

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON  
HASARINDA 3',4'-DİHYDROXYFLAVONOL'UN LİPİD  
PEROKSİDASYONUNA ETKİSİ**

AYNUR KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. NEYHAN ERGENE

KONYA 2014

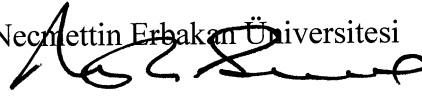
## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **AYNUR KOÇ**'un "**Sıçanlarda Deneysel Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında 3',4'-Dihydroxyflavonol'un Lipid Peroksidasyonuna Etkisi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.  
Konya/ 09.01.2014

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Neyhan Ergene

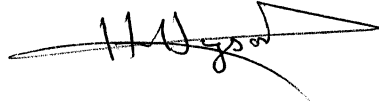
Necmettin Erbakan Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hüseyin Uysal

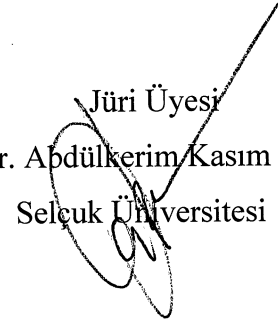
Necmettin Erbakan Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım Baltacı

Selçuk Üniversitesi



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun **09.01.2014** tarih ve **02/08** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neyhan Ergene

Enstitü Müdürü



## APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**The effects of 3’, 4’-Dihydroxyflavonol on lipid peroxydation in experimental renal ischemia-reperfusion injury in rat**” by “*Aynur Koç*” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “**Physiology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya-Turkey / 09.01.2014

Principal Advisor

Prof. Dr. Neyhan Ergene

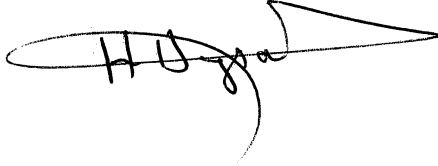
Necmettin Erbakan University



Examination Committee Member

Prof. Dr. Hüseyin Uysal

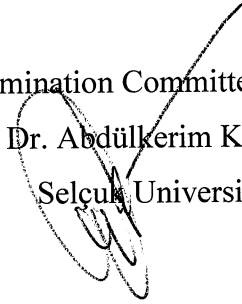
Necmettin Erbakan University



Examination Committee Member

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım Baltacı

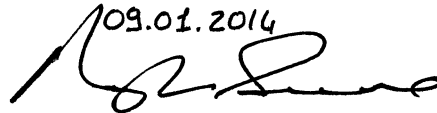
Selçuk University



This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Neyhan Ergene

Director of Institute of Health Sciences

09.01.2014  


## BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Bu çalışma 27.02.2013 tarihinde Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 2013-032 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

03.01.2014

Aynur Koç



## **ÖNSÖZ**

Yüksek lisans öğrenimim süresince ve bu çalışmada bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden danışman hocam Prof. Dr. Neyhan Ergene'ye anlayışı, sabrı ve bana verdiği emekleri için teşekkür ederim. Tez çalışmamın tasarlanmasından tamamlanmasına kadar her aşamada büyük destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Abdülkerim Kasım Baltacı ve Prof. Dr. Rasim Moğulkoç' a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman olduğu gibi bu çalışma sırasında da en büyük manevi desteğim olan aileme bir kez daha teşekkür ederim.

Bu tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından NEÜ-BAP-131318001 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i> .....	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i> .....	<i>ii</i>
<i>Approval</i> .....	<i>iii</i>
<i>Tez Beyan Sayfası</i> .....	<i>iv</i>
<i>Önsöz</i> .....	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i> .....	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i> .....	<i>vii</i>
<i>Tablolar Listesi</i> .....	<i>viii</i>
<i>Grafikler Listesi</i> .....	<i>ix</i>
<i>Özet</i> .....	<i>x</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xi</i>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>İskemi-Reperfüzyon</i> .....	3
2.1.1. <i>Sıcak İskemi-Reperfüzyon Modeli</i> .....	5
2.1.2. <i>Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı</i> .....	5
2.2. <i>Serbest Radikaller ve Oksidanlar</i> .....	8
2.2.1. <i>Serbest Radikal Etkileri</i> .....	11
2.3. <i>Oksidatif Stres</i> .....	13
2.4. <i>Lipid Peroksidasyonu</i> .....	14
2.4.1. <i>Malondialdehit</i> .....	15
2.5. <i>Antioksidan Mekanizmalar</i> .....	16
2.5.1. <i>Glutasyon</i> .....	17
2.6. <i>Flavonoidler</i> .....	18
2.6.1. <i>3',4'-Dihydroxyflavonol</i> .....	20
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>22</b>
3.1. <i>Deney Hayvanları</i> .....	22
3.2. <i>Dihydroxyflavonol Uygulaması</i> .....	23
3.3. <i>Kan ve Böbrek Dokusu Alınması</i> .....	24
3.4. <i>Kan ve Doku Analizleri</i> .....	24
3.4.1. <i>Doku Protein Tayini</i> .....	24
3.4.2. <i>Doku Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi</i> .....	24
3.4.3. <i>Doku Glutasyon Analizi</i> .....	25
3.4.4. <i>Plazma Malondialdehit Tayini</i> .....	25
3.4.5. <i>Eritrosit Glutasyon Tayini</i> .....	25
3.4.6. <i>İstatistik</i> .....	26
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>27</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>31</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>40</b>

## **Kısaltmalar ve Simgeler Listesi**

ABH	Akut böbrek hasarı
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
GSH	Glutatyon
GSSG	Glutatyon disülfid
HNE	Hidroksinonenal
I/R	İskemi-reperfüzyon
MDA	Malondialdehit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri

## **Tablolar Listesi**

Tablo 2.1. Reaktif oksijen turleri yarı omurleri

Tablo 3.1. Denev hayvanlarına verilen yemin bileşimi

Tablo 4.1. Çalışma gruplarının doku GSH ve MDA değerleri

Tablo 4.2. Çalışma gruplarının eritrosit GSH ve plazma MDA değerleri



## **Grafikler Listesi**

Grafik 4.1. Doku GSH değerleri

Grafik 4.2. Doku MDA değerleri

Grafik 4.3. Eritrosit GSH değerleri

Grafik 4.4. Plazma MDA değerleri

## ÖZET

Mevcut çalışmanın amacı sentetik bir flavanoid olan ve daha önceki çalışmalarda kalp ve beyin iskemisinde koruyucu etkilere sahip olduğu belirlenen 3',4'-dihydroxyflavonol'un (DiOHF) deneysel böbrek iskemi-reperfüzyonunda lipid peroksidasyonuna etkisini belirlemektir.

Mevcut çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen 200-250 g ağırlığında 56 adet Wistar-albino türü erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Deney grupları şu şekilde oluşturuldu:

1. Kontrol;
2. Sham;
3. İskemi;
4. İskemi+reperfüzyon;
5. İskemi+DiOHF;
6. İskemi+DiOHF+reperfüzyon.

Deney gruplarında uygulamaların bitiminde anestezi edilen hayvanlardan kardiyak punksiyon ile kan örnekleri ve böbrek dokuları gerekli analizler yapılmak üzere alındı. Doku ve kan örnekleri analiz yapılmaya kadar -80 °C'de tutuldu.

Çalışma gruplarının doku glutatyon (GSH) düzeylerinin Grup 5 ve 6' da en yüksek seviyede olduğu belirlendi ( $p<0.005$ ). Kontrol ve sham grupları olan 1. ve 2. gruplar ise en düşük doku GSH değerlerine sahipti. ( $p<0.005$ ).

En yüksek doku malondialdehit (MDA) düzeyinin iskemi grubunda (Grup 3) olduğu belirlendi ( $p<0.005$ ). İskemi-reperfüzyon grubunun (Grup 4) doku MDA değerleri Grup 3'den düşük ( $p<0.005$ ), diğer grupların tamamından yüksekti ( $p<0.005$ ).

Eritrosit GSH düzeyleri Grup 5 ve 6'da diğer grupların tamamından yüksekti ( $P<0.005$ ). Grup 1, 2, 3 ve 4' ün eritrosit GSH değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p<0.005$ ).

Plazma MDA değerleri incelendiğinde gruplararası en yüksek değerlere I/R uygulanan Grup 4' ün sahip olduğu bulundu. Grup 3' deki (renal iskemi) plazma MDA seviyesi ise Grup 4' den düşük ( $p<0.005$ ), diğer tüm gruplardan ise daha yüksekti ( $p<0.005$ ).

Çalışmanın sonuçları sıçanlarda böbrek iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında artan lipid peroksidasyonun periton içi DiOHF uygulamasıyla önlendiğini göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Böbrek iskemi-reperfüzyonu; 3',4'-Dihydroxyflavonol; sıçan

## **ABSTRACT**

### **The Effects of 3', 4'-Dihydroxyflavonol on Lipid Peroxydation in Experimental Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rat**

The aim of present study was to determine the effect of 3',4'-dihydroxyflavonol (DiOHF) on lipid peroxidation in experimental renal ischemia-reperfusion in rats.

This study was performed on the Wistar-albino male rats which weighted as 200-250 g and in the Application and Research Center of Experimental Medicines of Necmettin Erbakan University. Experimental groups as follows:

**1.** Control; **2.** Sham; **3.** Ischemia; **4.** Ischemia-reperfusion **5.** Ischemia + DiOHF; **6.** Ischemia + DiOHF + reperfusion.

Following the all application, animals were anesthetized and blood samples were taken by cardiac puncture and kidney tissue samples were taken and animals were was killed by anesthesia. Samples were kept at -80 °C until the analysis.

Tissue glutathione (GSH) levels were the highest in the Groups 5 and 6 ( $p<0.005$ ). Groups 1 and 2 (ischemia and sham) have the lowest tissue GSH levels ( $p<0.005$ ).

Tissue malondialdehyde (MDA) levels were highest in the ischemia groups ( $p<0.005$ ). MDA levels of ischemia-reperfusion group (Group 4) lower than Group 3 ( $p<0.005$ ), was higher than all other groups ( $p<0.005$ ).

Erythrocyte GSH levels of Group 5 and 6 were significantly higher than other groups ( $p<0.005$ ). There was no significant difference between erythrocyte GSH levels of Group 1, 2, 3 and 4 ( $p<0.005$ ).

When observed the plasma MDA levels, this parameter were the highest in the Group 4 ( $p<0.005$ ). MDA levels of ischemia group (Group 3) lower than ischemia-reperfusion (Group 4) ( $p<0.005$ ), was higher than all other groups ( $p<0.005$ ).

The results of present study show that DiOHF supplementation by intraperitoneal prevents increased lipid peroxidation during renal ischemia-reperfusion damage in rat.

**Key Words:** Renal ischemia-reperfusion; 3',4'-Dihydroxyflavonol; rat

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücrel ölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasının yeniden başlamasıdır. Reperfüzyon sırasında, özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan serbest oksijen radikalleri (SOR) dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir (Ozan ve ark. 2004). İskemik dokuda radikal temizleyici enzimlerin düzeylerindeki azalmadan dolayı reperfüzyon hasarı daha da şiddetlenir (Akkuş 1995).

