hidroksiperoksitleri ve HOCl toplayıcısıdır. Bu görevlerde ürik asitin antioksidan etkilerinin olduğunun göstergesidir (3).

2.5.1.5.6. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) en zararlı radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Bu yüzden günümüzde antioksidanların en güçlüsü kabul edilir. Melatonin antioksidanın diğer bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin diğer organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan- beyin bariyerlerini de kolayca geçebilir. Böylece geniş bir dağılımla antioksidan etki gösterir. Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi onun

DNA'yı oksidatif hasardan koruması bakımından diğer oksidanlara göre daha üstün bir özellik kazandırır. DNA hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Yaşlanma ile melatonin üretiminde azalır ki bunun da yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli rolü olabileceği kaydedilmiştir (3).

Melatonin pineal bez tarafından üretilir. Melatonin biyosentezinde başlangıç maddesi pineal bez tarafından aktif transportla plazmadan alınan ve bir indol amino asit olan triptofandır. Triptofan esansiyel bir aminoasit olup dışardan alınması gereklidir, pineal bez tarafından aktif transportla plazmadan alınır .

2.5.1.5.7. Seruloplazmin

Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri (Fe^{+2}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe etmektedir (3).

2.5.1.5.8. Flavonoidler

Biyolojik sistemlerdeki aerobik metabolizma bazal koşullarda bile prooksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen ürünlerini oluşturur (1). DNA, lipidler, proteinler gibi biyolojik moleküllerin prooksidan hasarına karşı koymada endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlara gereksinim vardır. Eğer prooksidanlar çok fazla oluşursa oksidatif stres ya da oksidatif hasar meydana gelir. İnsanlardaki birçok hastalık (kanser, kardiyovasküler düzensizlikler vb.) prooksidan hasara eşlik eder. Bu hastalıkların antioksidanlar tarafından önlenmesi konusu son yıllarda tıbbi literatürde önemli bir yer tutmaktadır. Antioksidanlar etkilerini ROS 'nin oluşumunu önleyerek ve/veya ROS'ni temizleyerek gösterirler, Eksojen kaynaklı antioksidanların birçoğu bugün yaygın olarak kullandığımız gıdalarda mevcuttur.

Bunlar; bazı vitaminler, flavonoidler, polifenoller, ve diğer bileşikleridir. Flavonoidler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda önem kazanan çalışmalar flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında antiinflamatuvar, antiviral, antiallerjik, antitrombotik ve diğer özelliklerinin de bulunduğunu göstermektedir (31,42).

Flavonoidler antioksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidlerin etki mekanizmaları şu şekildedir:

- a) Süperoksit radikali, hidroksil radikalini ve singlet oksijeni temizler.

b) Peroksil radikalini (ROO·) ve alkoksil radikalini (RO·) yakalar, lipid peroksil (LOO·) zincirini kırar.

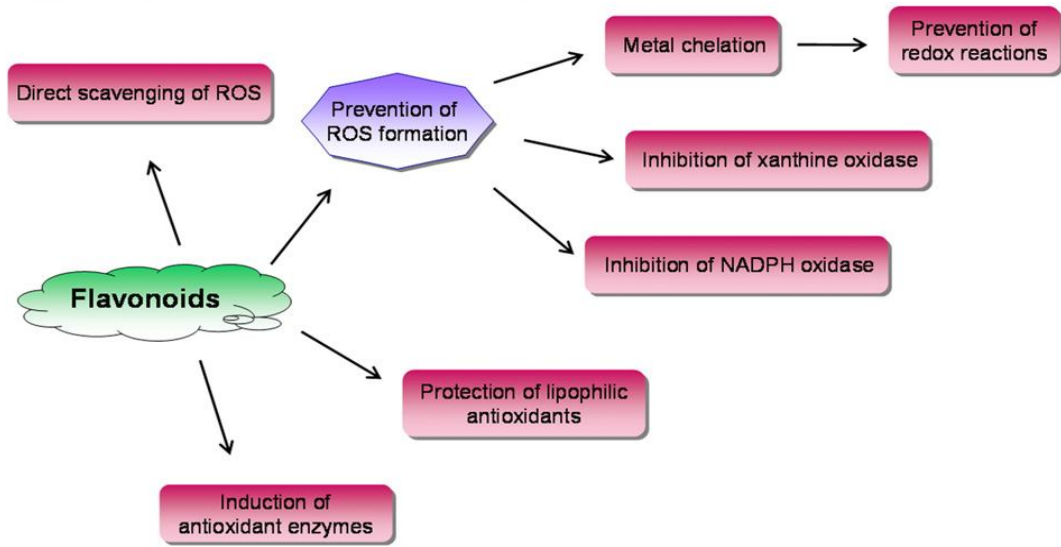
c) Siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzimlerini inhibe eder.

d) Demir ve bakır gibi geçiş metalleri şelatlar.

e) Enzim fonksiyonlarına bağımlı kalsiyum modinasyonu hücrel regülasyonda önemli bir rol oynayan küçük bir asidik protein olan kalmodülini inhibe eder.

f) Protein kinaz enzimini inhibe eder.

g) Laktat transportunu engeller.



Şekil 13: Flavonoidlerin antioksidan etki mekanizmaları.

2.6. Alıç

Alıç, Rosaceae (Gülgiller) familyasından Crataegus cinsi bir ağaçtır. Genellikle yabani olarak yetişir. Alıç 10 metreye kadar yükselebilen, dikenli, beyaz veya pembe çiçekli, meyveleri esmer-kırmızı veya kırmızı renklidir. Sert iklimlere dayanıklı, güneşi seven, her iklimde yetişebilen ve hafif ekşimsi bir tadı olan alıç, değişik yörelerde değişik isimler almıştır. Bunlar; alıç, aluç, yemişen, ekşi muşmula, kuş yemişi gibi farklı isimlerdir. Yeryüzünde Crataegus cinsinin 200 kadar türü olduğu biliniyor ve bu türlerin çoğunun genellikle kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde yayılış gösterdiği bilinmektedir. Ülkemizde 20'ye yakın alıç türü bulunmaktadır (61).



Resim 1. Alıç ağacı ve meyvesi

Alıç meyvesi flavonoid bileşikleri açısından oldukça zengin olup bu yönüyle bitkiye çok güçlü antioksidan özellikler verir. kalp-damar sistemi üzerinde pozitif etkiler gösteren bileşikler (triterpenoid saponinler, aminler ve flavonoidler) içerir.⁶³ Alıç serbest radikal oluşumunu engelleyerek kalbin damar sistemini olumlu yönde etkilemektedir.⁶⁴ Araştırmacılar, bu bitkinin kalp ve beyine kan akışını ve kalbin kasılma gücünü artırdığını, kalbi düzensiz atışlara (kalp ritm bozukluğu) karşı koruduğunu, damar açıcı etkiye sahip olduğunu ve kan basıncını dengelediğini göstermişlerdir (12).

2.6.1. Alıcın kimyasal içeriği

Alıç önemli tıbbi bitkiler arasında yer almaktadır. Antioksidan özellikteki flavonoidler yönünden oldukça zengindir. Flavonoidlerin antitümör etkisi, antiviral etkisi, antialerjik etkisi, antiinflamatuar etkisi ve vazodilatasyon etkilerinin de olduğu bilinmektedir Alıç, glikosidler, saponin ve tanenler, cratetegin, C vitamini mineraller, kardiyonik aminler, asetilkolin, pürin derivatları, amigdalin ve pektinler içermektedir Alıcın antioksidan özellikteki flavonoidler yönünden oldukça zengin olması ve kullanılması durumunda vücuttaki antioksidant seviyesinin yükseldiğini, kalbi besleyen koroner damarlardaki kan akımını artırıcı etkilerinin olduğunu, kalp kasını güçlendirdiğini, dakikadaki kalp atım sayısını düşürdüğünü, kan kolesterol, trigliserit ve

LDL düzeylerini anlamlı derecede azalttığını bildiren bilimsel çalışmalar ortaya çıkmıştır. Bunun ile birlikte son zamanlarda alıç meyvesinin toplum tarafından da tıbbi yönden yararlı olduğu ve kullanılmasının birçok yararı olacağı düşüncesinin hakim olduğu bilinmektedir (64,65).

2.7. Goji Berry

Goji Berry (Wolfberry, *Lycium barbarum*) boyu 1-3 metre arasında değişebilen, yaprak döken çok yıllık odunsu bir bitkidir. 1-2 cm uzunluğunda, parlak turuncu-kırmızı elips meyveleri vardır (54, 55, 56).



Resim 2: Goji Berry ağacı ve meyvesi

Goji Berry, günlük harcamanın yüksek bir kısmını karşılayacak oranda makrobesinler içerir. İçeriğinde %68 Karbonhidrat, %12 protein, yüzde %10 lipid ve %10 lif bulunmaktadır. Ayrıca vitaminler ve minerallerce zengin bir protein deposudur. 19 ayrı aminoasit, 11 temel mineral ve 21 iz mineral (Bunlardan en önemlisi çinko, demir, bakır, kalsiyum, germanyum, selenyum, fosfor), betakaroten, vitamin B kompleksi, E vitamini, C vitamini, Zeaksatin, karotenoidler, Beta-sitosterol, Cyperone, Solavetivone, Physalin, Betaine ve çok sayıda fenolik asitler ve flavonoidler içerir (57,58).

Geleneksel Çin tıbbında karaciğer, böbrek ve göz tedavisinde kullanılan goji berry, besin değeri ve içeriği ile son birkaç yıldır çok popüler hale gelmiştir. Yapılan

linik çalışmalar sonucunda goji berry kullanan hastaların n6rolojik / psikolojik 6zellikleri, eklem / kas fonksiyonları, uyku kalitesi, yetenek faaliyetleri, gastrointestinal sistem sorunları, yorgunluk, baş ağrısı, depresyon, diyabet, glukom, konsantrasyon bozukluğu, hafıza kaybı ve nefes darlığı Őikayetlerinde azalma g6zlenmiştir (59,60).

Son yıllarda yapılan bu çalışmalar, goji berry'nin antioksidan etkisi dışında yorgunluk giderici, anti-aging, anti-miyelosupresyon, pro-apoptotik, anti-t6m6r, n6roprotektif etki, imm6nomod6lasyon, kan Şekeri ve serum lipidlerini d6ř6r6c6 etkileye de sahip olduğunu g6stermektedir (55,56,61,63).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alınarak. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından, KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmalar standart deneysel hayvan çalışmalarına uygun olarak yapıldı. Bu KSÜ bireysel araştırma fonunun desteği ile gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan toplam 40 adet erkek Wistar-albino cinsi rat KSÜ Tıp Fakültesi Deney hayvanları barınağından alındı. Sıçanlar 200±20 gram ağırlığında ve 4-5 aylıktır. Sıçanlar 21±1° C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyodunda tutularak standart rat yemi ve su verilerek beslendi.

3.2. Deney Grupları

Bu çalışma 200-220 gr ağırlığında 40 adet erkek Wistar-albino cinsi rat beş gruba ayrılarak (sham grubu; n=8, kontrol grubu; n=8, goji berry ekstraktı uygulanan grup; n=8, alıç ekstraktı uygulanan grup; n=8, alıç ve goji berry ekstraktı uygulanan grup; n=8) gerçekleştirildi.