Böbrek iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı, vasküler cerrahi, organ alımı veya transplantasyon gibi klinik prosedürlerin yaygın bir sonucudur ve akut böbrek yetmezliğinin bir sebebidir (Koga ve ark. 2012). Böbrek iskemisi perioperatif dönemde yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olan yaygın bir komplikasyondur (Hutchens ve ark. 2008).

Reperfüzyon sırasında depolanmış hipoksantin ksantine dönüşümü hidrojen peroksit ve süperoksidi oluşturur. Demir iyonu varlığında hidrojen peroksit oldukça reaktif hidroksil radikalini oluşturur. Beraberinde, hem protein nitrosilasyonu hem de oksidatif hasar yoluyla hücre hasarına yol açan tübül hücrelerinde iskemi nitrik oksit sentazı (NOS) uyarır ve üretilen nitrik oksit (NO) peroksinitriti oluşturmak üzere süperoksit ile reaksiyona girer. Topluca, reaktif oksijen türleri (ROS) proteinlerin oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı ve apoptozun indüklenmesi ile böbrek tübül hücrelerinde hasara neden olur (Devarajan 2006).

Lipid peroksidasyonu hücre membranlarında oksidatif hasara yol açan ve reaktif lipid aldehitlerinin salınımı ile sonuçlanan otokatalitik bir yolaktır. Lipid peroksidasyonu böbrekte oksidatif hasarın göstergesi olarak sıklıkla kullanılır (Walker ve ark. 2001). Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan malondialdehit (MDA) gibi ürünler peroksidasyonun şiddetini belirler. Peroksidasyon sonucu meydana gelen ürünlerden özellikle ikisi mutajenik etki göstermektedir; bunlar MDA

ve hidroksinonenal (HNE)' dir. MDA özellikle üç ya da daha fazla çift bağılı yağ asitlerinin yıkılması ile meydana gelen bir üründür (Yarsan 1998). I/R hasarı, ROS' a bağılı lipid peroksidasyonuna katkı sağlar (Koga ve ark. 2012).

Glutasyon (GSH), hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Proteinlerdeki sülfidril gruplarını redükte halde tutar ve oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin inaktivasyonunu engeller (Ross 1988).

Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Oksijen radikallerinin giderilmesinde organizmada bulunan savunma sistemleri tek başına yeterli olmayabilir. Oksidatif hasara karşı ilave olarak alınan antioksidanlar oldukça etkili olabilirler (Özşahin ve ark. 2011). Alınan besinlerde de çeşitli antioksidanlar bulunmakta olup, bunların başlıcaları antioksidan vitaminler ve flavonoidlerdir (Mehmetoğlu ve ark. 2005). Antioksidan özellik gösteren flavonoidler, serbest radikal toplayıcı özellik göstermektedir. Hidrojenlerin ayrılmasıyla oluşan flavonoid radikalleri, ortamdaki eser metallerle şelat halka oluşturarak kararlı duruma geçerler (Bors ve ark 1990). Flavonoidler, reaktif türleri temizleyerek oldukça ROS' un oluşumunu engeller ve oksidatif reaksiyonların devamını sınırlar (Akhlaghi ve Bandy 2009). Mevcut çalışmada sentetik bir flavonoid olan ve daha önceki çalışmalarda kalp ve beyin iskemisinde koruyucu etkilere sahip olduğu belirlenen 3',4'-dihydroxyflavonol'un (DiOHF) deneysel böbrek I/R' da etkisini belirlemek amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İskemi-Reperfüzyon

İskemi doku hipoksisine yol açan, dokunun metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için gereken seviyenin altında bozulmuş kan akışını ifade eder (Lerman ve ark. 2009). Kritik bir iskemi döneminin sonrasında organ kan akımının yeniden sağlanması reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan parankimal hasar ve organ yetmezliği ile sonuçlanır. I/R hasarı sıklıkla organ nakillerinde, organ rezeksiyonunda ve şokta görülür. Kritik iskemi dönemi organa bağlıdır ve karaciğer ve böbrekte 15-20 dakika, iskelet kasında 2.5 saat ve beyinde 5 dakikadır (Tapuria ve ark. 2008).

I/R hasarının potansiyel mekanizması; doku hipoksisini, reperfüzyon sırasında SOR oluşumu ve inflamatuvar aracılardan ortaya çıkması ile oluşturulmaktadır. Kan akımındaki azalma ve oksijenin yetersiz dağılımına bağlı olarak anaerobik metabolizmanın son ürünlerinin ve toksik ürünlerin birikimi iskemik hasarı yaratmaktadır. SOR, doğrudan etki ile veya hücrel antioksidan sistemlerini yetersiz kılarak reperfüzyon hasarını oluşturmaktadır (Şengül ve Şengül 2012). Reperfüzyon sırasında ROS salınımı, nötrofil birikimini ve ardından ilave ROS ve litik enzimlerin salgılanmasını beraberinde getirir (Rhoden ve ark. 2002; Chander ve Chopra 2006).

Hücre içi pH' da düşüş ve sonuç olarak sitozolde sodyum ve kalsiyum artışı ile sonuçlanan I/R hasarı, iskemi sırasında glikolizi aktive eden anaerobik metabolizmanın kesintiye uğraması ile başlar. Reperfüzyonla sitozol ve mitokondride kalsiyum fazlalığı dahil iyonik bozukluklar süperoksit ve diğer ROS' un üretimini artırır. Sonuç olarak hücrel biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ve ciddi durumlarda hücre ölümü ile sonuçlanan sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur (Akhlaghi ve Bandy 2009).

Reperfüzyonun başında mitokondriyal solunum hızı ve serbest radikal üretimi belirgin olarak artar. Bu radikaller hücre intrinsik serbest radikal yakalayıcı sistemlerin kapasitesini aşabilir ve hücre fonksiyon kaybına yol açabilirler. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, % 5 kadarının ROS' a çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil

radikali ve peroksinitrit anyonudur. Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, ardından apoptoz ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedirler (Şahna ve ark. 2006).

İskemi ve reperfüzyon, vazodilatör kaynaklarında azalma ile açıklanan organ hasarı yanı sıra vasküler hasara da yol açar. In vivo dolaşım dilatasyon kapasitesindeki genel azalma, lökositlerin endotele adezyonu ve sonuç olarak kapillerlerin tıkanması nedeniyledir. Oksijen radikal üretimi, lökosit aktivasyonunu ve adezyonunu artırarak bu vasküler tıkanmaya katkı sağlar (Chan ve ark. 2003). Aktif nötrofillerin damar içinde oluşturdukları agregatlar ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya yol açabilirler (Şahna ve ark. 2006).

İskeminin ardından dokular anaerobik metabolizmaya uyum sağlar. Kan akımının tekrar oluşması ihtiyaç duyulandan daha fazla oksijen oluşumuna neden olur ve bu dolaşımdaki makrofajların aktivasyonuna ve sonuç olarak oksidatif stres meydana getiren süperoksit radikallerinin oluşumuna yol açar. Reperfüzyon hasarının başlamasında anahtar olay ekstraselüler ROS' un primer kaynağı olan makrofajların aktivasyonudur (Tapuria ve ark. 2008). Reperfüzyonun başlangıcında meydana gelen olaylar nötrofiller ve endotelyum arasındadır ve erken reperfüzyon hasarı olarak ifade edilir. Aktif nötrofiller ROS ve proteazları salgırlar (Şahna ve ark. 2006). ROS endotelyal hasara ve proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açar (Tapuria ve ark. 2008). Endotelyumda reperfüzyon hasarı serbest radikal temizleyiciler, nötrofillerin adezyon ve/veya aktivasyonunun önlenmesi, ekzojen NO takviyesi veya NO' in doğrudan endojen üretiminin artması veya nitritin NO' e indirgenmesi ile önlenbilir (Wang ve ark. 2009).

Hem iskemi hem de reperfüzyonu takiben zarar gören endotelyumda NO sentezi belirgin derecede azalır. NO eksikliği nötrofil aktivasyonunun kolaylaşmasına ve doku hasarının artmasına yol açabilir. Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve peroksinitritin reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazla olduğu ve bu durumun indüklenebilir NOS up-regülasyonu ile ilgili olduğu belirtilmektedir. NO düzeyindeki bu gecikmiş artış, doku hasarının daha da artmasına neden olur (Şahna ve ark. 2006).

### **2.1.1. Sıcak İskemi-Reperfüzyon Modeli**

Bu modelde böbreğin vasküler pedikülü veya tek başına renal arter değişen sürelerle klemplenmekte ve kan akımı tam olarak kesilerek iskemi oluşturulmaktadır. Daha sonra klempin kaldırılması ile böbreğin yeniden perfüzyonu sağlanır. Esas patofizyolojik hasar doku hipoksisidir. Daha sonra dış medüller mikrodolaşım bozulur, inflamasyon ve tübüler hasar meydana gelir. Ardından gelişen reperfüzyon hasarından ise reaktif oksijen radikallerinin oluşumu sorumludur. Bu modelde en sık olarak sıçanlar kullanılır (Coşkunfirat ve ark. 2010).

### **2.1.2. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı**

Böbrek I/R hasarı ameliyat sırasında geçici şiddetli sistemik hipotansiyon veya aortik oklüzyonun bir sonucu olarak meydana gelebilir (Walker ve ark. 2001). Akut böbrek yetmezliğine neden olan böbrek I/R hasarı, özellikle böbreğin sıcak iskemi dönemlerine maruz kaldığı suprarenal aortik cerrahi ve organ transplantasyonu gibi durumlarda önemli bir klinik problem olmaya devam etmektedir (Müller ve ark. 2002).

İskemi akut böbrek hasarının (ABH) başlıca nedenidir. İskemi ve reperfüzyon endotelial fonksiyon bozukluğu, lökositte bağlı inflamasyon ve azalmış mikrovasküler kan akımı nedeniyle ABH' nı ortaya çıkarır. I/R ABH' a neden olmasına rağmen, öldürücü olmayan iskemi böbrekleri gelecekteki iskemik ABH' a karşı koruyabilir. İskemik önkoşullama, gelecekteki bir iskemik hasara karşı koruma sağlamak için öldürücü olmayan iskemi oluşturma anlamına gelir (Munshi ve ark. 2011).

Bir organ veya dokunun I/R' u etkilenmiş hücrelerin hemen hemen her organelinde ve hücre içi sistemlerinin yapı ve fonksiyonunu etkileyen bir seri kompleks biyokimyasal olayı tetikleyen hücresel hasara yol açar. I/R hasarı, zarar görmüş dokuda hücresel bileşikleri etkileyen bazı hücresel olayları harekete geçirir. Serbest radikal aracılı hücre hasarının, reperfüzyon ile dokuya oksijenin sağlandığı ve oksijen radikali oluşumunun böbreklerin yüksek hücresel detoksifikasyon kapasitesini aştığı zaman meydana gelmesi beklenmektedir. Oksijen eksikliğine bağlı hücresel hasar patogenezi bir dizi süreci kapsamaktadır. Bunlar, hücre kalsiyum metabolizması ve serbest radikal üretiminin bozulması, toksik lipid metabolitlerinin



oluşumu ile fosfolipazların aktivasyonu ve hücre hacmi ve tek değerlikli katyon homeostazın kaybını içermektedir. Bu yüzden böbreklere zarar veren I/R hasarının altında yatan mekanizmalar büyük olasılıkla hipoksi, inflamatuvar cevaplar ve serbest radikal etkili hasar gibi çoklu faktörlerdir ve birbirine bağımlıdır (Singh ve ark. 2005).

I/R hasarına katkı sağladığı düşünülen tanımlanmış birkaç mekanizma vardır. Bu olasılıklardan biri oksidatif streştir. I/R olayının ardından böbreğe oldukça zarar veren SOR salınır. Bu, doku fibrozuna, böbrek yetmezliği ve/veya reddine neden olur (Slyvka ve ark. 2013). Böbrek reperfüzyonu sırasında açığa çıkan ROS, DNA hasarı, protein oksidasyonu ve nitrosilasyonu, lipid peroksidasyonu ve apoptoz indüklenmesi gibi çeşitli sitotoksik etkiler ortaya çıkarır (Koga ve ark. 2012).

Böbrek I/R hasarı, böbrek tübül hücrelerinde nekroz ve apoptoza neden olan karmaşık moleküler ve yapısal değişikliklerin sonucudur (Hutchens ve ark. 2008). Böbrek kan akımında ve oksijen desteğinde ciddi bölgesel bozulmaların böbrekte ağırlıklı olarak medullanın dış kısmını etkilemesi hipoksinin uzamasına ve tübüler nekrozun artmasına neden olabilir (Müller ve ark. 2002).

I/R hasarının ardından arteriyollerde vazokonstriktörlere artan duyarlılık vazodilatasyonun azalması sonucunda endotel hasarı ve anormal vasküler tonus meydana gelir. Endotel hasarı, kan akımını daha da azaltan hücre şişmesine ve vasküler lümenin daralmasına neden olur. Reperfüzyon paradoksal olarak kan akımının daha da bozulmasına yol açar. Kısmen tübüler epitelyum hasar nedeniyle distal nefrona çözülmüş madde (solute) dağıtımının artması, tübüloglomerüler geribildirim mekanizmasının aktivasyonu ile vazokonstriksiyon artar. Bazal tonus artışı ve sürekli vazokonstriksiyon sonucunda glomerüler filtrasyon hızı azalır (Hutchens ve ark. 2008).

Endotelyal hasar NO gibi vazodilatörlere normal arteriyolar cevabı da bozar. NO, böbrekte bulunan NOS' un üç formu ile oluşturulur: indüklenbilir (iNOS), nöronal ve endotelyal (eNOS). eNOS ve iNOS dengesinin hasarı değiştirdiği görülmektedir (Hutchens ve ark. 2008). Böbrek I/R hasarı NO üretimine yol açar ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) dahil multipl enzim sistemlerinin aktive olmasına neden olur (Slyvka ve ark. 2013). I/R hasarı ve yaşlanma birlikte böbrekte NO sistemlerinde değişime yol açar. Oksidatif stres ve NO sistemindeki

değişikliklerin kombinasyonu SOR ve reaktif nitrojen türleri (RNS) seviyelerinde artma ile sonuçlanır (Mark ve ark. 2005; Slyvka ve ark. 2013).

İlk iskemik durumda doku hasarına maruz kalırsa da ciddi inflamatuvar cevap reperfüzyon sırasında şiddetlenir. Endotel hasarı, lökosit-endotel etkileşimini artıran adezyon moleküllerinin upregülasyonuna sebep olur. Böbrek I/R' dan sonra, inflamatuvar sitokinler upregüle olur, komplemen aktive olur, kemokinler salgılanır ve lökositler kuvvetlendirilir ve aktive edilir (Hutchens ve ark. 2008).

Renal iskemi Adenozin trifosfat (ATP) yıkımında artış meydana getirir. Yıkım ürünleri olarak AMP, adenozin, inozin ve hipoksantin artar. Böbrek reperfüzyonunda hipoksantin, ksantin oksidaz tarafından ksantine dönüştürülür (Selçuk ve ark. 1996; Rhoden ve ark. 2002) ve bu sırada moleküler oksijenin yıkım ürünü olarak süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikali ve bunun yıkım ürünleri olan hidroksil radikali ve hidrojen peroksit mitokondri, lizozom ve plazma membranları üzerinde lipid peroksidasyonu hücre hasarını oluşturur. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonu meydana gelen hücre hasarı, membran permeabilite artışından hücre lizisine kadar değişebilir (Selçuk ve ark. 1996; Chander ve Chopra 2006).

Hücre iskeleti değişikliklerinin I/R hasarına önemli katkıları vardır. I/R' dan kaynaklanan oksidatif stres sırasında üretilen peroksinitrit hücre iskeleti düzensizliğine ve apoptoz gelişimine neden olabilir (Vinas ve ark. 2007). İskemi, değişmiş peroksizom fonksiyonundan ve mitokondriyal elektron transport zinciri yıkımında ROS üretimine yol açar. ROS bazı hücre iskeleti ve fonksiyonel hücresel bileşiklerini doğrudan hasara uğratar ve hücresel stres cevabı yollarını aktive eder (Hutchens ve ark. 2008).

ATP tükenmesi etkisiyle bozulan Ca homeostazından kaynaklanan fosfolipaz ve proteazların anormal aktivasyonunun yanı sıra membran seçici geçirgenliğinin kaybolması ve hücre membranında iyonik gradientin bozulması, uzamış renal iskemi sırasında proksimal tübüllerde gözlenen biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin temelini oluşturur. Ancak, bu değişiklikler tüm hücre hasarının nedenini açıklamaz, patogenetik süreçler katkı sağlıyor olmalıdır. İskemik koşullarda ulaşılabilen en düşük oksijen konsantrasyonlarına rağmen, serbest radikal aracılı reaksiyonların iskemik organda yerini aldığı ve oksidatif hasara yol açtığı

görülmektedir ya da en azından bu gibi koşullarda gözlemlenen artmış lipid peroksidasyonu ve/veya antioksidan tüketimi kabul edilebilir (Cutrin ve ark. 2000).

Tübüler ve glomerüler fonksiyon bozukluğunun çoğunun anoksiyi takip eden reperfüzyon döneminde oluştuğu varsayılır ve ROS üretiminin bu reperfüzyon hasarına en büyük katkı sağlayan faktörlerden olduğu farzedilir (Rhoden ve ark. 2002; Singh ve ark. 2005). ROS, glomerül ve proksimal tübül gibi nefron segmentlerinde üretilebilir (Ha ve ark. 2004). I/R hasarında, ROS biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonuna yol açan proteinler, lipidler ve nükleik asitlerle tepkime verme yeteneğine sahiptir. Üstelik iyon pompası aktivitesi ve DNA hasarı gibi enzimatik süreçleri etkiler ve böylece transkripsiyonu ve onarımı inhibe eder. Eğer lipid peroksidasyonu durdurulmazsa sonuçta hücre ölümü gerçekleşecektir (Singh ve ark. 2005).

## **2.2. Serbest Radikaller ve Oksidanlar**

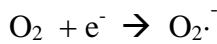
Dış katmanında bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran molekül serbest radikal olarak adlandırılır. Serbest radikaller, moleküllerden her parçası bir elektron içeren bir kimyasal bağın kopması ile bir radikalden diğerine ayrılmasıyla ve de redoks reaksiyonlarıyla oluşur. Serbest radikaller hidroksil (OH $\cdot$ ), süperoksit (O $_2^{\cdot-}$ ), nitrik oksit (NO $\cdot$ ), nitrojen dioksit (NO $_2^{\cdot}$ ), peroksil (ROO $\cdot$ ) ve lipid peroksili (LOO $\cdot$ ) kapsamaktadır. Aynı zamanda, hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$ ), ozon (O $_3$ ), singlet oksijen ( $^1$ O $_2$ ), hipokloröz asit (HOCl), nitroz asit (HNO $_2$ ), peroksinitrit (ONOO $^-$ ), dinitrojen trioksit (N $_2$ O $_3$ ), lipid peroksit (LOOH) serbest radikal değildirler ve genellikle oksidan olarak bilinirler ancak canlı organizmalarda serbest radikal reaksiyonlarına yol açarlar. Serbest radikaller lipidler, proteinler, DNA gibi çeşitli organik maddelere etki edebilen elektronlara sahip yüksek oranda kararsız moleküllerdir (Pham-Huy ve ark. 2008).

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler (Akkuş 1995).

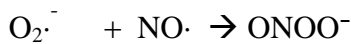
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler

oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir (Akkuş 1995).

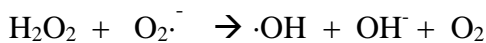
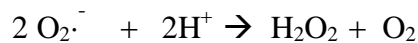
Moleküler oksijen tek tip elektronik konfigürasyona sahiptir ve tek başına bile serbest radikaldir. Moleküler oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit anyonu oluşur. Metabolik süreçler veya fiziksel irradasyonla oksijenin aktivasyonundan kaynaklanan süperoksit primer ROS olarak addedilir ve diğer moleküllerle etkileşerek sekonder ROS oluşturabilirler (Valko ve ark. 2007).



Süperoksit düşük pH değerlerinde daha reaktiftir. Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Süperoksidin fizyolojik bir serbest radikal olan NO ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Böylece NO'nun normal etkisi inhibe edilir (Akkuş 1995). ONOO<sup>-</sup> hücrel lipitlerle, proteinler ve DNA ile tepkimeye girebilen etkili ve çok yönlü bir oksidandır (Walker ve ark. 2001).



Süperoksit dismutaz (SOD) enzimatik olarak süperoksiti hidrojen peroksite dönüştürür. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (Akkuş 1995). Biyolojik dokularda süperoksit nonenzimatik şekilde radikal olmayan hidrojen peroksit ve singlet oksijene de dönüştürülebilir. Redükte geçiş metallerin varlığında hidrojen peroksit oldukça reaktif hidroksil radikaline dönüştürülebilir. Alternatif olarak hidrojen peroksit katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile suya dönüştürülebilir (Dröge 2002).



Singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur (Akkuş 1995).

ROS ve RNS oluşumu hücrelerde enzimatik ve nonenzimatik yollarla meydana gelir. Süperoksit anyonu NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz,

ksantin oksidaz, peroksidazlar gibi çeşitli oksidaz sistemlerle oluşturulur (Pham-Huy ve ark. 2008). İnflamatuvar cevapta rol oynayan aktif makrofajlar ve nötrofiller NADPH oksidazın fagositik izoformları aracılığıyla büyük miktarda süperoksit ve türevlerini üretebilirler (Dröge 2002; Şahna ve ark. 2006). NADPH oksidaz, doku hasarına yol açan sitokinden kaynaklı hücresele ROS üretiminin başlıca nedeni sayılmaktadır (Ha ve ark. 2004).

ROS' un ana kaynağı mitokondriyal elektron taşıma zinciridir (Koga ve ark. 2012). Bütün hücre ve dokular devamlı olarak oksijenin küçük bir kısmını bu yolla süperoksite dönüştürür. Ksantin oksidaz, hipoksantini ksantine ve ksantini ürik asite dönüştürerek süperoksiti oluşturur. Bu enzim proteolitik ayrılma ile ksantin dehidrogenazdan oluşur. Normal koşullar altında ksantin oksidaz ROS oluşumunu küçük bir bölümünden sorumludur. Ancak, I/R gibi belli hastalık koşulları altında oksidatif stresin majör kaynağını teşkil eder (Dröge 2002).