Tüm gruplardaki her bir rat Ketamin ve Ksilazin Hidroklorid ile anestezi uygulandıktan sonra batın ön duvarı tüyleri kesilerek povidon iyot ile temizlenip steril şartlarda laparotomi uygulandı.

Grup 1 (Sham): Laparotomi sonrası renal arter izole edilerek böbrek dokusu alınan grup.

Grup 2 (Kontrol): Laparotomi sonrası ratlarda renal arterde 60 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyon sonrası median laparotomi yapılarak böbrek dokusu alınan grup

Grup 3 (Alıç): Ratlara deney öncesi 10 gün süreyle oral gavaj yoluyla 200 mg/kg/gün alıç verilen ve 10. gün laparotomi sonrası renal arterde 60 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyon sonrası median laparotomi yapılarak böbrek dokusu alınan grup.

Grup 4 (Goji berry): Ratlara deney öncesi 10 gün süreyle oral gavaj yoluyla 200 mg/kg/gün goji berry verilen ve 10. gün laparotomi sonrası renal arterde 60 dk

iskemi ve 60 dk reperfüzyon sonrası median laparotomi yapılarak böbrek dokusu alınan grup.

Grup 5 (Alıç grubu + Goji berry) : Ratlara deney öncesi 10 gün süreyle oral gavaj yoluyla 200 mg/kg/gün alıç ve 200 mg/kg/gün goji berry verilen ve 10. gün laparotomi sonrası renal arterde 60 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyon sonrası median laparotomi yapılarak böbrek dokusu alınan grup.

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1,1,3,3 tetrametoksiopropan		Sigma
- Bakır sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma
- 2-[2-Tiyobarbitürik asit]	TBA	Merck
- Etilendiamin tetraasetik asit	Na_2EDTA	Sigma
- Disodyum hidrojen fosfat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Merck
- Sodyum dihidrojen monofosfat	NaH_2PO_4	Merck
- Dipotasyum hidrojen fosfat	K_2HPO_4	Merck
- Potasyum dihidrojen fosfat	KH_2PO_4	Merck
- Folin-Ciocalteu	Fenol ayıracı	Sigma
- Glutatyon	GSH	Sigma
- Hidrojen peroksit	H_2O_2	Merck
- Lauril sülfat	SDS	Sigma
- n-Butanol		Merck
- Piridin		Merck
- Sodyum hidroksit	NaOH	Merck
- Sodyum karbonat	Na_2CO_3	Merck
- Sodyum klorür	NaCl	Merck
- Sodyum potasyum tartarat	Na-K tartarat	Sigma
- Tris baz		Sigma
- Tris hidroklorit	Tris-HCl	Sigma
- β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat	β -NADPH	Sigma
- Hidroklorik asit	HCl	Merck
- Formaldehit	HCHO	Sigma
- Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Sigma
- Asetik Asit	CH_3COOH	Sigma

- Ksantin		Sigma
- CAPS		Sigma
- Ksantin oksidaz		Sigma
- Iodonitrotetrazolium klorür	INT	Sigma

3.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Derin Dondurucu	Samsung
- pH metre	Hanna Instruments
- Hassas Terazî	Radwag
- UV Spektrofotometre	Shimadzu
- Buz Makinesi	Scotsman
- Distile su cihazı	Merck
- Manyetik Karıştırıcı	Mtops
- Cam Kalemi	
- Fotoğraf makinesi	
- Hayvan Kafesi	
- Homojenizatör düzeneği	
- Kronometre	
- Lam	
- Lamel	
- Mezür (25ml,50 ml,100 ml,250 ml,500 ml)	
- Mikroskop	
- Operasyon Takımı	
- Otomatik pipet, pastör pipeti	
- Soğutmalı santrifüj	Hettich
-Su Banyosu	
-Vorteks	

3.5. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı Modeli

Çalışma KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Ratlar laboratuara getirildiler ve tek tek tartılarak her birine intramüsküler olarak 60

mg/kg dozunda ketamin hidroklorid (Ketalar flakon, Eczacıbaşı Türkiye) verilerek anestezi sağlandı. Anesteziyi takiben hayvanlar sırt üstü yatırılarak yaklaşık 3 cm boyunda medyan laparotomi yapılarak abdomen açıldı ve dikkatli bir şekilde böbreğe ulaşıldı. Sol renal arter izole edilerek küçük vasküler klemp yerleştirildi ve renal iskemi sağlandı. Bu sırada sıvı ve ısı kaybını önlemek amacıyla abdomen diğer bir klemp yardımıyla kapatıldı ve 1 saat boyunca renal iskemiyeye maruz bırakıldıktan sonra klemp açıldı ve bunu takiben bu kez 1 saat boyunca renal reperfüzyon sağlandı. Böylece 60 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon süreci tamamlanmış oldu. Daha sonra klemp alınarak sol nefroktomi ile doku örneği alındı.

İlaç verdiğimiz gruplarda, etken maddeler intraperitoneal olarak iskemiden 15 dk önce İntraperitoneal (İP) verildi ve daha sonra 60 dk renal iskemi ve 60 dk reperfüzyona maruz bırakıldı. Sham grubunda ki sıçanlara ise medyan laparotomi yapıp iskemi reperfüzyon yapılmadı ve etken madde verilmedi. Kontrol gurubunda ki sıçanlara da etken madde verilmedi bu gruba medyan laparotomiyi takiben 60dk iskemi, 60dk reperfüzyon yapıldı ve doku örneği alındı. Ancak sham ve kontrol grubuna laparotomiden 15 dk önce 0,3 ml salin içinde sadece 50 mg/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi.

Deney sonunda, çıkarılan böbrek dokusu iki eşit parçaya ayrılarak histopatolojik incelemeler ve biyokimyasal incelemeler için uygun koşullarda saklandı. Histopatolojik değerlendirme Adana Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında, biyokimyasal değerlendirmeler ise KSÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı.



Resim 3: Sol renal artere klemp uygulanması ve iskemi başlangıç



Resim 4: İskemi sonrası 60.dk iskemik böbrek



Resim 5: Reperfüzyon sonrası sol böbreğin görünümü

3.6. Homojenat Hazırlama

Dokuların homojenize işlemine geçmeden önce dokulara 1 gr 9 hacim (hacim/ağırlık) %1,15 KCl çözünme sağlamak amacıyla eklendi. Dokular 16.000 devir/dakika hızda 3 dk boyunca homojenize edildi. Enzim aktive kaybını önlemek amacıyla örnekler buz dolu küvete yerleştirildi. Daha sonra homojenatlar +4 °C'de 14000rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve üstteki süpernatantlar alındı ve ependorf tüplere ayrıldı bu ayrılan süpernatantlardan protein ve MDA düzeyleri ile SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktive ölçümleri yapıldı.

3.7. Protein Düzeyinin Tayini

Bu metot proteinlerin içerdiği trozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungstik – fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun spektrofotometrik yöntemle 750 nm'deki absorbans ölçümüne dayanır.

Ayrıçlar

1. A çözeltisi:

%2 Na₂CO₃ 2 g hazırlanır

0,1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. B Çözeltisi: B₁ ve B₂ çözeltilerinden oluşur.

a) B1 Çözeltisi:

% 1 CuSO₄.5H₂O 1g hazırlanır

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

b) B2 Çözeltisi:

%2 Na-K tartarat 2g hazırlanır

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

3. C Çözeltisi(Günlük hazırlanır)

50 ml A + 1 ml B (0,5 ml B₁+0,5 ml B₂) karıştırılır.

4. D Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

Folin Cioacaltea 1: 1,5 (v/v) oranında saf su ile sulandırılır ⁴¹.

Standart Eğrinin çizimi

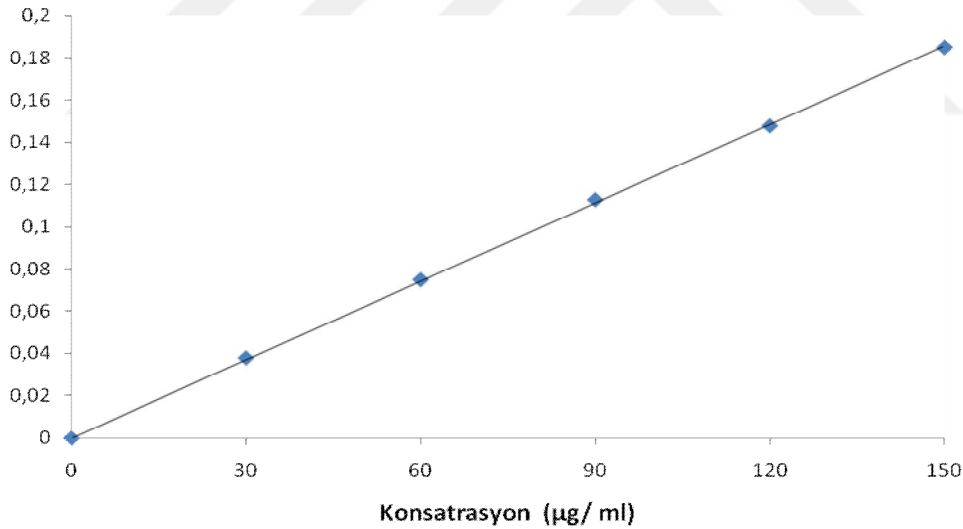
Stok standart için 0,3 g/dl bovin albumin hazırlanır. Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml 'ye serum fizyolojik ile tamamlandığında 150 µg/ml konsatrasyon

elde edilir. Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/ml' lik konsatrasyonlar elde edilerek 750 nm'de verdikleri absorpsiyonlar kaydedilir. Bu verilere göre konsatrasyon-absorpsiyon eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır (şekil 19) ⁴¹.

Tablo 3 . Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	Kör	1	2	3	4	5
Konsantrasyon (µg/ml)	0	30	60	90	120	150
Standart bovin albumin (ml)	-	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Serum fizyolojik (ml)	0.3	-	-	-	-	-
C Çözeltisi (ml)	3	3	3	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir						
D Çözeltisi (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir ve 750 nm'de köre karşı okunur.



Şekil 14: Protein standart eğrisi

Doku Örnek Çalışması

Böbrek dokularından hazırlanan süpernatantta protein tayinini yapmak için, süpernatant 1:50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılır ve protein tayini yapılır. Bunun için üç tüp alınır ve çözeltiler aşağıdaki şekilde tüplere konulur.

Tablo 4 : Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Serum fizyolojik	0.3	-	-
Standart	-	0.3	-
Süpernatant	-	-	0.3
C Çözeltisi	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir			
D Çözeltisi	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir ve 750 nm’de köre karşı okunur.

Hesaplanması

Doku örneğinin absorbansı standartın absorbansı ile karşılaştırılarak veya doğrudan standart eğrisinden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak sonuç verilir.

3.8. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini

Aerobik şartlarda pH 3.40’de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95 C°’de inkübasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA’nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 532 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirilir ⁴¹.