Nitrik oksit biyolojik sistemlerde çeşitli fizyolojik ve patolojik etkileri olan oldukça önemli bir endojen vazodilatör, çözünebilir serbest radikal bir gazdır. NO, NOS ile L-arjinin ve moleküler oksijenden sentezlenir ve endotel hücreleri tarafından üretilir (Rhoden ve ark. 2002; Mark ve ark. 2005; Chander ve Chopra 2006). Mikroortama bağlı olarak NO nitrosonyum katyonu ( $\text{NO}^+$ ), nitroksil anyonu ( $\text{NO}^-$ ) ve peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) gibi diğer RNS' e de dönüştürülebilir (Dröge 2002). NO süperoksit radikali ile birleşerek toksik peroksinitriti oluşturur ve tirozin proteini nitrasyonu veya hidroksil radikali ve NO' e ayrışarak doku hasarına neden olur (Mark ve ark. 2005).

Nitrojen türlerinin fazla üretimi nitrosatif stres olarak adlandırılır. Nitrosatif stres, RNS üretiminin sistemin elimine ve nötralize edeceğinden fazla olması durumunda oluşur. Nitrosatif stres, proteinlerin yapılarını değiştiren ve normal fonksiyonlarını inhibe eden nitrosilasyon reaksiyonlarına yol açar (Valko ve ark. 2007).

ROS ve RNS hem endojen hem de ekzojen kaynaklardan oluşur. Endojen serbest radikaller immün hücre aktivasyonu, inflamasyon, mental stres, aşırı egzersiz, iskemi, enfeksiyon, kanser ve yaşlanma ile üretilir. Ekzojen ROS/RNS hava, su kirliliği, sigara içimi, alkol, ağır ve geçiş metalleri, bazı ilaçlar, endüstriyel solventler, radyasyon gibi durumlardan kaynaklanır. Farklı yollarla vücuda yerleşen

bu ekzojen bileşikler serbest radikallere ayrışır veya metabolize olur (Pham-Huy ve ark. 2008).

Radikallerden kaynaklanan serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türler biyolojik hücreler ve dokularda düşük ama ölçülebilir konsantrasyonlarda bulunurlar. Konsantrasyonları üretim hızları ve çeşitli antioksidan enzim ve bileşiklerle klirensi arasındaki denge ile belirlenir (Dröge 2002).

ROS' ların yarı ömürleri birbirlerinden tamamen farklıdır (Tablo 2.1). Hedef moleküllerle reaksiyon için en yüksek hız sabitesi hidroksil için bulunmuştur. Bunun reaksiyonları difüzyonla sınırlıdır yani reaksiyonlar olduğu bölgede gerçekleşir. Tersine bazı peroksil radikalleri nispeten daha karardır, yarı ömürleri saniyeler aralığındadır. Böyle moleküller oluştukları alandan difüze olabilir ve böylece radikal veya oksidan fonksiyonunu diğer bölgelere taşıyabilir (Sies 1993).

**Tablo 2.1.** Reaktif Oksijen Türleri Yarı ömürleri

ROS	Yarı ömür (saniye)
HO· (Hidroksil radikali)	10 <sup>-9</sup>
RO· (Alkoksil radikali)	10 <sup>-6</sup>
ROO· (Peroksil radikali)	7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Hidrojen peroksit)	-(enzimik)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (Süperoksit anyonu radikali)	-(enzimik)
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> (Singlet oksijen)	10 <sup>-5</sup>
NO· (Nitrik oksit radikali)	1-10
ONOO <sup>-</sup> (Peroksinitrit)	0.05-1

### 2.2.1. Serbest Radikal Etkileri

Canlı organizmalarda ROS ve RNS hem yararlı hem de zararlı etkilere sahiptir. Düşük veya orta konsantrasyonlarda ROS ve RNS hücrel yapıların olgunlaşma sürecinde ve savunma sisteminde silahlar olarak gereklidirler. Fagositler (nötrofil, makrofaj, monosit) hastalıklara karşı vücudun savunma sisteminin bir parçası olarak patojen mikropları yok etmek için serbest radikalleri salgırlar. Serbest radikaller çok sayıda hücrel haberleşme sisteminde yer almaktadır. Örneğin NO kan akımı, kan pıhtılaşması ve nöral aktiviteyi düzenleyen bir hücre içi habercidir. Ayrıca

serbest radikaller mitojenik cevabın indüksiyonunda görev alır (Valko ve ark. 2007; Pham-Huy ve ark. 2008).

Serbest radikaller oksidatif stres ve nitrosatif stres gibi zararlı durumlara da neden olur. Biyolojik sistemlerde bu durumlar, bir yandan ROS/RNS aşırı üretimi diğer yandan enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların yetersizliği halinde oluşur. Diğer deyişle oksidatif stres, canlı organizmalarda oksijen kullanan metabolik reaksiyonlardan kaynaklanır ve prooksidan/antioksidan reaksiyonların denge durumunda bozukluklar gösterir. Aşırı ROS hücrel lipitlere, proteinlere, DNA' ya normal fonksiyonlarını inhibe ederek zarar verebilir. Serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri arasındaki hassas denge canlı organizmalar için önemli bir konudur ve "redoks regülasyonu" denilen mekanizma ile gerçekleştirilir. Redoks regülasyonu canlı organizmaları çeşitli oksidatif stresten korur ve in vivo redoks durumunu kontrol ederek redoks homeostazını sürdürür (Valko ve ark. 2007).

Oksijen radikalleri ve diğer ROS proteinlerde modifikasyonlara neden olur. Bu oksidatif modifikasyonlar, protein fonksiyonu, kimyasal parçalanma veya proteolitik ataklara duyarlılık artışı değişikliklerine yol açabilir (Dröge 2002). I/R' un bir sonucu olarak ROS ve NO üretiminin artması, hücre hasarı ve böbrek fonksiyon değişiklikleri ile beraber protein nitrasyonuna neden olan peroksinitrit oluşumunu destekler (Vinas ve ark. 2007).

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelirler (Akkuş 1995).

I/R hasarında ROS ve NO oluşumu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına neden olan sitotoksik bir metabolit peroksinitriti oluşturabilir. NO sitotoksitesi ve bunun metaboliti peroksinitritin mitokondriyal membran lipid peroksidasyonunda ve DNA sentezi inhibisyonunda temel rolü oynadığı öne sürülmektedir (Noiri ve ark. 2001). SOR lipid peroksidasyonu yoluyla hücre membranlarını etkileyerek, glomerüller ve tubulo-intersitisyel yapılarda hücrel hasar meydana getirir (Selçuk ve ark. 1996). ROS çok çeşitli böbrek hastalıklarının patofizyolojik süreçlerinde anahtar rol oynar (Rodrigo ve Bosco 2006).

### 2.3. Oksidatif Stres

Fizyolojik koşullar altında, normal şartlarda üretilen ROS hücrel ve hücre dışı savunma mekanizmalarıyla tamamen inaktive edilir. Yani, normalde oksidan ve antioksidan savunma sistemleri dengededir. Bazı patolojik koşullarda, ROS üretimi artması ve/veya antioksidan savunma sisteminin eksikliği doku hasarı ile sonuçlanan ROS aktivitesinin ve oksidatif stresin artmasına neden olabilir. Oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve protein modifikasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla doku hasarına neden olabilir (Ha ve ark. 2004; Wardle 2005; Ozbek 2012).

Malign hastalıklar, diyabet, ateroskleroz, kronik inflamasyon, HIV enfeksiyonu, uyku apnesi ve I/R gibi durumlarda oksidatif stres rol almaktadır. Diyabet ve kanserde prooksidatif değişim görülür ve bu durumlarda “mitokondriyal oksidatif streten” bahsedilebilir. I/R ve diğer hastalık durumlarında “inflamatuvar oksidatif stres” söz konusu olup burada sitokinler ve diğer ajanlarla NADPH oksidazın aşırı uyarılması durumu vardır. Bu durumda artan ROS seviyeleri veya hücre içi GSH seviyesinin değişimi sinyal kaskadlarının ve gen ekspresyonun bozukluğunun göstergesi olan patolojik değişikliklerle bağlantılıdır (Dröge 2002).

Oksidatif stresin sonuçları sadece oksidatif stresin gücüne ve streten etkilenen hücre tiplerine bağlı değildir, aynı zamanda oksidatif stresin (redoks dengesizliğinin) süresinden de etkilenir. Oksidatif stresin hücre ve organlara güçlü yoğunlukta kısa süre etkisi uzun dönemli etkisi kadar zararlı durmamaktadır. Oksidatif stresin hücreler üzerine etkisi, serbest radikaller ve reaktif metabolitlerin faaliyeti sırasında oluşan ürünlere de bağlıdır (Durackova 2010).

Oksidatif stres, I/R sırasında ROS' un aşırı üretiminin sebep olduğu yaygın bir durumdur. Oksidatif stres, direkt ve bunu takip eden hücrel hasarda rol alan önemli bir faktördür (Yuan ve ark. 2011). Hücre membranlarında lipid peroksidasyonu sırasında ürünlerin degradasyonu veya serbest radikal oluşumundan oksidatif hasar meydana gelir. Membran çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksitlerin ve MDA, HNE, akrolein ve diğer karbonillerin kompleks bir karışımının oluşumunun ile beraber olduğu bilinmektedir. Bu bileşikler oldukça reaktiftirler ve fosfolipidler ve proteinler gibi hücrel nükleofillerle hızlı reaksiyona girebilirler. (Osawa 1999).



Oksidatif stres, ROS' un mezengial ve endotelial hücreler üzerine etkisinden dolayı glomerül fonksiyon ve yapısını değiştirebilir. Glomerüller oksidatif hasara karşı diğer nefron segmentlerine göre önemli derecede daha hassastır (Rodrigo ve Bosco 2006). Oksidatif stres, böbrek vazokonstriksiyon veya glomerüler kapiller ultrafiltrasyon sabitini düşürerek renal fonksiyonu doğrudan etkileyen çeşitli vazoaaktif araçların üretimini destekler ve böylece glomerüler filtrasyon hızı azalır (Singh ve ark. 2005).

#### **2.4. Lipid Peroksidasyonu**

Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir (Akkuş 1995).

Normal olarak tüm dokularda düşük düzeyde lipid peroksidasyonu görülür. Bu durum antioksidan sistemlerle dengelenmediği zaman membran lipidlerinde bozulmalar meydana gelerek oksidatif hasar oluşur (Özşahin ve ark. 2011). Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995).

Lipid peroksidasyonu doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun ayrılması ile başlayan bir zincir reaksiyonudur. Anaerobik ortamda ortasında karbon atomu bulunan lipid radikaline (L·) oksijen eklenerek lipid peroksi (LOO·) radikali oluşur. Lipid peroksi radikali, diğer komşu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu alarak peroksidasyon zincir reaksiyonunu daha da yayar. Oluşan lipid hidroperoksit (LOOH) kolayca lipid alkoksil radikalleri (LO·), aldehitler (MDA gibi), alkanlar, lipid epoksidler ve alkoller gibi bazı reaktif türlere ayrışabilir (Davies 2000). Doymamış yağ asitlerinin miktarına bağlı olarak hidroperoksidlerin şekillenmesinin sürekli devam ettiği bu tepkimeler, peroksid gruplarının bir araya gelerek tepkimeye girmesi ve etkisiz ürünler oluşturmaya kadar sürer. Zincir aşaması sırasında oluşan hidroperoksitler sabit bir yapıda değildirler. Özellikle demir ve kompleksleri ortamda bulunduğu sürede bu maddelerle tepkimeye girerler ve zincir tepkimesini yeniden başlatırlar. Zincir reaksiyonları sonucunda meydana gelen

gruplar ya birbirleri ile tepkimeye girerek etkisiz ürünlere dönüşürler ya da antioksidan maddeler ile tepkimeye girerek tepkimeyi bitirirler (Yarsan 1998).