Ayırıcılar

1. SDS %8,1’lik

Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)

2. Asetik Asit %20’lik (pH 3,5)

3. Tiyobarbitürik Asit(TBA) %0.8 lik

4. N-Butanol/Piridin Çözeltisi (14/1)(v/v)

5. Stok Standart

1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk =0.99 g/ml)

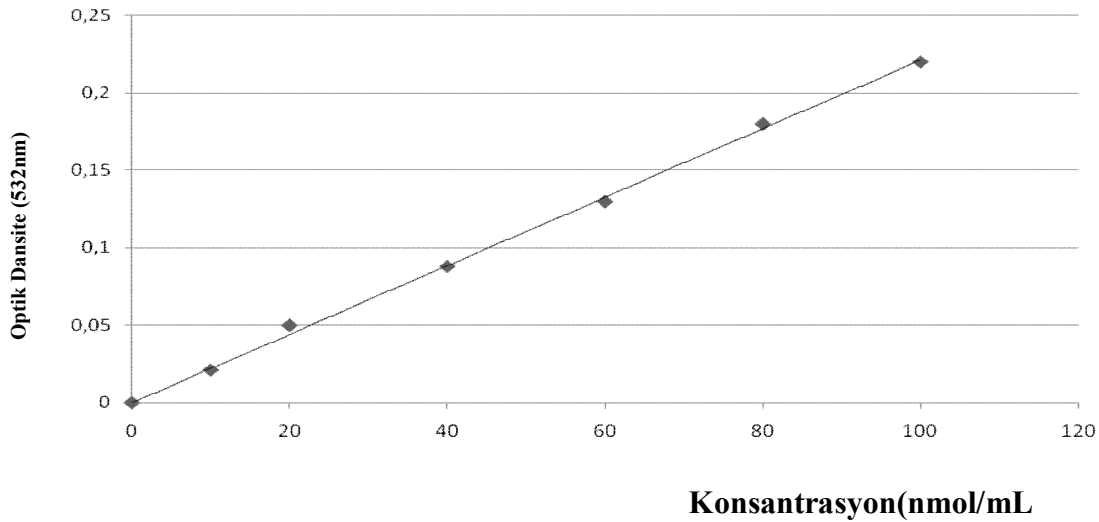
Standart Eğri Çizimi

Standart eğri çizimi yapılırken stok standarttan 6,6 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. Daha sonra 10,20,40,60,80 ve 100 nmol/ml konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. Ayraçlar tüplere aşağıda belirtildiği şekilde ilave edilirler.

Tablo 5: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/ml)	0	100	80	60	40	20	10
Standart(ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SDS (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Asetik Asit (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TBA(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf su (ml)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Vorteksle karıştırılır.60 dk 90 C°'de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.							
Saf su(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
N-Butanol/Piridin	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vorteksle karıştırılır.4000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilir.							

Tüpler N-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım (üst faz) alınarak 532 nm'de absorbans fotometrik olarak okunur ve standart eğri grafiği çizilir (Şekil 16).



Şekil 15 : MDA(Malondialdehit) standart eğrisi grafiği

Dokuda MDA düzeyinin tayini için örnek çalışması yapılırken de yukarıdaki tabloda verildiği gibi tüpler belirli hacimde hazırlanır, doku örneği alınır ve MDA tayini yapılır. Ayrıntılı bilgi tablo 7’de gösterilmiştir (Tablo 7).

Tablo 6: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Örnek	Standart	Kör
Homojenat(Örnek)	0.1 ml	-	-
Standart	-	0.1 ml	-
%8.1 SDS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
%20 Asetik Asit	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
%0.8 TBA (sulu)	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Saf su (ml)	0.7 ml	0.7 ml	0.8 ml
Vorteksle karıştırılır.60 dk 90 C°’de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.			
Saf su (ml)	1 ml	1 ml	1 ml
N-Butanol/Piridin (v:v 15/1 oranında)	5 ml	5 ml	5 ml

Tüpler N-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım(üst faz) alınarak 532 nm’de absorbans fotometrik olarak okunur. Sonuç standart eğrisinden değerlendirilir.

Hesaplanması

nmol/ml olarak ölçülen MDA düzeyi nmol/mg protein olarak verilmiştir.

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/mg protein)} = \frac{\text{MDA değeri (nmol/ml)}}{\text{protein (mg/ml)}}$$

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/gr doku)} = \frac{\text{MDA değeri (nmol/ml)} \times \text{süpernatant (hacim/ağırlık)}}{\text{doku ağırlığı (gr)}}$$

3.9. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-

[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (piyodinitrotetra zolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır, buaradaki farkın belirlenmesiyle de SOD aktivitesi ölçülür (46).

Ayrıraçlar

1. CAPS Tamponu(3-sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) (pH:10.2)

50.00 mM CAPS	1.1065 gr
0.94 mM EDTA	0,035 gr
Doymuş NaOH	11.1 µl
Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.	

2. Substrat Karışımı

0.05 mM Ksantin	0.00152 gr
INT	0.00253 gr

Bu karışım CAPS tamponuyla 100 ml'ye tamamlanır.

3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

50 Ü Ksantin oksidaz	3.04 µl
Saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.	

4. 0.01 MFosfat tamponu (pH:7 ayarlanır)

Na ₂ PO ₄	54.91 mg
NaH ₂ PO ₄	3.58 mg

Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

5. Standart (S6): 5,6 Ü/ml SOD içeren Ransod kitinin standardıdır.

Standart Eğri Çizimi

Liyofilize (hızlı dondurulmuş, mikroorganizma içermeyen, steril) olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla Tablo 8'deki gibi hazırlanır.2-8 °C 'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

Tablo 7: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	M Fosfat Tamponunun Hacmi	SOD derişimi (Ü/ml)
S5	6 ml S6	5 ml	2.8
S4	5 ml S5	5 ml	1.4
S3	5 ml S4	5 ml	0.7
S2	3 ml S3	5 ml	0.23

S1: Kör (fosfat tamponu)

Yöntem de; süperoksit dismutaz aktive tayini yapılırken, böbrek doku hücrelerinden hazırlanan süpernatantlar %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığı olacak şekilde 0.01 M fosfat tamponu ile 1:65 (640 mikrolitre tampon,10 mikrolitre örnek) oranında sulandırılır ve aktivite tayini yapılır.

Tablo 8: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı

	Kör (µl)	Standart(µl)
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır.		
Ksantin oksidaz	125	125

Ksantin oksidaz eklendikten sonra tekrar karıştırılır 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37 °C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbansları (A₁) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbansları (A₂) tekrar okunur.

Hesaplama

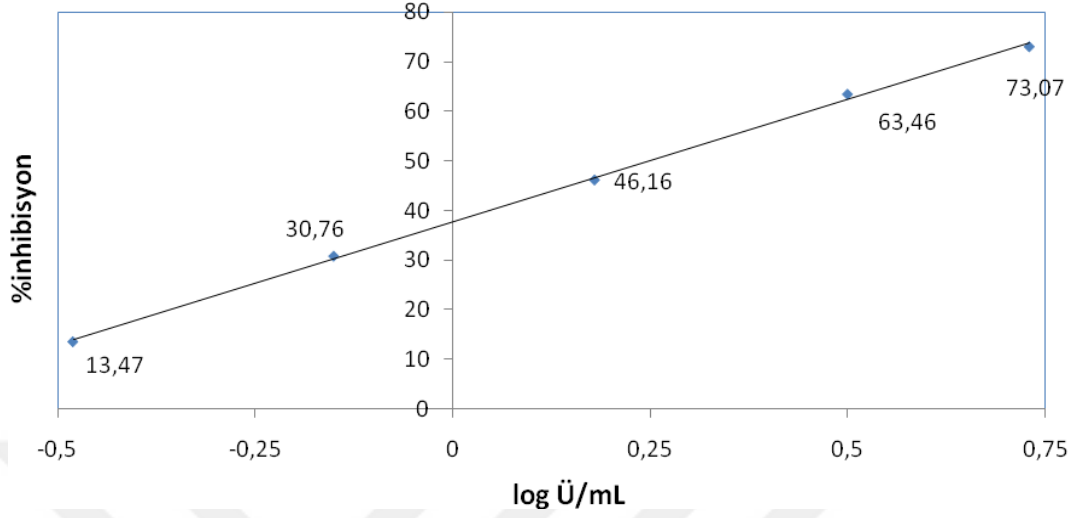
Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak hesaplama yapılır.

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak. standart} \times 100}{\Delta A \text{ çalışma körü}}$$

$$\Delta A \text{ çalışma körü}$$

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değeri yazılarak standart eğri elde edilir.



Şekil 16: SOD standart eğrisi

Örnek Çalışması

Tablo 9: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı

	Kör (µl)	Standart(µl)
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır.		
Ksantin oksidaz	125	125

Tüpler tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C’de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans(A₁) okunur. 3 dakika sonra absorbans (A₂) tekrar okunur.

Hesaplama:

$$\Delta A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dak. standart} \times 100}{\Delta A \text{ çalışma körü}}$$

$$\Delta A \text{ çalışma körü}$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanılarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD aktivitesi Ü/mg protein birimi olarak verilmiştir.

$$\text{SOD spesifik aktivitesi}(\ddot{U}/\text{mg protein}) = \frac{\text{SOD aktivitesi}(\ddot{U}/\text{ml})}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.10. Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) Aktivite Tayini

Glutasyon peroksidaz aktivitesi süpernatantta Beutler yöntemiyle saptanmıştır¹⁰⁷. Aşağıda verilen reaktifler tabloda (Tablo 11) gösterilen oranlarda tüplere konulur ve tüpler 37°C 'de 10 dakika inkibasyona bırakılır¹⁰⁷.

Kullanılan Reaktifler

1. 1M Tris-HCl (8.8 gr), 5 mM EDTA Tamponu (0.1861gr) (pH:8)
2. 0.1 M GSH (glutasyon) 1,537 gr - 50 ml distile suda
3. 10 Ü/ml GR (glütasyon redüktaz) (günlük hazırlanır) 50µl -1ml distile suda
4. 2mM NADPH (nikodinamid adenin dinükleotit fosfat) 0.1666 gr 100 ml'ye tamamlanır.
5. 7mM t-butil hidroperoksit (günlük hazırlanır)

Tablo 10: Doku örneğinde GSH-Px tayini için deney tüplerinin hazırlanışı

Reaktifler	Örnek(ml)
1M Tris-EDTA	0,1 (100 µl)
Glutasyon	0,02 (20 µl)
Glutasyon redüktaz	0,1
NADPH	0,1
Örnek (homojenat veya hemolizat)	0,01 (10 µl)
Distile su	0,66 (660 µl)
37°C' de 10 dakika inkübasyon yapılır.	
t-bütildidroperoksit	0,01
Kinetik olarak 340 nm'de 2,5 dakika, optik dansite'deki azalış kaydedilir.	

İnkübasyon sonrası örnekler 1cm kuvars küvete konur üzerine 10 µl 7 mM t-bütildidroperoksit konulduktan sonra okuma başlatılır. Bu tepkime, 37 °C'de enzim tarafından oksitlenen 1 µmol NADPH' in 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde optik dansitedeki azalışı kinetik olarak 2,5 dakika süreyle okunur(17).

Hesaplama

$$\text{GSH-Px Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{6.22 \times V_H (0,01 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi (O.D farkı)

V_H : Örnek hacmi

V_T : Toplam hacmi

6,22 : 2mM NADPH yıkım hızının verdiği OD değeridir.

Ü/ml biriminden ölçülen GSH-Px aktivitesi örnekte saptanan protein değerine bölünerek enzim spesifik aktivite sonucu Ü/mg protein biriminden verilir.

$$\text{GSH-Px Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{GSH-Px Değeri (Ü/mg)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.11. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Katalaz, H_2O_2 'nin yıkımını katalize eder. H_2O_2 'nin CAT tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir (47).

Ayıracılar

1. 1M Tris-HCl, 5mM Na_2 EDTA tamponu, pH 8.0

Tris-Baz	5.358 gr
Tris-HCl	8,787 gr
Na_2 EDTA	0.1461 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. 1 M Fosfat tamponu, pH 7.0

K_2HPO_4	6.723 gr
KH_2PO_4	8.344 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3. 10 mM H_2O_2

%30' luk peroksitten 10 µl alınır ve 9.990 µl saf suyla tamamlanır.

4. Etanol (%95'lik)

Yöntem

Katalaz aktivite tayini için, doku süpernatanı 1:50 oranında saf su ile sulandırılır ve 1 ml'sine 20 µl saf etanol ilave edilir, karıştırılır ve aktivite tayini yapana kadar tüplerin ağzı kapalı bekletilir. Deneye başlamadan önce, günlük olarak hazırlanan 10

mM H₂O₂ konsatrasyonunun doğru ayarlanıp ayarlanmadığı fosfat tamponu ile kontrol edilir. Bunun için fosfat tamponu 1:10 oranında saf su ile sulandırılabilir. Ayarlanma yapılırken 1ml'lik küvete 900 µl saf su 100 µl fosfat tamponu koyulur karıştırılır ve bu karışımın 900 µl' 230 nm'de fotometrik olarak okunur OD₁ olarak kaydedilir. Daha sonra aynı küvete hazırladığımız 10 mM 'lık peroksitten (H₂O₂) 100 µl koyulur ve tekrar okuma yapılır absorbans değeri OD₂ olarak kaydedilir. OD₂-OD₁= 0.071 olmalıdır. Bu değer bulunduktan sonra hazırlanan peroksidin konsatrasyonu tam 10 mM'dır denilir ve deneye aşağıda gösterildiği gibi başlanır.

Tablo 11: Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
1M Tris-HCl, 5mM Na ₂ EDTA tamponu,pH 8.0	50	50
10 mM H ₂ O ₂	-	900
Saf su	930	30
37 °C'de 10 dakika inkübe edilir.		
Örnek (sulandırılmış)	20	20

Tüpler 37 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra daha önce 1:50 oranında dilüe ettiğimiz örnekten 20 µl alınarak tüplere ilave edilir ve 230 nm'de 2,5 dakika kinetik okuma yapılır. Her numune teker teker çalışılarak kaydedilir(34).

Hesaplama

$$\text{CAT Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{0.071 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD: Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H: Örnek hacmi

V_T: Toplam hacim

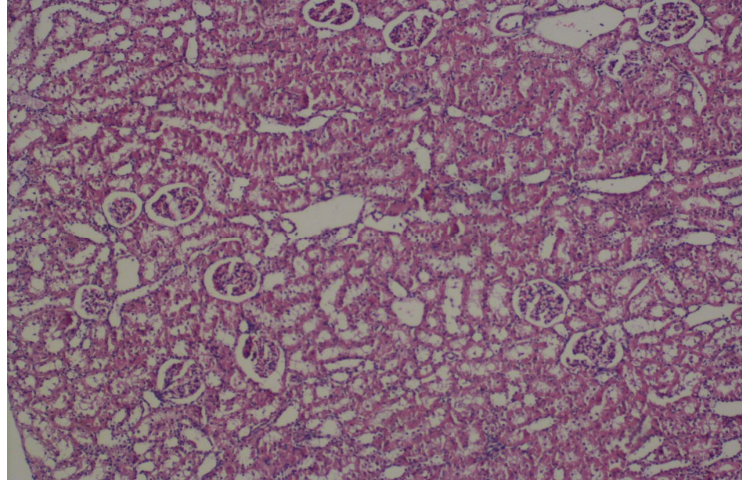
0.071: 10mM H₂O₂ yıkım hızının verdiği OD değeridir.

Ü/ml biriminden ölçülen CAT aktivitesi örnekte saptanan protein değerine bölünerek dokudaki enzim spesifik aktivite sonucu Ü/mg protein biriminden verilir.

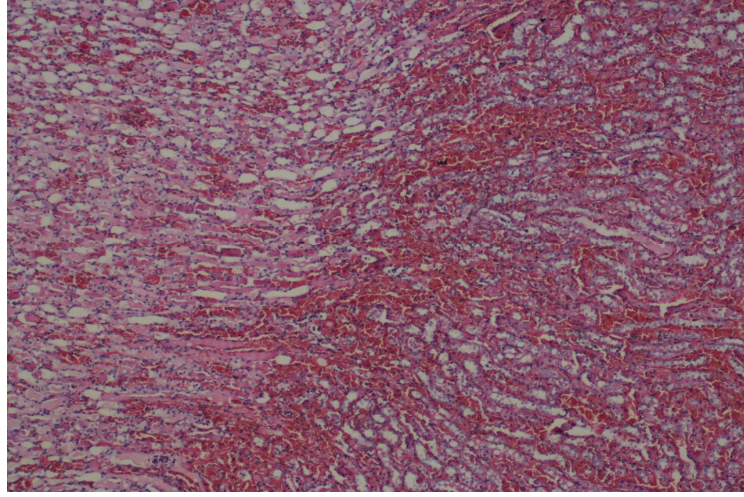
$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{CAT Değeri (Ü/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.12. Histopatolojik Değerlendirme

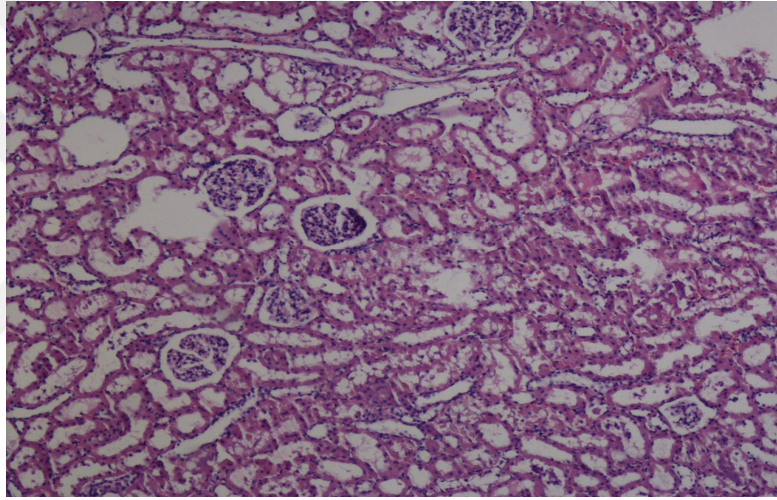
Histopatolojik inceleme için, dokular % 10' luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Örneklerin tümü doku takip cihazında rutin takibe alınarak parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom ile her doku örneği için 5 µm'lik seri kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Çalışma, aynı patolog tarafından hangi doku örneğinin hangi gruba dahil olduğunu bilmeden ve doku örnekleri içinden rastgele seçim yapılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile histopatolojik incelemeye tabi tutuldu. Gruplar; konjesyon, nekroz, kanama alanları, fırçamsı kenar kayıplarına göre değerlendirildi. Birinci grup yani Sham grubunda normal görünümde yani konjesyon olan böbrek dokusunda, sadece İ/R uygulanan kontrol grubunda ağır nekroz, çok fazla kanama alanları ve fırçamsı kenar kayıpları vardı, alıç uygulanan üçüncü grupta normale yakın görüntü yani konjesyon hali mevcuttu. En çok hasar gerilemesi bu gruptaydı, kenar kayıplarında gerileme çok azdı. Goji Berry uygulanan dördüncü grup ve kombine grup olan beşinci grupta da yine çok hafif kanama alanları ,konjesyona yakın görünüm ve kayıpta gerileme söz konusuydu.



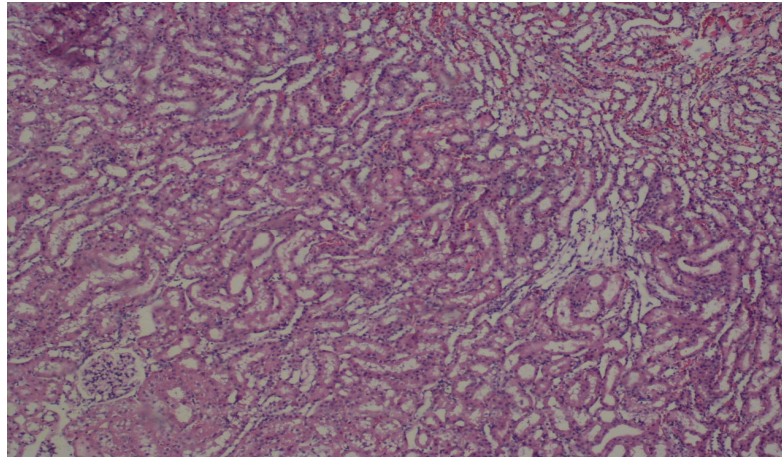
Resim 6: Sham grubunda sağlan böbrek görünümü, konjesyon



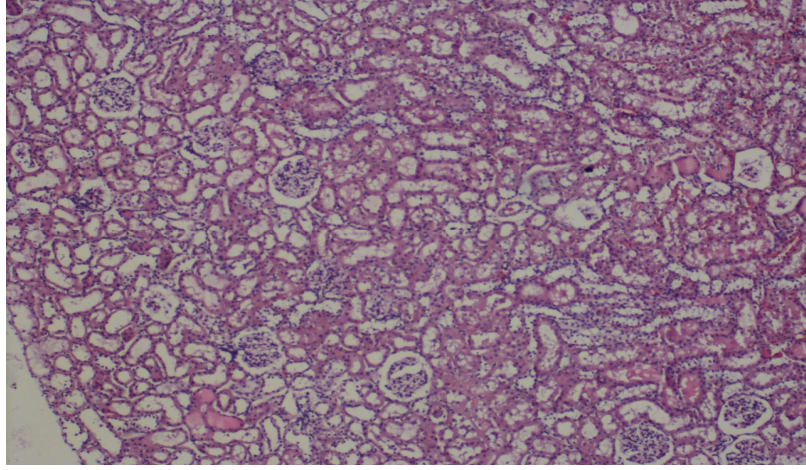
Resim 7: Kontrol grubu sadece I/R uygulanan bu grupta; nekroz, çok fazla kanama alanları ve ağır fırçasmsı kenar kayıpları mevcut



Resim 8: Alıç verilen üçüncü grupta sham grubuna yakın bir görünüm, konjesyon, fırçasmsı kenar kaybında çok büyük gerileme