Perokside olan membranlar katılaşır, seçici geçirgenliğini kaybeder ve uç noktadaki koşullarda bütünlüğünü kaybedebilir. Suda çözünebilir lipid peroksidasyon ürünleri (özellikle aldehitler), membranlardan diğer hücre içi kısımlara yayılma göstermektedir. Dialdehitler çapraz bağlanma reaktifi olarak işlev görebilir ve protein agregasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (Davies 2000). Mitokondriyal, lizozomal membranlar ve plazma membranlarında geçirgenlik artışına yol açan lipid peroksidasyonu I/R hasarından kaynaklanan hücre hasarının yayılmasında önemli bir faktördür (Noiri ve ark. 2001).

Lipid peroksidasyonunda etkili olan oksijen metaboliti süperoksit grubu ve hidroksil grubudur (Yarsan 1998). Hidroksil radikali gibi oksijen radikal türlerinin aşırı üretimi, lipid peroksitlerini oluşturmak üzere hücre membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitleri ve MDA, HNE, acrolein gibi sekonder ürünlerin oluşmasına neden olur. Lipid peroksitleri oldukça reaktiftir ve proteinler, aminoasitler, aminler ve DNA gibi bazı biyolojik bileşenlerle etkileşim gösterir (Osawa 1999).

4-hidroksi-2-nonenal (HNE), peroksidatif araşidonik asit veya linoleik asit metabolizması ile üretilir. HNE hızlıca protein fonksiyon kaybına yol açan lizin, sistein ve histidin kalıntılarına dönüşür (Noiri ve ark. 2001).

#### **2.4.1. Malondialdehit**

Lipitler, oksidasyon belirleyicisi olarak en çok çalışılan ve SOR' ların reaksiyona girebildiği ortak bir substrattır. Oksidasyon sonrası özellikle hücre zarlarının lipitlerinde meydana gelen peroksidasyon sonucunda son ürün olarak malondialdehit (MDA), konjuge dienler, kısa zincirli alkenler ve lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Endoperoksitler doymamış yağ asitleri ve serbest demir atomları ile birleştiğinde MDA meydana gelir. Renal iskemi reperfüzyon sonrasında oluşan son ürün olan MDA miktarı doymamış yağ asitlerinin oksidasyonundan dolayı artar (Şentürk ve ark. 2010).

Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi

ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir (Akkuş 1995). MDA proteinlere çapraz bağlanabilir, böylece membran proteinleri gibi bazı biyolojik fonksiyonları güçleştirebilir. Böyle reaksiyonlar hücre yaşlanmasına katkı sağlar (Havsteen 2002).

## **2.5. Antioksidan Mekanizmalar**

Serbest oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimler ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasar sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hücresel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge oluşturmaktadır (Ozan ve ark. 2004). Savunma sistemleri enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki grupta toplanabilirler (Aksoy 2002).

Enzimatik ve nonenzimatik sistemler, antioksidan/oksidan durumu korurken, bu savunma mekanizmaları oksidatif stres sırasında aşırı ROS üretimi veya antioksidan kapasitenin azalmasının sebep olduğu bir dengesizlik yüzünden metabolik düzensizliğe yenik hale gelmektedir. ROS, yapısal ve fonksiyonel bozulmalara yol açan, lipidler, proteinler ve nükleik asitleri hasara uğrattığından hücreler için zararlıdır. ROS etkilerini gidermek için antioksidan savunma sisteminin güçlendirilmesiyle çok sayıda müdahaleler ortaya konulmuştur (Rodrigo ve Bosco 2006).

İnsan vücudu oksidatif strese karşı hem doğal olarak in situ üretilen hem de dışarıdan besinlerle ve/veya takviyelerle sağlanan antioksidanların oluşturduğu bazı mekanizmalara sahiptir. Endojen ve ekzojen antioksidanlar, ROS ve RNS' in sebep olduğu hasarı önleyerek ve tamir ederek serbest radikal temizleyicileri görevini üstlenirler (Pham-Huy ve ark. 2008). ROS ile reaksiyona giren endojen bileşikler olan antioksidanlar SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, methemoglobin redüktaz (Aksoy 2002, Şahna ve ark. 2006) ve inflamatuvar hücrelerin serbest radikal üretimini engelleyen ekzojen ajanlar doku hasarını azaltabilirler (Şahna ve ark. 2006).

Antioksidan enzimlere ilave olarak dokularda çeşitli tiplerde nonenzimatik endojen antioksidanlar da mevcuttur. Bunlar ROS ile etkileştiğinde tükenmesine rağmen, genellikle bunların okside formları diğer moleküllerle redüksiyonu

sayesinde antioksidan şekillerine geri dönüşürler. Bunların düşük molekül ağırlıkları, daha büyük olan enzimlerin ulaşamadığı yerlerde ROS' u bertaraf etmek için avantaj sağlar. Üstelik non enzimatik antioksidanlar hem hidrofilik hem de lipofilik hücre kısımlarında fonksiyon görebilir. Temel düşük molekül ağırlıklı hidrofilik nonenzimatik endojen antioksidanlar GSH, tiyoredoksin ve askorbattır (Pamplona ve Costantini 2011).

Hücre içi savunma mekanizmalarında kullanılan serbest radikal temizleyici SOD, peroksit yıkıcı katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri, lökositlerin salgıladıkları bu sitotoksik reaktif oksijen metabolitleri tarafından oluşturulan hasarı azaltabilme kapasitesine sahiptir. Fakat, bu radikal temizleyici ajanlar hücre içinde buldukları için hücre dışı mekanizmalarla olan bir hasarı önlemede yetersiz kalabilir. Bu sebeple serbest radikal temizleyici ajanların vücuda dışarıdan verilmesi uygun bir tedavi seçeneği olabilir (Şahna ve ark. 2006). Antioksidan takviyeler, hem doğal besinlerden ekstrakte edilen hem de kimyasal olarak üretilen bileşiklerdir (Pham-Huy ve ark. 2008).

Reaktif oksidanların zararlı etkilerine karşı hücreSEL koruma çoklu seviyelerde organize edilir. Savunma önleme, durdurma ve onarım şeklinde olabilir (Sies 1993). SOR ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı bir etkidir. Vitaminler, flavonoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler (Akkuş 1995).

### **2.5.1. Glutatyon (GSH)**

Karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptittir. Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden meydana gelmiştir (Akkuş 1995). Hücre içinde glutatyonun %99' dan fazlası indirgenmiş formda bulunur (Aksoy 2002). GSH sitozol, nükleus ve mitokondride bol bulunur ve bu hücre kısımlarındaki en büyük çözünebilir antioksidandır (Valko ve ark. 2007).

Glutatyon disülfid (GSSG) GSH' in okside formudur (Valko ve ark. 2007). Glutatyon peroksidaz gibi enzimler hidrojen peroksidin GSH ile su ve GSSG' e redüksiyonunu katalizler. GSSG, hücre tiplerine ve hastalık durumlarına göre değişen, neredeyse tamamı GSH olan GSH/GSSG kararlı durumunu sürdürmek için

NADPH kullanarak glutatyon redüktaz ile GSH' a tekrar indirgenir (Zhang ve Forman 2012).

Glutatyon hücrelerde en çok bulunan antioksidan ve en önemli detoksifikasyon ajanıdır (Zhang ve Forman 2012). GSH oksidatif strese karşı savunmanın en önemli basamağını oluşturmaktadır. Oksidatif stresin zayıf olduğu durumlarda devreye giren uyum mekanizmaları sonucunda GSH seviyeleri artmaktadır. Ancak, oksidatif stres güçlü olduğunda uyum mekanizmaları zayıflar ve artan GSSG oluşumuna bağlı olarak GSH seviyesi azalmaktadır (Özşahin ve ark. 2011). GSSG içeriğindeki artış ve okside GSH ekivalan yüzdesi iskemi sırasında GSH oksidasyonunun meydana geldiğini gösterir ve reperfüzyondan önce oksidatif stres gelişimini açıklar (Walker ve ark. 2001). Okside glutatyon hücrelerde birikir ve GSH/GSSG oranı organizmalarda oksidatif stresin iyi bir ölçüsüdür. GSSG' nin çok yüksek konsantrasyonları birçok enzime oksidatif olarak zarar verebilir (Valko ve ark. 2007).

Glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında, proteinlerdeki sülfidril gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin membrandan transportunu sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz lenslerini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Eritrosit zarını hidrojen peroksitten, lökositleri fagositozda kullanılan oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasardan korur (Akkuş 1995).

## **2.6. Flavonoidler**

Bazı bitkiler tarafından sentezlenen flavonoidler polifenolik bileşiklerin bir grubudur. (Wang ve ark. 2004). Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu,  $\alpha$ -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatör, immünstimülan, antialerjik, östrojenik, antiviral etkileri de söz konusudur (Çimen 1999).

Flavonoidler meyvelerde, yeşil bitkilerde ve bazı meyve sularında bulunan çeşitli faydalı biyokimyasal ve antioksidan etkilere sahip bileşiklerdir (Montana ve ark. 2007; Jiang ve ark. 2008; Wang ve ark. 2009). Memelilerde diyetle alımları C ve

E vitamini gibi doğal antioksidanlarla kıyaslandığında oldukça yüksektir (Montana ve ark. 2007).

Flavan çekirdeği ile karakterize edilen flavonoidler iki benzen halkasının (A ve B) oksijen içeren bir piren halkası (C) ile bağlanması ile oluşmaktadır. Flavonoidler bitkilerde genellikle glikozit formları şeklinde bulunmaktadır. Sindirim kanalına alınan flavonoidlerin emilim işlemi ince bağırsakta gerçekleşmektedir (Güven ve ark. 2010). Flavonoidlerin suda çözünürlüğünün düşük olması, bağırsaklarda kısa süre kalması ve emilim faktörünün düşük olması nedeniyle flavonoidlerin tüketilmesi nadiren oluşan alerji dışında insanlar için akut toksik etkiler göstermesi mümkün değildir (Havsteen 2002).

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

a) Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil radikalini ( $\cdot OH$ ) ve singlet oksijeni ( $^1O_2$ ) temizler.

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

c) Siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzimlerini inhibe eder.

d) Demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlar.

e) Enzim fonksiyonlarına bağımlı kalsiyum modülasyonu ile hücreler regülasyonda önemli bir rol oynayan küçük bir asidik protein olan kalmodülini inhibe eder.

f) Protein kinaz enzimini inhibe eder.

g) Laktat transportunu engeller (Kahraman ve ark. 2002).