Reim 9: Goji Berry verilen dördüncü grupta, üçüncü grup kadar olmasa da konjesyon, hafif kanama alanları, fırçasmsı kenar kaybında gerileme



Resim 10: Kombine grup da, dördüncü grup ile benzer görünümde

3.13. İstatistik

İstatiksel analizin yapılmasında SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 kullanıldı. Sonuçlarımız ortalama \pm standart sapma şeklinde verildi. Biyokimyasal verilerimizin değerlendirilmesinde ise gruplar arasındaki farkların incelenmesi için Non Parametrik Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Her iki test içinde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Böbrek Dokusundaki MDA Düzeyleri

Tablo 12: Gruplar arası MDA bulguları

	n	MDA (nmol/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	8	0,465±0,108	0,31-0,67
GRUP 2 (KONTROL)	8	1,649±0,343	1,20-2,13
GRUP 3 (ALIÇ)	8	0,452±0,290	0,29-0,68
GRUP 4 (GOJİ BERRY)	8	0,454±0,102	0,34-0,67
GRUP 5 (ALIÇ&GOJİ BERRY)	8	0,530±0,1385	0,36-0,81

Gruplar arasındaki MDA düzeyleri kıyaslandığında;

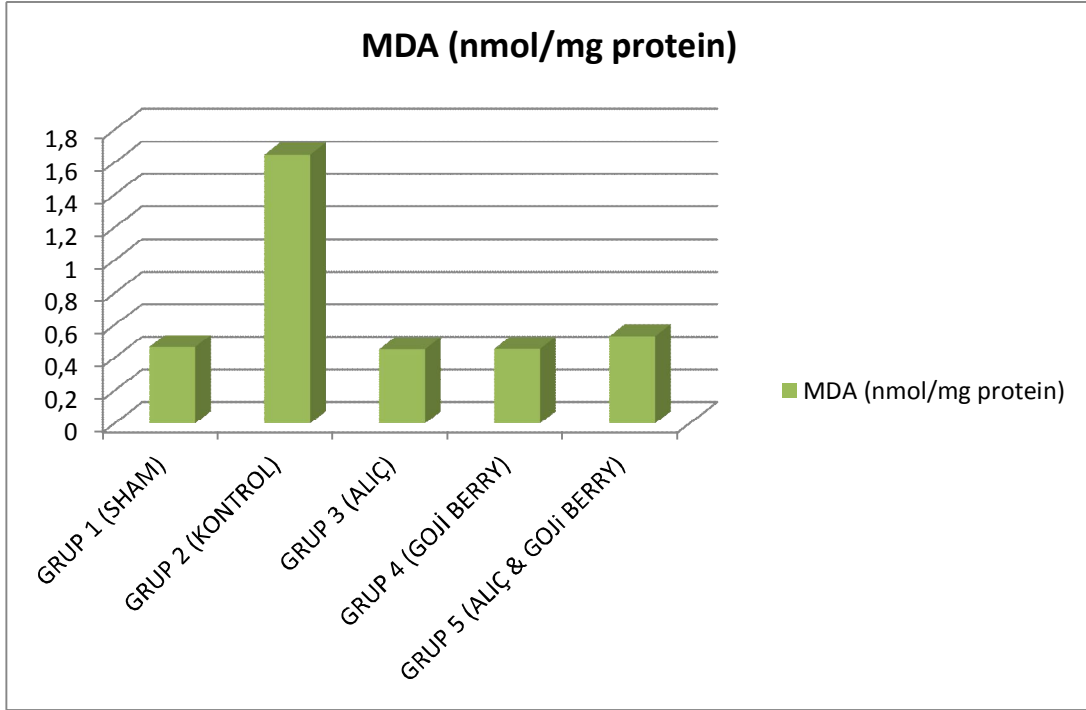
Grup 2 MDA düzeyi, Grup 1 e göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.(p=0,001)(p<0,05)

Grup 1 MDA düzeyi ile, Grup 3 MDA düzeyi (p=0,674), Grup 4 MDA düzeyi (p=0,600) ve Grup 5 MDA düzeyleri (p=0,294) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi.(p>0,05)

Grup 3 MDA düzeyi (p=0,001), Grup 4 MDA düzeyi (p=0,001), Grup 5 MDA düzeyi (p=0,001) , Grup 2 ye göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu.(p<0,05)

Grup 3 MDA düzeyi, Grup 4 MDA düzeyi (p=0,916) ve Grup 5 MDA düzeyi (p=0,401) ne göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.(p>0,05)

Grup 4 MDA düzeyi ile Grup 5 MDA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.(p>0,05)



Şekil 17: Gruplar arası MDA düzeyleri

4.2. Böbrek Dokusundaki SOD Aktiviteleri

Tablo 13: Gruplar arası SOD bulguları

	n	SOD (U/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	8	4,588±1,551	1,60-7,30
GRUP 2 (KONTROL)	8	2,175±0,910	1,00-3,70
GRUP 3 (ALIÇ)	8	4,813±1,834	2,50-8,80
GRUP 4 (GOJİ BERRY)	8	4,125±2,491	1,10-8,00
GRUP 5 (ALIÇ&GOJİ BERRY)	8	3,387±1,557	1,50-6,00

Gruplar arasındaki SOD aktiviteleri kıyaslandığında;

Grup 2 SOD aktiviteleri, Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. ($p=0,006$) ($p<0,05$)

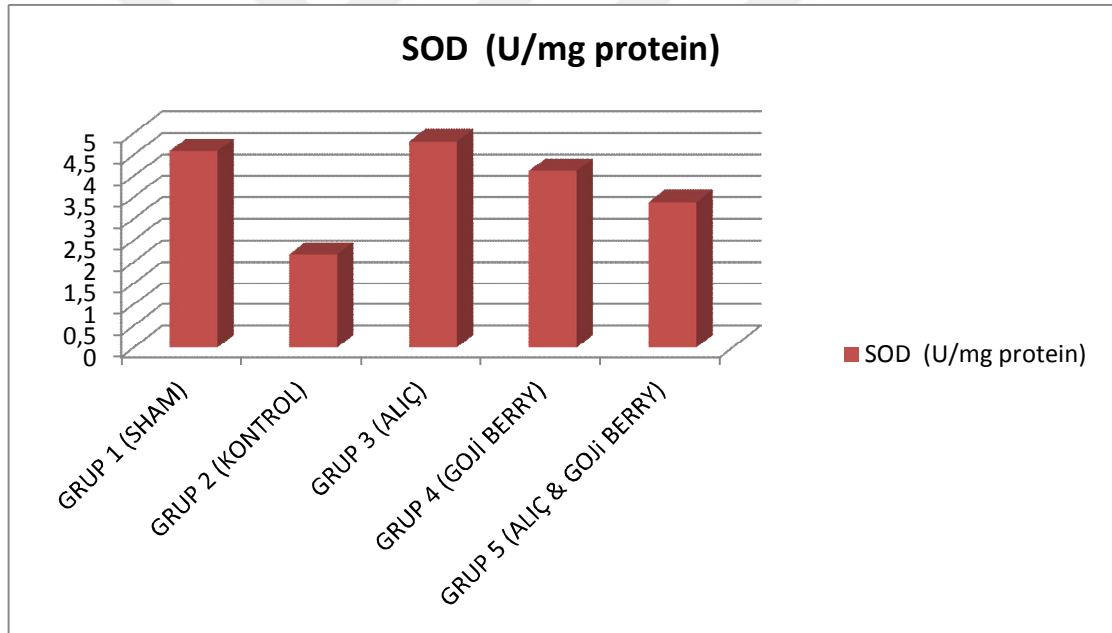
Grup 3 SOD aktivitesi ($p=0,752$), Grup 4 SOD aktivitesi ($p=0,493$) ve Grup 5 SOD aktivitesi ($p=0,140$), Grup 1 SOD aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ($p>0,05$)

Grup 3 SOD aktivitesi, Grup 2 SOD aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulundu. ($p=0,003$) ($p<0,05$)

Grup 4 SOD aktivitesi ($p=0,082$) ve Grup 5 SOD aktivitesi ($p=0,102$), Grup 2 SOD aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ($p>0,05$)

Grup 3 SOD aktivitesine göre; Grup 4 SOD aktivitesine, ($p=0,462$) ve Grup 5 SOD aktivitesi, ($p=0,115$) 'nde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. ($p>0,05$)

Grup 4 SOD aktivitesi, ile Grup 5 SOD aktivitesi, arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ($p>0,05$)



Şekil 18: Gruplar arası SOD Aktivitesi

4.3. Böbrek Dokusundaki GSH-Px Aktiviteleri

Tablo 14: Gruplar arası GSH-Px bulguları

	n	GSH-Px (U/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	8	0,300±0,005	0,21-0,36
GRUP 2 (KONTROL)	8	0,120±0,003	0,09-0,17
GRUP 3 (ALIÇ)	8	0,330±0,008	0,20-0,47
GRUP 4 (GOJİ BERRY)	8	0,445±0,008	0,35-0,55
GRUP 5 (ALIÇ&GOJİ BERRY)	8	0,246±0,007	0,14-0,33

Gruplar arasındaki GSH-Px aktiviteleri kıyaslandığında;

Grup 2 GSH-Px aktiviteleri, Grup 1 ' e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı.(p=0,001)(p<0,05)

Grup 3 GSH-Px aktiviteleri (p=0.430) ve Grup 5 GSH-Px düzeyi p=0,154) ,Grup 1 ' e göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.(p>0,05)

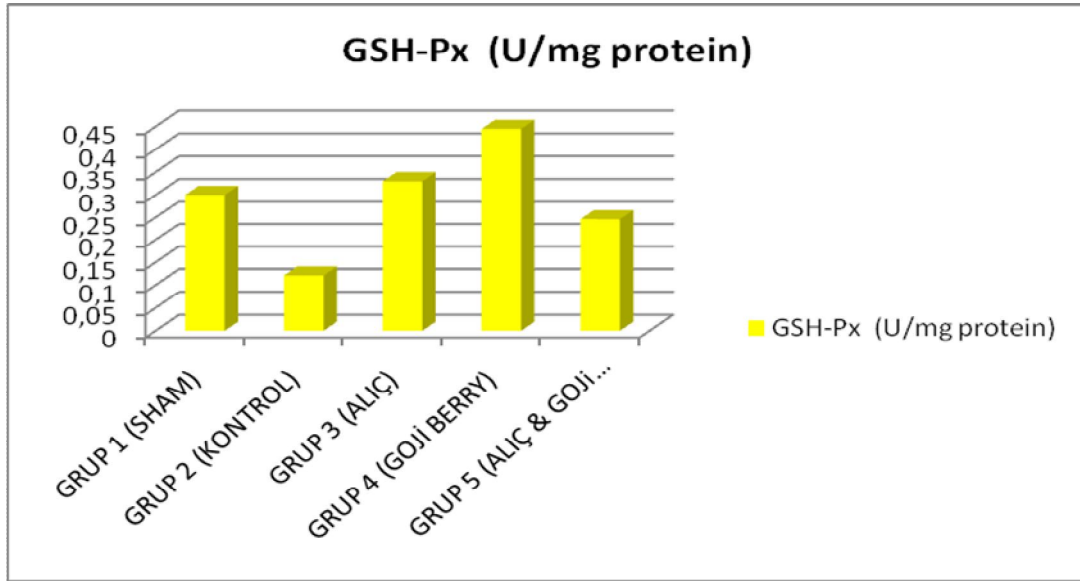
Grup 4 GSH-Px aktiviteleri, Grup 1 GSH-Px aktiviteleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.(p=0,001)(p<0,05)