Flavonoidlerin lipitte eriyebilirliği yüksektir. Bu, flavonoidlerin biyolojik membrandan kolayca geçebilmesini ve hücre içi ROS' u temizlemesini sağlar (Wang ve ark. 2004). Flavonoidler süperoksit radikali temizlemeye ilave olarak lipooksigenaz, monooksigenaz ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz gibi ROS üreten bazı enzimleri inhibe eder. Bu diğer antioksidanlara göre flavonoidlerin potansiyel

bir avantajdır (Chan ve ark. 2003; Singh ve ark. 2005). Flavonollerle NADPH oksidaz aktivitesinin fonksiyonel inhibisyonu çoğunlukla bu bileşikler tarafından süperoksitin temizlenmesinin bir sonucudur (Jiang ve ark. 2008).

Hipoksantin, ksantin oksidaz ile ksantine ve daha sonra ürik aside art arda okside olur. Bu reaksiyonda moleküler oksijen elektron alıcısıdır. Oksidatif türler ksantin oksidaz sistemi ile üretildiğinde, ksantin oksidaz aktivitesinin flavonoidlerle inhibisyonu sonucunda süperoksit aktivitesinde flavonoid aracılı azalma, sekonder bir etki olarak meydana gelecektir (Montana ve ark. 2007).

Fenolik bileşikler dolaşıma alındığında, glikosilasyon, metilasyon veya glukuronidasyon gibi kimyasal modifikasyonlara uğrayabilmesine rağmen biyolojik aktivitesini ortaya çıkarma yeteneğini ve kullanılabilirliğini sürdürmektedir (Rodrigo ve Bosco 2006). Sıçanların kanına büyük miktarda flavonoid aglikonlarının solüsyon içinde enjeksiyonu ile LD<sub>50</sub> değeri 2 g/kg vücut ağırlığı olarak bulunmuştur (Havsteen 2002).

Biyolojik redüktantların özellikle askorbik asitin korunması flavonoid fonksiyonlarının en önemlilerinden birisidir. Askorbik asit oksidasyonla dönüşümsüz olarak yok edilir fakat flavonoidler elzem olan C vitamini kurtarmak için kendilerini feda ederler öncelikle okside olurlar. Sonuç olarak flavonoidler devamlı yüksek oranda tüketilir ve her yerde bulunan ROS' u temizlerler (Havsteen 2002).

### **2.6.1. 3',4'-Dihydroxyflavonol (DiOHF)**

Tüm flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Fenolik antioksidanlar, lipid radikallere hızla H<sup>+</sup> vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipid peroksi (ROO<sup>·</sup>) ve alkoksil (RO<sup>·</sup>) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır (Çimen 1999).

Küçük ve yüksek oranda lipitte eriyebilir bir molekül olan DiOHF hücreye hızlıca girebilir ve intraselüler ve ekstraselüler ROS' u inhibe edebilir. Ayrıca, flavonollerin plazma yarı ömrünün 24 saatten fazla olduğu gösterilmiştir. Bu da uzun dönemler için korumayı kolaylaştırabilir (Chan ve ark. 2003).

Flavonoid antioksidan aktivitesinin mekanizması büyük ihtimalle radikal süpürücü olmasıdır ve DiOHF bu aktiviteleri artırdığı bildirilen yapısal özelliklere (B halkasındaki bir katekol grubu, C halkasındaki 3-OH grubu ve C2-C3 çift bağı) sahiptir (Chan ve ark. 2003). DiOHF, NADPH oksidaza bağlı süperoksit oluşumuna karşı inhibitör etkilere sahiptir (Jiang ve ark. 2008).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

Mevcut çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen 56 adet Wistar-albino türü erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma protokolü aynı merkezin etik kurulu tarafından onaylandı. Çalışmada kullanılan deney hayvanları 200-250 g ağırlığındaydı. Sıçanlar randomize olarak iki grupta 8'er diğer dört grupta 10' ar tane olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Deney hayvanları, yıkamak suretiyle her gün temizlenen özel çelik kafeslerde beslendi. Yemler özel çelik kaplarda, su cam biberonlarda (normal çeşme suyu) verildi. Hayvan yemleri, normal sıçan yemi (pelletler halinde) olarak Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi

Yem maddeleri	Yüzdesi (%)
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8
E-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

\*Vitamin karması: Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karomasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolin klorit bulunmaktadır.

\*\*Mineral karması: Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyumdan oluşmuştur.

Deney hayvanları her gün 10 g/ 100 g vücut ağırlığı yemle beslendiler. Deney hayvanları 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ve standart oda sıcaklığı (21±1 °C) sağlanan ortamda tutuldu.

Sıçanlarda cerrahi işlemler, intraperitoneal olarak enjekte edilen ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ve Xylazine (rompun) (5 mg/kg) ile anestezi uygulandıktan sonra gerçekleştirildi. Böbrek iskemi/reperfüzyonu uygulanan gruplarda hayvanlarda midline laparotomi yapıldı ve sol böbrekte hilus seviyesinde vasküler klemp yardımıyla sol renal arterde kan akışı durdurulmak suretiyle 1 saat iskemi uygulandı.

1- Kontrol (n=8): Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. Hayvanlara genel anestezi uygulayarak kardiyak punksiyonla kanları alındı. Servikal dislokasyonla öldürülen hayvanların böbrek dokuları alındı.

2- Sham-Kontrol (n=8): Deney hayvanlarına genel anestezi (Ketamin+Rompun) uygulandıktan sonra 3',4'-Dihydroxyflavonol (DiOHF)' un çözücü sıvısından 30 mg/kg dozunda periton içine enjekte edildi ve böbrek alanı cerrahi olarak açılıp kapatıldı. Daha sonra anestezi altında öldürülen hayvanların kan ve böbrek dokuları alındı.

3- Renal İskemi grubu (n=10): Genel anestezi uygulanan hayvanların sol böbrekleri bir saat iskemiye tabi tutuldu. Bu sürenin sonrasında hayvanlar öldürülerek kan ve böbrek dokuları alındı.

4- Renal İskemi + Reperfüzyon Grubu (n=10): Anestezi uygulanan hayvanların sol böbrekleri 1 saat iskemiye maruz bırakıldı ve bunu takiben 1 saat reperfüzyon uygulandı. I/R' un ardından öldürülen hayvanların kan ve böbrek dokuları alındı.

5- DiOHF + Renal İskemi (n=10): Renal iskemi öncesi 30 mg/kg dozunda periton içi DiOHF (30 mg/kg) uygulaması yapıldı ve sol böbreklerde 1 saat süreyle iskemi oluşturuldu. Bu sürenin bitiminde deney hayvanları öldürülerek kan ve böbrek dokuları alındı.

6- Renal İskemi + DiOHF + Reperfüzyon Grubu (I/R) (n=10): Anestezi altındaki deney hayvanlarının sol böbreklerinde 1 saat iskemiye takiben periton içi DiOHF (30 mg/kg) takviyesi yapıldıktan sonra 1 saat süreyle reperfüzyon işlemi uygulandı. Bu sürenin hemen ardından hayvanlar öldürülerek kan ve böbrek dokuları alındı.

### **3.2. Dihydroxyflavonol Uygulaması**

100 mg DiOHF (Indofine Chemical Co., U.S.A.) dimetil sülfoksit (2 ml) + polietilen glikol (11 ml) + distile su (7 ml) karışımı içinde çözdürüldü. Deney hayvanlarına 30 mg/kg dozunda DiOHF periton içi uygulandı (Wang ve ark. 2004).

### **3.3. Kan ve Böbrek Dokusu Alınması**

Anestezi altındaki hayvanlardan kardiyak ponksiyonla 3-4 ml kan EDTA' lı tüplere alındı. EDTA' lı tüplerdeki kan +4 °C' e ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 3000 rpm' de 10 dakika. santrifüj edildi ve ayrılan plazma örnekleri analizleri yapılmaya kadar -80 °C' de muhafaza edildi. Plazma alındıktan sonra kalan eritrositler hacminin 3-4 katı % 0.9' luk NaCl çözeltisi ile sulandırılarak 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı dökülüp aynı işlem 3 kez tekrarlanarak yıkama işlemi tamamlandı. Alınan böbrek dokuları da çalışma yapılmaya kadar kuru olarak -80 °C' de saklandı.

### **3.4. Kan ve Doku Analizleri**

#### **3.4.1. Doku Protein Tayini**

Doku proteini btprodad total protein test kiti PRO-10300 kullanılarak spektrofotometrik yöntemle analiz edildi. Yaş doku tartıldıktan sonra parçalara ayrılarak tüplere konuldu ve +4°C'de Misonix's Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında yaklaşık %10'luk homojenat olacak şekilde 150 mM KCl (potasyum klorür) içinde parçalandı. Homojenat 3000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. 50 µl süpernatant 1 ml sodyum sülfat üzerine eklendi ve bunlar karıştırıldıktan sonra üzerlerine 1 ml biüret ayırıcı ilave edildi. Absorbansı 5 dakika bekledikten sonra kör örneğine karşı 505 nanometrede spektrofotometrede okundu. Kör örneği, 1ml sodyum sülfat, 50 µl distile su ve 1 ml biüret ayırıcı karıştırılarak hazırlandı.

Biüret ayırıcı, 2.5 g bakır sülfat, 10 g sodyum potasyum tartaratın distile suda çözülerek, üzerine 2.5 N NaOH' dan 350 ml ilave edilip distile su ile 1 litreye tamamlanması ile hazırlandı.

#### **3.4.2. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi**

Doku MDA düzeyi Uchiyama ve Mihara (3) yöntemiyle gerçekleştirildi. Analizi yapılacak olan doku tartıldıktan sonra parçalara ayrılarak tüplere konuldu ve +4°C'de Misonix's Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında yaklaşık %10'luk homojenat olacak şekilde 150 mM KCl'de parçalandı. Homojenize doku %8'lik 2 ml HClO<sub>4</sub>'ye konularak 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. 0.5 ml süpernatanta 3ml %1'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve 1 ml % 0.675'lik TBA (tiyobarbiturik asit) ilave edilerek 90 °C' lik

su banyosunda 45 dakika inkübasyon yapıldı. Karışımın soğutulmasından sonra, MDA-TBA kompleksi 4 ml n-butanol ile ekstrakte edildi ve n-butanole karşı absorbansı 532 nm' de okundu. Konsantrasyon  $c=108.9A$  olarak sağlandı. Sonuç mg/g protein olarak tanımlandı (Uchiyama ve Mihara 1977).

### **3.4.3. Doku Glutasyon Analizi**

GSH düzeylerini belirlemek için MDA için tanımlandığı gibi doku  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 150 mM KCl'de homojenize edilerek 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Örneklerde GSH miktarları Ellman's metoduyla ölçüldü. 200 $\mu\text{l}$  süpernatant için, 8 ml fosfat buffer (pH 6.8), 78 $\mu\text{l}$  1 N NaOH ve 100 $\mu\text{l}$  Ellman's solüsyonu ilave edilerek 5 dakika bekletildikten sonra absorbans distile suya karşı 412 nm'de okundu. Aktivite  $a=(A_{\text{standard}}/A_{\text{örnek}}) \times C_{\text{standard}}$  olarak hesaplandı. Burada  $c_{\text{standard}}=15.34$  g/100 ml olarak verildi. Doku proteini Biüret metoduyla elde edilerek değerler nmol/g protein olarak sunuldu (Ellman, 1959).