Grup 3 GSH-Px aktiviteleri (p=0,001), Grup 4 GSH-Px aktiviteleri (p=0,001) ve Grup 5 GSH-Px aktiviteleri (p=0,002) ,Grup 2 GSH-Px aktivitelerine göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu.(p<0,05)

Grup 3 GSH-Px aktiviteleri ile Grup 4 GSH-Px aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.(p=0,023)(p<0,05)

Grup 3 GSH-Px aktiviteleri ile Grup 5 GSH-Px aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.(p=0,066)(p>0,05)

Grup 4 GSH-Px aktiviteleri ile Grup 5 GSH-Px aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.(p=0,001)(p<0,05)



Şekil 19: Gruplar arası GSH-Px aktiviteleri

4.4. Böbrek Dokusundaki CAT Aktiviteleri

Tablo 15: Gruplar arası CAT bulguları

	n	CAT (U/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (SHAM)	8	0,300±0,005	0,21-0,36
GRUP 2 (KONTROL)	8	0,120±0,003	0,09-0,17
GRUP 3 (ALIÇ)	8	0,330±0,008	0,20-0,47
GRUP 4 (GOJİ BERRY)	8	0,445±0,008	0,35-0,55
GRUP 5 (ALIÇ&GOJİ BERRY)	8	0,246±0,007	0,14-0,33

Gruplar arasındaki CAT d aktiviteleri kıyaslandığında;

Grup 2 CAT aktiviteleri, Grup 1 CAT aktivitelerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı.(p=0,001)(p<0,05)

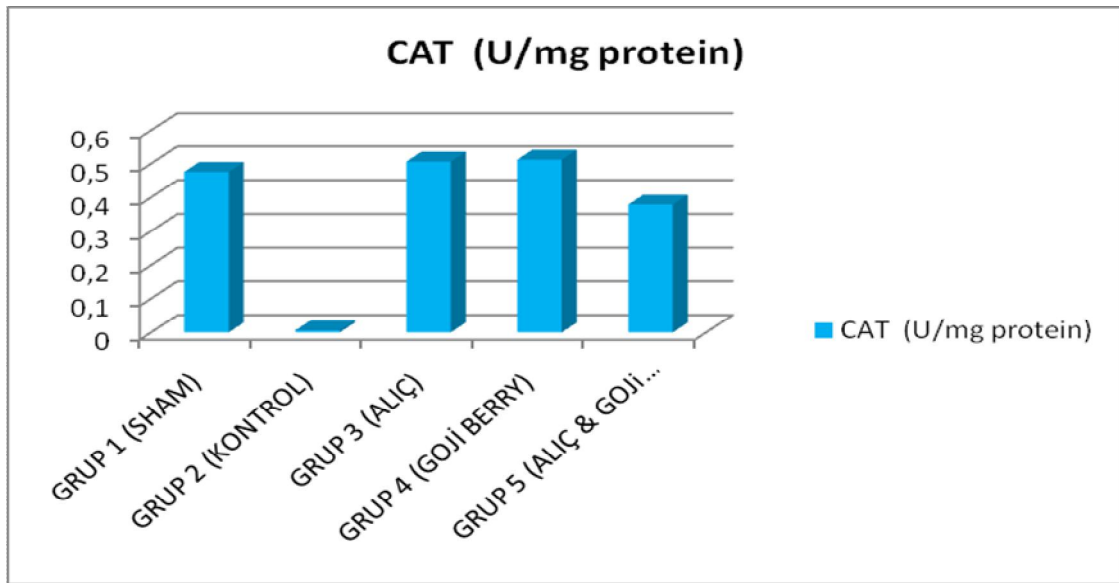
Grup 3 CAT aktiviteleri (p= 0,674), Grup 4 CAT aktiviteleri (p=0,713) ve Grup 5 CAT aktiviteleri (p=0,083), Grup 1 CAT aktivitelerine göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.(p>0,05)

Grup 3 CAT aktiviteleleri (p=0,001), Grup 4 CAT aktiviteleleri (p=0,001) ve Grup 5 CAT aktiviteleleri (p=0,001), Grup 1 CAT aktivitelelerine göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bir fark saptandı.(p<0,05)

Grup 3 CAT aktiviteleleri ile Grup 4 CAT aktiviteleleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.(p=0,875)(p>0,05)

Grup 3 CAT aktiviteleleri ile Grup 5 CAT aktiviteleleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.(p=0,046)(p<0,05)

Grup 4 CAT aktiviteleleri ile Grup 5 CAT aktiviteleleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.(p=0,040)(p<0,05)



Şekil 20: Gruplar arası CAT aktiviteleleri

4.5. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik inceleme için, dokular % 10' luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Örneklerin tümü doku takip cihazında rutin takibe alınarak parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom ile her doku örneği için 5 µm'lik seri kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Çalışma, aynı patolog tarafından hangi doku örneğinin hangi gruba dahil olduğunu bilmeden ve doku örnekleri içinden rastgele seçim yapılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile histopatolojik incelemeye tabi tutuldu. Gruplar; konjesyon, nekroz, kanama alanları, fırçamsı kenar kayıplarına göre değerlendirildi. Birinci grup yani Sham grubunda normal görünümde yani konjesyon olan böbrek

dokusunda, sadece İ/R uygulanan kontrol grubunda ağır nekroz, çok fazla kanama alanları ve fırçamsı kenar kayıpları vardı, alıç uygulanan üçüncü grupta normale yakın görüntü yani konjesyon hali mevcuttu. En çok hasar gerilemesi bu gruptaydı, kenar kayıplarında gerileme çok azdı. Dördüncü grup ve kombine grup olan beşinci grupta da yine çok hafif kanama alanları, konjesyona yakın görünüm ve kayıpta gerileme söz konusuydu.



5. TARTIŞMA

İskemi, bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesi veya durmasıdır. Reperfüzyon ise iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır(66).Renal iskemisi; Böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler gibi klinik durumlarda görülür. İskemiden sonra gelişen akut böbrek yetmezliği, glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz ve böbrek damarlarında direnç artışı meydana gelebilmektedir(21). İskemik dokuda kan akımının yeniden başlamasıyla, özellikle dokuya gelip yerleşen PMNL tarafından salınan SOR dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. İ/R hasarı bir çok patofizyolojik süreci içeren karmaşık bir dizidir. Çeşitli çalışmalar SOR'un İ/R hasarında lipit peroksidasyonunu başlatarak hasar oluşumunda önemli rolü olduğunu ortaya koymuştur(50).Ayrıca SOR canlı yapıdaki biyomoleküllerle reaksiyona girerek dokudaki hasarı artırır.(40) Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda; Enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalarla SOR'ların etkilerini ortadan kaldıran maddelerin etkinlikleri deneysel ve klinik olarak gösterilmiştir. 1980'li yıllardan beri oksidatif doku hasarının göstergesi olarak, serum ve doku MDA değerlerine bakılmakta olduğunu belirten Singh ve Chopra ratlarda yaptıkları renal İ/R'de renal oksidatif doku hasarının göstergesi olarak doku MDA düzeylerini ölçmüşlerdir. Bu çalışmada da doku hasarının göstergesi olarak renal doku MDA değerlerine bakılmış ve İ/R grubunda MDA değerlerinin diğer gruplara oranla belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (31).

SOR oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "Antioksidan savunma sistemleri" olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya SOR toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler (7).Tüm organizmalarda savunma mekanizmasında etkili olan antioksidan enzimlere; SOD, CAT, GSH-Px ve kimyasal bileşiklere; α -tokoferol, askorbik asit, karatenoid örnek verilebilir. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olan enzimatik antioksidanlardır (19). SOD, CAT, GSH-Px çok önemli antioksidan savunma mekanizmalarıdır. Bu enzimler düzenli hücre metabolizmasının kontrolünde oldukça önemlidir (47). Enzimatik antioksidanlar

kadar olmasa da bitkisel kaynaklı antioksidanlarında oksidatif hasara karşı koruyucu etkili olduğu bilinmektedir (35).

Günümüzde yapılan birçok çalışma, kalp, karaciğer, beyin, barsak ve böbreklerde İ/R hasarının bazı antioksidanlar ile belli ölçülerde önlenebildiğini göstermektedir(51).Hipoksiye bağlı böbrek hasarlarının patogeneğinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerin rolünün belirlenmesi antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir (52). Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksidasyonun neden olduğu zararları hücre bazda engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır(50). Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir (3,4). SOD süperoksit radikalini H_2O_2 ' ye katalizler. H_2O_2 ise CAT ve GSH-Px tarafından moleküler oksijen ve suya indirgenir. GSH-Px, glutatyon redüktaz aracılığı ile oluşan glutatyonu okside forma dönüştürür. Bundan dolayı bu enzimlerin konsantrasyonlarının ölçümü bize iskemi sonrasında oluşan serbest oksijen radikali hakkında bilgi verir (41,59). Bu araştırmada oluşan oksidan hasarın derecesini belirlemek ve verilen maddelerin hasarı önlemede ki başarısını görebilmek için MDA, SOD, GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri çalışıldı. Hücre içinde oluşan serbest radikal hasarına karşı enzimatik ve non-enzimatik savunma mekanizmaları mevcuttur. A,C ve E vitaminleri, ürik asit, glutatyon nonenzimatik savunma mekanizmaları arasında önemli yer tutarken, SOD, GSH-Px ve CAT enzimleri de hücre içinde görev yapan enzimatik savunma sistemleri yani radikal süpürücü enzimlerdir. Bunlar SOR'nin oluşturduğu oksidatif hasarı önlerler.

Serbest radikal oluşum hızı bu radikalleri etkisizleştirme hızı ile aynı olduğu sürece oluşan radikallerden, organizma etkilenmemektedir. Buna karşılık antioksidan savunma azalır ya da zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulmakta ve SOR'lerine bağlı olarak zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır. Antioksidan ajanlar birlikte kullanıldığında da birbirlerinin etkilerini olumlu yönde artırarak daha güçlü bir koruma sağlayabilir, ortaya çıkabilecek yan etkilerde de azalma meydana getirebilirler (41).

İlk defa yapılan bu çalışmada, renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı, Goji berry ve Alıç 'ın biyokimyasal etkilerinin araştırılması amaçlandı. Literatür

taramalarımızda, Goji berry ve Alıç 'ın Böbrekte İskemi Reperfüzyon Hasarını önlemedeki etkilerinin ne olduğunun ortaya konulduğu herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda renal iskemi tedavi aşamasında bir değişiklik olabileceği ve bundan sonraki çalışmalara kaynak teşkil edileceği düşünüldü.

Alıç meyvesi flavonoid bileşikler açısından oldukça zengin olup bu yönüyle bitkiye çok güçlü antioksidan özellikler verir. kalp-damar sistemi üzerinde pozitif etkiler gösteren bileşikler (triterpenoid saponinler, aminler ve flavonoidler) içerir. Alıç serbest radikal oluşumunu engelleyerek kalbin damar sistemini olumlu yönde etkilemektedir. Araştırmacılar, bu bitkinin kalp ve beyine kan akışını ve kalbin kasılma gücünü artırdığını, kalbi düzensiz atışlara (kalp ritm bozukluğu) karşı koruduğunu, damar açıcı etkiye sahip olduğunu ve kan basıncını dengelediğini göstermişlerdir (12). Bizde bu özellikleri neticesinde çalışmamızda Alıç kullandık.

Geleneksel Çin tıbbında bitkisel ilaç olarak kullanılan Goji Berry, yüksek besin değeri ve antioksidan içeriği ile son birkaç yıldır çok popüler hale gelmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, antioksidan etkisi dışında yorgunluk giderici, anti-aging, pro-apoptotik, anti-tümör, immünomodülasyon, kan şekeri ve serum lipidlerini düşürücü etkilere de sahip olduğunu göstermektedir(64).

Yapılan bir çalışmada yüksek yağ diyeti ile beslenen farelerde oluşan oksidatif hasar üzerine goji berry'nin etkisini araştırmışlardır. Diyetlerine gji berry eklenen farelerde doza bağımlı olarak doku ve kan SOD, GSH-Px, CAT, TAOC ve GSH düzeylerinde artma, MDA ve NO düzeylerinde ise azalma bulunmuştur(1,6).

Bulgularımız daha önce farklı antioksidanlarla yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir(9,15). İlk defa yapılan bu çalışmada Alıç ve Goji Berry'nin farklı doz, verilme zamanı ve verilme sürelerinde; deneysel böbrek yetmezliği modelinde koruyucu rol oynadığı bizim çalışmada ortaya çıkarılmıştır(16,24).

Çalışmamızda Alıç ve Goji Berry uygulamasının MDA düzeyinde de azalmaya yol açtığı saptandı. Ayrıca GSH Px düzeyinin ise arttığı ve histopatolojik olarak nekroz ve kast bulgularının azaldığı gözlemlendi. Alıç ve Goji Berry verilerek farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri uygulanan çalışmalarda (1,8,9), SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri üzerinde etkisinin daha önce incelenmediğini saptadık ve bilgilerimize göre ilk defa bu çalışmamızda böbrek İ/R hasarında Alıç ve Goji Berry'nin antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırıldı (15,16,25).

Çalışmamızda histopatolojik olarak İ/R grubunda artan nekrozun Alıç ve Goji Berry'nin uygulaması ile azaldığı görüldü. Bu bulgularımız daha önce deneysel böbrek

yetmezliği modellerinde görülen, NAC'ın iyileştirici etkisiyle benzerlik göstermektedir (8, 11).Farklı iskemi ve reperfüzyon sürelerinde Alıç ve Goji Berry'nin dozu, verilif yolu, verilme zamanı ve verilme sürelerinde yapılacak düzenlemeler ile daha kapsamlı çalışmalar yapılarak, antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkisinin ayrıntılı olarak araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz(14,16).

Uyguladığımız deney prosedüründe Alıç ve Goji Berry'nin lipit peroksidasyonunun bir indikatörü olan MDA düzeyini ve böbrek doku hasarını azaltması, antioksidan enzim düzeylerini arttırması bu modelde Alıç ve Goji Berry'nin yararlı etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir. Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular; böbrek İ/R hasarında oksidatif stresin önemli rol oynadığı ve buna karşı Alıç ve Goji Berry'nin uygulamasının bu hasara karşı yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sham ve kontrol grubu arasında tüm parametreler yönünden anlamlı farklılıklar saptandı.($p<0,05$)

Sham ve alıç grubu arasında tüm parametreler yönünden anlamlı farklılıklar yoktu.($p>0,05$)

Sham ve gojiberry grubu arasında gpx hariç diğer parametreler yönünden anlamlı farklılıklar yoktu. .($p>0,05$)

Sham ve alıç+ gojiberry grubu arasında tüm parametreler yönünden anlamlı farklılıklar yoktu. .($p>0,05$)

Kontrol grubu ile alıç grubu arasında tüm parametreler yönünden anlamlı farklılıklar saptandı.($p<0,05$)

Kontrol grubu ile gojiberry grubu arasında SOD hariç diğer tüm parametreler yönünden anlamlı farklılıklar saptandı.($p<0,05$)

Kontrol grubu ile alıç+gojiberry grubu arasında SOD hariç diğer tüm parametreler yönünden anlamlı farklılıklar saptandı. ($p<0,05$)

Alıç grubu ile goji berry grubu arasında gpx hariç diğer parametreler yönünden fark yoktu.($p>0,05$)

Alıç grubu ile alıç+gojiberry grubu arasında CAT hariç diğer tüm parametreler yönünden fark yoktu. ($p>0,05$)

Goji Berry grubu ile alıç+gojiberry grubu arasında CAT ve GPX hariç diğer tüm parametreler yönünden fark yoktu. ($p>0,05$)

Uyguladığımız deney prosedüründe Alıç ve Goji Berry'nin lipit peroksidasyonunun bir indikatörü olan MDA düzeyini ve böbrek doku hasarını azaltması, antioksidan enzim düzeylerini arttırması bu modelde Alıç ve Goji Berry'nin yararlı etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir

Çalışmamızda histopatolojik olarak İ/R grubunda artan nekrozun Alıç ve Goji Berry uygulaması ile azaldığı görüldü. Biyokimyasal sonuçları desteklemektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular; böbrek İ/R hasarında oksidatif stresin önemli rol oynadığı ve buna karşı Alıç ve Goji Berry'nin uygulamasının bu hasara karşı yararlı olabileceğini düşündürmektedir

7. KAYNAKLAR

- 1) Özel Y. Ratlarda Karaciğer İskemi/Reperfüzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidin'in Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi, Uzmanlık Tezi, T.C.Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5.Genel Cerrahi Kliniği 2006, S. 23.
- 2) Kandilci H. B., Gümüsel, B., Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi 2005, S. 25, 35- 49.
- 3) Avatgil R.,Deneysel rat iskemi - reperfüzyon böbrek hasarında nitrik oksid' in rolü, Uzmanlık tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı 1997, S. 83 .
- 4) Basım S., Alt Ekstremitelerde İskemi-Reperfüzyon oluşturulan Ratlarda Ginkgo Biloba EGB 761 İncebarsak Anastomoz İyileşmesi Üzerine Etkisi, uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği 2005, S.50.
- 5) Karabiga M., Kiriş, İ., Yılmaz, N., Altuntaş, İ., Karahan, N., Okutan, H., Aprotininin Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Böbrek Hasarına Etkisi 2007, S. 16, 9-18.
- 6) Paller M. S., The Cell Biology of Reperfusion Injury in the Kidney, J Invest Med 1994, S. 42, 632–639.
- 7) Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı Konya: Mimoza Yayınları 1995:3-95.
- 8) Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. J Biochem 1984; 222:1-15.
- 9) Ren WY., Qiao, ZH., Wang, H.W., Zhu, L., and Zhang, L., “Flavonoids: promising anticancer agents”, Medicinal Research Reviews, 2003, 23:519–534.
- 10) Gao X.M., Z.M. Xu, Z.W. Li, Traditional Chinese Medicines, People's Health Publishing House, Beijing, 2000, 1832–1850.
- 11) Gan L. S.H. Zhang, Acta. Nutr. Sin 2003, 25-200.
- 12) Baytop T. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. I.U Eczacılık Fak. İstanbul 1984, 32, 92-98.
- 13) Moore KL: The abdomen: Clinically Oriented Anatomy. Üçüncü baskı. Satterfield TS(ed) Williams&Wilkins Baltimore 1992, S.127-242

- 14) Tisher CC: Structure and Function of Kidneys: Cecil Textbook of Medicine. Yirmibirinci baskı. Goldman L, Bennet JC (ed). WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 2000, S. 532-539.
- 15) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Urinary System: Basic Histology. Yedinci baskı. Appleton & Lange, Lebanon 1992, S.371-393.
- 16) Guyton AC, Hall JE: Urine Formation by the Kidneys:I. Glomerular Filtration, Renal Blood Flow, and Their Control:Textbook of Medical Physiology. Dokuzuncu baskı. WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 1996, S. 315-330.
- 17) Kimizuka K, Nakao A, Nalesnik MA, Demetris AJ, Uchiyama T, Ruppert K, FinkMP, Stolz DB, Murase N: Exogenous IL-6 Inhibits Acute Inflammatory Responses and Prevents Ischemia/Reperfusion Injury after Intestinal Transplantation. Am J Transplant 2004, 4: 482-494.
- 18) Schiller HJ, Andreoni KA, Bulkley GB: Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. Klin Wochenschr 1991, 69: 1083-1094.
- 19) Ozan E. Koyutürk L.Sapmaz T. Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Prostoglandin E1 (PGE) Kullanımının İncelenmesi: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim dalı. Fırat Tıp Dergisi 2004, 9(3):67-71.
- 20) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Temel Patoloji. Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul: Nobel ve Yüce Kitabevi, 1995:3-24.
- 21) Aydoğdu N., Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Fırat Tıp Dergisi 2005, 10(4):151-155.
- 22) İşlekel H, İşlekel S,Güner G.Biochemical mechanism tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. Part 1 Biochemical mechanism Norol Bil D 2000, 17:2.
- 23) Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in rat. J Clin Invest 1984, 74: 1156-1164.
- 24) Laurent B, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. Am J Physiol 1986, 251: F765-F776.
- 25) Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. Am J Med 2000, 109: 655-678.

- 26) Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. J Biochem 1984, 222:115.
- 27) Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. J Invest Med 1994, 42: 632-639.
- 28) Cotran R:Hücre Zedelenmesi Adaptasyon, Basic Pathology. Cotran R,Kumar V, Robbins S. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1994, 3-11.
- 29) Bulkley GB: Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. Br J Cancer 1987, 55: 66-73.
- 30) Rangan U, Bulkley GB: Prospects for treatment of free radicalmediated tissue injury. British Med Bulletin 1983 49: 700-718.
- 31) Uysal M. "Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar". Klinik Gelişim 1998, 11: 336–341.
- 32) Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. Am J Physiol 1988, 255:H1269-H1275.
- 33) Schrier RW, Arnold PE, Putten VJV, Burke TJ: Cellular calcium in ischemic acute renal failure: Role of calcium entry blockers. Kidney Int 32:313-321, 1987.
- 34) Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. J SurgRes 1996; 61: 469-472.
- 35) Prussin C. Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J Allergy Clin Immunol 2003;111(2 Suppl):S486-94. (İngilizce Vikipedi Mast hücresi makalesi kaynakçasından)
- 36) Erpek S. "Mast Hücreleri", İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2004,11: 109-120
- 37) Atlı Y. İntestinal iskemi Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Alfa Lipoik Asit Ve Quersetin'in Koruyucu etkilerinin Araştırılması Uzmanlık Tezi, K.Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı, 2009, 52: 251-259.
- 38) Cheeseman KH. Slater TF. An Introduction to radical biochemistry. Br. Med. Bull 1993; 49: 481–493.
- 39) Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo- Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. J Invest Surg 2009, 22: 46-55.
- 40) Horgan MJ, Ge M, Gu J et. al. Role of ICAM-1 in neutrophil mediated vascular injury after occlusion and reperfusion. Am J Physiol. 1991, 259: L315-L319.