### **3.4.4. Plazma Malondialdehit Tayini**

Bir deney tüpünde 2.5 ml % 10'luk TCA (trikloroasetik asit) üzerine 0.5 ml plazma numunesi alındı. Tüpler ağızları kapatılarak  $90^{\circ}\text{C}$  su banyosunda 15 dakika bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. 2 ml süpernatant başka bir tüpe aktarılarak üzerine % 0.675' lik TBA' dan 1 ml ilave edilerek 15 dakika süreyle tekrar sıcak su banyosuna alındı. Numuneler soğuduktan sonra absorbansları spektrofotometrede kör örneğe karşı 532 nm' de okundu (Draper ve Hadley, 1990).

Kör hazırlanması: 2.5 ml %10' luk TCA üzerine 0.5 ml distile su koyuldu ve vorteks ile karıştırıldı. Tüp  $90^{\circ}\text{C}$  su banyosunda 15 dakika bekletilip, soğuduktan sonra 10 dakika santrifüj edildi. 2 ml süpernatant üzerine 1 ml TBA eklenerek 15 dakika süreyle sıcak su banyosuna alındı.

### **3.4.5. Eritrosit Glutasyon Tayini**

Yıkanmış eritrositten 45  $\mu\text{l}$  alınarak distile su ile %10 oranında sulandırıldı. %10'luk sulfosalisilik asit ilave ettikten sonra karışım 1 saat buzda bekletildi. Buzdan alındıktan sonra 4000 rpm' de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın 200 $\mu\text{l}$ 'si alınarak üzerine 8 ml pH'ı 6.8 olan fosfat tamponu, 78  $\mu\text{l}$  1 N NaOH ve

100µl Ellman ayracı ilave edildi. Karışım 5 dakika bekletildikten sonra 412 nm' de kör örneği tüpüne karşı okundu.

Ellman solüsyonu, 100 mg 5'-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic asitin (DTNB; Sigma, katalog no. D-8130) pH 7.8 fosfat tamponunun 100 ml' sinde çözdürülmesiyle hazırlandı. GSH standardı 15.34 mg/100 ml olarak ve 15.34 mg indirgenmiş glutatyonun (Sigma, katalog no: G-4251) 1 mM sodyum EDTA'nın 100 ml' sinde çözdürülmesiyle hazırlandı (Atroschi ve Sandholm, 1981).

#### **3.4.6. İstatistik**

İstatistik analiz SPSS istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standard sapma olarak tanımlandı. Gruplar arası karşılaştırma için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı ve  $p < 0.005$  seviyesi için Mann-Whitney U-testi uygulandı.  $p < 0.005$  seviyesi istatistik olarak önemli kabul edildi.

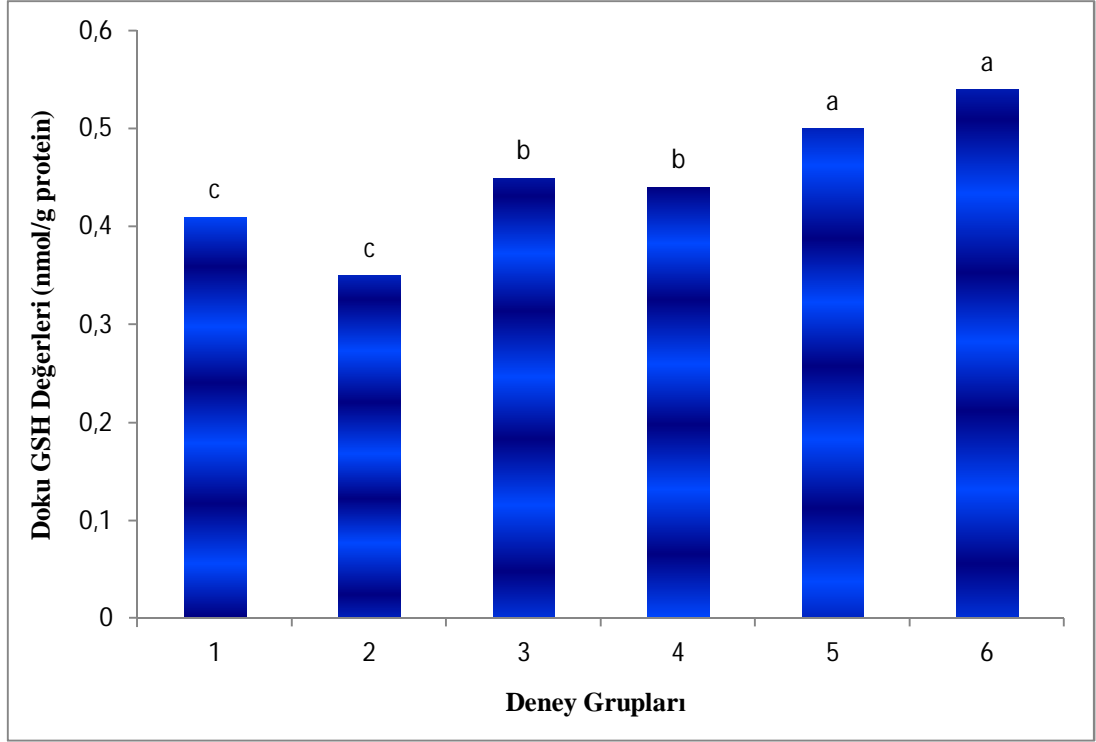
#### 4. BULGULAR

Çalışma gruplarının doku MDA ve GSH değerleri Tablo 4.1' de verilmiştir. Çalışma gruplarının doku GSH değerleri incelendiğinde en yüksek değerlere Grup 5 ( $0.50\pm 0.07$  nmol/g protein) ve Grup 6' nın ( $0.54\pm 0.17$  nmol/g protein) sahip olduğu görülmektedir ( $P<0.005$ ). Grup 3 ve 4' deki renal iskemi ve renal iskemi-reperfüzyon gruplarının GSH değerleri ( $0.45\pm 0.10$  ve  $0.44\pm 0.09$  nmol/g protein) Grup 1 ve 2'ye ( $0.41\pm 0.06$  ve  $0.35\pm 0.06$  nmol/g protein) göre artış göstermektedir. Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 3 ile Grup 4 arası GSH değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grafik 4.1).

En yüksek doku MDA değerleri ( $0.33\pm 0.03$  mg/g protein) iskemi grubu olan Grup 3' de elde edildi ( $P<0.005$ ). İskemi-reperfüzyon grubunun (Grup 4) ( $0.29\pm 0.09$  mg/g protein) doku MDA değerleri Grup 3' den düşük ( $p<0.005$ ), diğer grupların tamamından yüksekti ( $p<0.005$ ). Grup 1, 2, 5 ve 6' nın doku MDA değerleri birbirinden farklı değildi (Tablo 4.1, Grafik 4.2).

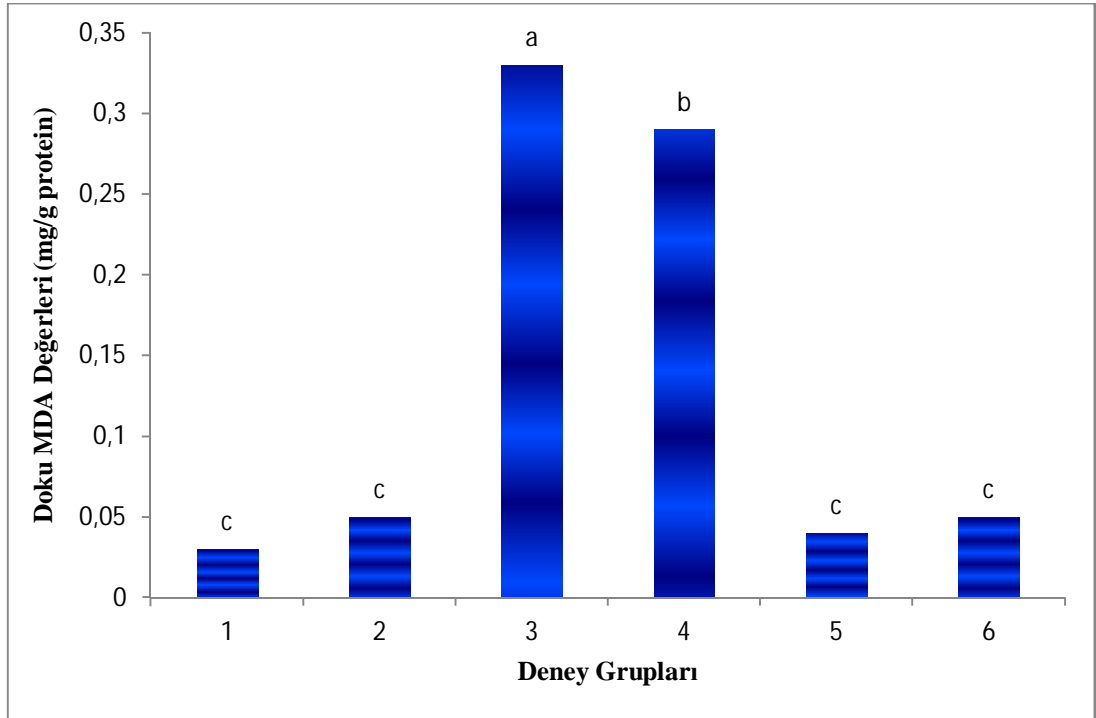
**Tablo 4.1.** Çalışma gruplarının doku GSH ve MDA değerleri

Gruplar	GSH (nmol/g protein)	MDA (mg/g protein)
1-Kontrol grubu (n=8)	$0.41\pm 0.06$	$0.03\pm 0.00$
2-Sham-kontrol grubu (n=8):	$0.35\pm 0.06$	$0.05\pm 0.02$
3-Renal İskemi grubu (n=10)	$0.45\pm 0.10$	$0.33\pm 0.03$
4-Renal iskemi-reperfüzyon grubu (I/R) (n=10)	$0.44\pm 0.09$	$0.29\pm 0.09$
5- 3',4'-Dihydroxyflavonol (DiOHF) + Renal İskemi	$0.50\pm 0.07$	$0.04\pm 0.00$
6-Renal İskemi + 3',4'-Dihydroxyflavonol (DiOHF) + Reperfüzyon Grubu (I/R) (n=10)	$0.54\pm 0.17$	$0.05\pm 0.02$



**Grafik 4.1.** Doku GSH değerleri

$a>b>c$  ( $p<0.005$ )



**Grafik 4.2.** Doku MDA değerleri

$a>b>c$  ( $p<0.005$ )