- 41) Lefer DJ, Scalia R, Campbell B et. al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest.*1997, 4: 684-691.
- 42) Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *T4 Thromb Haemost.* 2007, 97: 738-747.
- 43) Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004, 70: 71-86.
- 44) Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004, 61: 481-497.
- 45) İkizler M, Erkasap, N, Dernek, S, Kural, T, Kaygısız, Z. Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment, *Anadolu Kardiyol. Derg.* 2007, 7: 404- 10.
- 46) Şener G1, Yeğen B.Ç 2. ‘İskemi Reperfüzyon Hasarı’ Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakütesi Farmakoloji Anabilim Dalı1, İstanbul Marmara Üniversitesi Tıp Fakütesi Fizyoloji Anabilim Dalı2,Klinik Gelişim, İstanbul 2007, 38: 5-13.
- 47) Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 1991, 42: 125-138.
- 48) Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo- Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009, 22: 46-55.
- 49) Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993, 21: 1376-1386.
- 50) Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 1993, 16(4 Suppl 1): 119-26.
- 51) Kahraman A, Erkasap N, Köken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioksidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions, *Toxicology* 2003, 183:133-142.
- 52) Özer M K, Çiçek E, Gökalp O, Koyu A, Parlakpınar H, Acet A. Myokardiyal iskemi reperfüzyon sonrası böbrek hasarında nitrik oksit rolü vecaffeic acid phenethyl ester (cape)**in etkisi, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg* 2005, 12, 23-27.

- 53) Collard C.D. Gelman, S. : Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2006 94, 1133-1138.
- 54) Bensky D., & Gamble, A. (1993). Gou Qi Zi. Chinese Herbal Medicine, *Materia Medica* (pp. 333–334). (revised ed). Seattle, Washington: Eastland Press, Inc.
- 55) Bryan J. K., Costa, D., Giese, N., Nummy, K., Rapp, C., Seamon, E. et al. Goji (*Lycium spp*) in natural Standard monograph Natural Standard Inc.2008,12 :2-4.
- 56) Zhu Y. P. Gou Qi Zi. Chinese *Materia Medica Chemistry, Pharmacology and Applications* Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers 1998, pp. 642–646.
- 57) Tian M., & Wang, M. Studies on extraction, isolation and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* (China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy), 2006, 31(19), 1603–1607.
- 58) Duan H., Chen, Y., & Chen, G. Far infrared-assisted extraction followed by capillary electrophoresis for the determination of bioactive constituents in the leaves of *Lycium barbarum* Linn. *Journal of Chromatography A*, 2010, Jul 2, 1217 (27) , 4511–4516.
- 59) Amagase H., & Hsu, C. H. P. Meta-analysis of the general effects of a standardized *Lycium barbarum* fruit juice shown in randomized, double-blind, placebo-controlled human clinical studies. *FASEB Journal*, 2009, 23, 716.1.
- 60) Chang H. M., & But, P. P. H. Gouqizi. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*, vol. 2. 2001, (pp. 852–854) Singapore: World Scientific.
- 61) Potterat O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Medica*, 2010, 76(1), 7–19 Epub 2009 Oct 20.
- 62) Carden, D.L., Granger, D.N.: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J. Pathol.* 2000, 190, 255-66.
- 63) Birman H (2001) The effects of *Crataegus tanacetifolia* leaves extract on blood biochemistry, *Acta Pharmaceutica Turcica*, 43, 147-150.
- 64) Bors W, Heller W, Michel C, Saran M Flavonoid as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods in Enzimology*, 1990, 186, 343-355.
- 65) Chen ZY, Zhang ZS, Kwan KY, Zhu M, Ho WK, Huang Y Endotheliumdependent relaxation induced by hawthorn extract in rat mesenteric artery, *Life Sciences*, 1998, 63, 1983-91.

66) Montalvo-Jave, et al., 2008; Serracino, et al.,2001; Bilzer and Gerbes, 2000, 20: 12-18.



8. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: B6breğin anatomik yapısı.	4
Şekil 2 : Nefronun anatomik yapısı.....	5
Şekil 3: İskemik hasarda oluşan reaksiyonlar.....	7
Şekil 4: İskemi-reperfüzyon hasarının mekanizması.	10
Şekil 5: Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması.	10
Şekil 6: İskemi-reperfüzyon medelinde t6b6ler epitelde Ca ⁺² 'nin rol6 ve hasar oluşturucu mekanizmaları.	11
Şekil 7: İskemi s6recinde membran hasar6 15	15
Şekil 8: Serbest radikal oluşumu.....	17
Şekil 9: Molek6ler oksijenden serbest radikal oluşumu.....	17
Şekil 10. Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması.	23
Şekil 11: Lipid peroksidasyonu sonucu MDA oluşum.....	27
Şekil 12: İskemide glutasyon peroksidaz ve glutasyon red6ktazın rol6.	34
Şekil 13: Flavonoidlerin antioksidan etki mekanizmaları.	39
Şekil 14: Protein standart eğrisi 49	49
Şekil 15 : MDA(Malondialdehit) standart eğri grafiği.....	51
Şekil 16: SOD standart eğrisi.....	55
Şekil 17: Gruplar arası MDA d6zeyleri.....	63
Şekil 18: Gruplar arası SOD aktiviteleri 64	64
Şekil 19: Gruplar arası GSH-Px aktiviteleri 66	66
Şekil 20: Gruplar arası CAT aktiviteleri 67	67

9. TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Reaktif oksijen partikülleri	18
Tablo 2: Fagositlerin ürettiği bazı reaktif oksidan ürünler	25
Tablo 3 . Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	49
Tablo 4 : Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı.....	50
Tablo 5: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	51
Tablo 6: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	52
Tablo 7: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	54
Tablo 8: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı.....	54
Tablo 9: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı	55
Tablo 11:Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı	58
Tablo 10: Doku örneğinde GSH-Px aktivite tayini için deney tüplerinin hazırlanışı	56
Tablo 12: Gruplar arası MDA bulguları.....	62
Tablo 13: Gruplar arası SOD bulguları	63
Tablo 14: Gruplar arası GSH-Px bulguları.....	65
Tablo 15: Gruplar arası GSH-Px bulguları.....	66

10. RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. Alıç ağacı ve meyvesi	40
Resim 2: Goji Berry ağacı ve meyvesi	41
Resim 3: Sol renal artere klemp uygulanması ve iskemi başlangıç	47
Resim 4: İskemi sonrası 60.dk iskemik böbrek	47
Resim 5: Reperfüzyon sonrası sol böbreğin görünümü	47
Resim 6: Sham grubunda sağlam böbrek görünümü ,konjesyon.....	59
Resim 7: Kontrol grubu sadece İ/R uygulanan bu grupta nekroz, çok fazla kanama alanları ve ağır fırçamsı kenar kayıpları mevcut.....	60
Resim 8: Alıç verilen üçüncü grupta sham grubuna yakın bir görünüm,konjesyon, Fırçamsı kenar kaybında çok büyük gerileme	60
Reim 9: Goji Berry verilen dördüncü grupta,üçüncü grup kadar olmasa konjesyon,hafif kanama alanları ,fırçamsı kenar kaybında gerileme.....	60
Resim 10: Kombine grupta, dördüncü grupla benzer görünüm.....	61

11. EKLER

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Başlığı	Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Alıç(Cretaeagus) ve Goji Berry (Leyium Barbarum)'nin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması
	Başvuru Tarihi	31.07.2013
	Protokol No	31

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Dili
	Başvuru Formu	Türkçe

KARAR BİLGİLERİ	Oturum No: 2013/04	Karar No: 5	Tarih: 15.08.013
	Doç. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI **KSÜ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU YÖNERGESİ**

Unvanı /Adı/Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doç. Dr. Harun ÇIRALIK Başkan	Tıbbi Patoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	E √H	√E H	
Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN Üye	Tıbbi Biyokimya	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	E √H	√E H	
Doç. Dr. Yusuf ERGÜN Üye	Tıbbi Farmakoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	E √H	E √H	İZİNLİ
Doç. Dr. Mehmet BOŞNAK Üye	Fizyoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	E √H	√E H	
Yrd. Doç. Dr. Bülent ALTUNOLUK Üye	Üroloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	E √H	√E H	
Yrd. Doç. Dr. Ali Murat KALENDER Üye	Ortopedi ve Travmatoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	E √H	E √H	KATILMADI
Yrd. Doç. Dr. Akif Hakan KURT Üye	Tıbbi Farmakoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	E √H	√E H	
Erdal KÖRÜN Üye	Öğretmen	MEB	E √H	√E H	İZİNLİ
Fatih AKGÜL Üye	Eczacı Teknisyeni	Serbest	E √H	√E H	
ŞERH (VARSA)					

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda bulunma

12. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Safiye Şeyma TANER
Doğum Yeri : Merkez/ Kahramanmaraş
Doğum Yılı : 27.10.1988
Uyruğu : T.C.
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : safiyeseyma_taner@hotmail.com

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Lise : Atatürk Anadolu Lisesi / K.Maraş-Merkez
Lisans : Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Elazığ)
(2008-2012)
Pedagojik Formasyon : Fırat Üniversitesi Eğitim Fakültesi (2010-2012)
Yüksek Lisans : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2012-2016).

YAYINLAR

- 1-Ünsal V, Toroğlu S, Kurutaş EB, Taner SS, Atalay F, Bahar G. Dere otu, semiz otu ve roka'da antioksidan ve antimikrobiyal aktivite. S1, Kahramanmaraş 1. Biyokimya Günleri, 7– 9 Kasım 2013, Kahramanmaraş (Sözel Bildiri).
- 2-Hanife Bolat, Kamile Gul, Gulizar Sokmen, Murat Sahin, ErgulKurutas, Ayten Oguz, Abdullah Sokmen, Dilek Tuzun, Safiye Seyma Taner &Omer Faruk Akgul. The effect of oxidative stres to cardiovascular risk profile amongnon-functional adrenal incidentalomapatients. Endocrine Abstracts (2015) 37 EP49 | DOI:10.1530/endoabs.37.EP49
- 3-Gülay Bolat Döner, Safiye Şeyma Taner, İlter Demirhan, Mehmet Ali Öktem, Emrah Aksan, Gürkan Çıkım. Talasemi ve demir eksikliğinin ayırıcı tanısında eritrosit indekslerinin rolünün değerlendirilmesi. Türk Biyokimya Dergisi, 2016, 41 (1), Kahramanmaraş Talasemi Sempozyumu I, 7-9 Nisan 2016, Kahramanmaraş

4-Perihan Sümer, Ergül Belge Kurutaş, Erkan Öner, Fatih Yüzbaşıoğlu, Safiye Şeyma
Taner, Figen Doran. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında Alıç ve
Goji Berry'nin Etkileri. XV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 23 Nisan-26
Nisan 2015, Fethiye