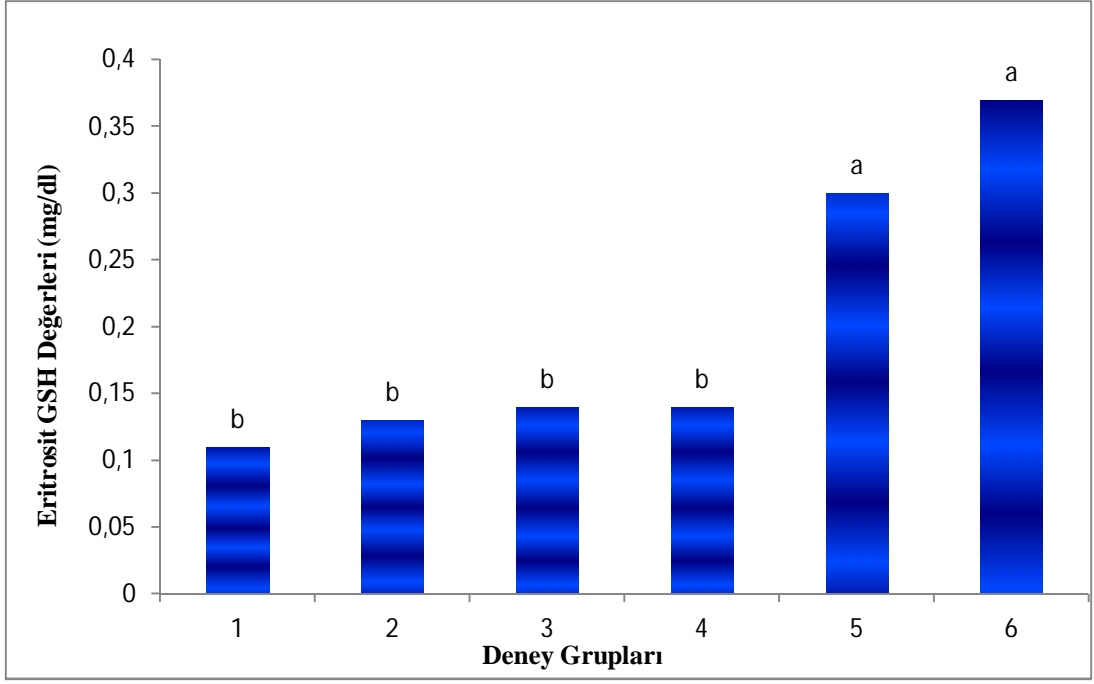
Deney gruplarında eritrosit GSH ve plazma MDA değerlerine bakıldı. Bu değerler Tablo 4.2’ de gösterilmiştir. Eritrosit GSH değerlerine bakıldığında gruplararası en yüksek değerlere DiOHF’ un uygulandığı Grup 5 ( $0.30\pm 0.15$  mg/dl) ve Grup 6 ( $0.37\pm 0.16$  mg/dl) sahipti. Grup 1, 2, 3 ve 4’ ün eritrosit GSH değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grafik 4.3).

Plazma MDA değerleri incelendiğinde gruplararası en yüksek değerlere I/R uygulanan Grup 4’ ün ( $0.31\pm 0.07$  nmol/ml) sahip olduğu bulundu. Grup 3’ deki (renal iskemi) plazma MDA seviyesi ( $0.14\pm 0.05$  nmol/ml) ise Grup 4’ den düşük ( $p<0.005$ ), diğer tüm gruplardan ise daha yüksekti ( $p<0.005$ ). Grup 1, 2, 5 ve 6’nın plazma MDA düzeyleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde değildi (Grafik 4.4).

**Tablo 4.2.** Çalışma gruplarının eritrosit GSH ve plazma MDA değerleri

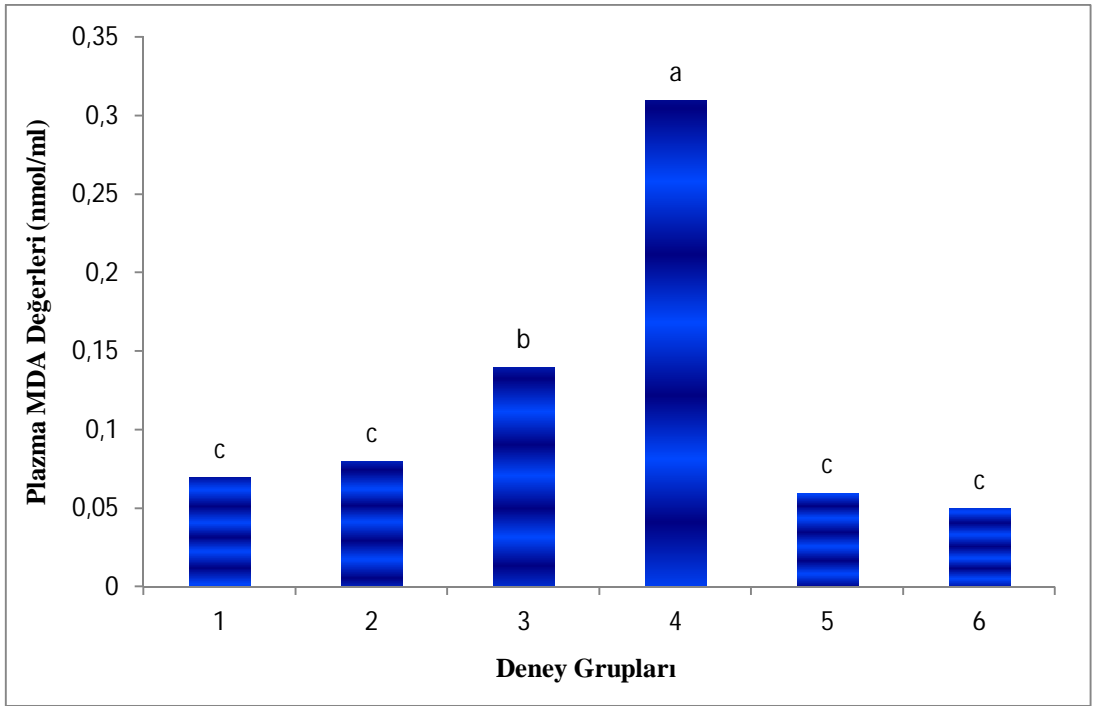
<b>Gruplar</b>	<b>GSH (mg/dl)</b>	<b>MDA (nmol/ml)</b>
<b>1-Kontrol grubu (n=10)</b>	0.11±0.03	0.07±0.02
<b>2-Sham-kontrol grubu (n=10):</b>	0.13±0.04	0.08±0.02
<b>3-Renal İskemi grubu (n=10)</b>	0.14±0.08	0.14±0.05
<b>4-Renal iskemi-reperfüzyon grubu (I/R) (n=10)</b>	0.14±0.07	0.31±0.07
<b>5- 3',4'-Dihydroxyflavon (DiOHF) + Renal İskemi</b>	0.30±0.15	0.06±0.02
<b>6-Renal İskemi + 3',4'-Dihydroxyflavon (DiOHF) + Reperfüzyon Grubu (I/R) (n=10)</b>	0.37±0.16	0.05±0.01





**Grafik 4.3.** Eritrosit GSH değerleri

a>b (p<0.005)



**Grafik 4.4.** Plazma MDA değerleri

a>b>c (p<0.005)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İskemi-reperfüzyon yüksek mortalite ve morbidite ile karakterize akut böbrek hasarına sebep olur. Kan akımının azalması ile meydana gelen direkt hasara ilave olarak I/R hasarı, I/R sırasında bol miktarda üretilen ROS, sitokinler ve kemokinler gibi çok sayıda faktör ile ilişkilidir (Kim ve ark. 2010). İskemik dokunun canlılığını devam ettirebilmesi için reperfüzyonun gerekli olmasına rağmen, reperfüzyon ilave olarak hücre hasarına yol açar. Reperfüzyon, böbrek hücrelerinin hasarına ve en sonunda apoptoz ve nekroz ile hücrelerin ölümüne yol açan kompleks ve birbiriyle ilişkili bir dizi olayları başlatır (Sharples ve ark. 2004). ROS seviyesi özellikle reperfüzyon fazında artar ve süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksinitrit birikimi meydana gelir. Oksidatif stres neticesinde ortaya çıkan mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, enerji eksikliği ve hücrel kalsiyum homeostazının bozulması hücrel proteinlere, DNA ve membran lipitlerine zarar veren daha fazla ROS oluşumuna neden olur (Kunduzova ve ark. 2004; ArunaDevi ve ark. 2010). İskemi ve reperfüzyon dönemi sırasında ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümü ve mitokondride serbest elektronların artışı ile böbrekte süperoksit üretimi önemli ölçüde artar (Hirayama ve ark. 2005). Böbrek, lipid kompozisyonundaki uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin fazla oluşundan dolayı ROS' un sebep olabileceği hasar oluşumuna hassas bir organdır (Ozbek 2012). Bu çalışmada insan böbreğiyle anatomik ve fonksiyonel benzerlikleri bulunan ve I/R çalışmalarında en yaygın kullanılan hayvan modellerinden olan sıçanlar tercih edildi.

Fizyolojik koşullar altında glomerüllerin çoğunluğunu içeren renal korteks renal kan akımının büyük kısmını alırken, medulla % 10 kadarını alır. İskemi sırasında kan akımındaki azalma böbreğin her tarafında aynı değildir. Böbrek kan akımındaki düşüş medullanın dış kısmında kortekste olduğundan daha belirgindir (Munshi ve ark 2011). İnsan ve hayvanlarla yapılan birtakım çalışmalarda I/R sırasında medullanın dış kısmında fonksiyon bozuklukları meydana geldiği gözlenmiştir. Mikrovasküler permeabilite glikokaliksin dağılmasıyla lökosit-endotel etkileşimleri, aktin hücre iskeletinin yıkımı ile hücre etkileşimlerinin değişimi ve perivasküler matriksin bozulması ile meydana gelmektedir. Bu etkileşim hemokonsantrasyon ve vasküler konjesyonla sonuçlanır. Bu indüklenmiş hipoksik koşullarda böbrek, intrarenal kan akımını sürdürmek ve doku oksijenlenmesini

sağlamak için çok sayıda anjiojenik ve vazoaaktif faktörler salgılayarak karşılık verir (Sabbahy ve Vaidya 2011).

Vazodilatör kaynaklarda azalma ile gösterilen I/R, vasküler ve organ hasarına sebep olur. Kan damarlarındaki bu dilatasyon kapasitesindeki azalma, lökositlerin endotel hücrelerine adezyonu ve bunun sonucunda meydana gelen kapillerlerin tıkanmasından kaynaklanır (Yap ve ark. 2011). Böbrek I/R hasarının patofizyolojisi hem iskemik hasarın sebep olduğu direkt hücresel hasarı hem de inflamatuvar yolların aktivasyonu nedeniyle sonradan oluşan fonksiyon bozukluğu/hasarı kapsamaktadır (Yuan ve ark. 2011). İnflamatuvar aracılar böbrek I/R hasarı patogeneğinde temel rolü oynarlar. Medullanın dış kısmında nispeten daha yüksek oksijen tüketimi nedeniyle bu bölge ciddi vasküler konjesyona uğrar. I/R sonrası lökosit ve endotel hücre etkileşiminin akut böbrek yetmezliğinin inflamatuvar progresyonunda bir rol aldığı tanımlanmıştır (El Sabbahy ve Vaidya 2011).

Nitrik oksit, böbrek kan akımını artıran proglomerüler arterlerde gevşemeye neden olur. Böbrek I/R sırasında ROS endotel bütünlüğünü bozabilir ve NO üretimini etkileyebilir. Bu da böbrek vasküler direncinde artışa neden olur. Üstelik, NO peroksinitrit kaynağı süperoksit ile etkileşir ve hücresel membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olur (Rhoden ve ark. 2002, Chander ve Chopra 2006). Vasküler reaktivite üzerine hücre kültürlerinde, hayvan ve insan çalışmalarında askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol, glutatyon, tetrahidrobiopterin ve N-asetilsistein gibi bazı antioksidanların endotelial fonksiyonunu ve NO biyoetkisini artırdığı gösterilmiştir (Nedeljkovic ve ark. 2003). DiOHF, yükseltgenmiş ROS varlığında akut olarak nitrik oksit aktivitesini koruyan etkili bir antioksidandır (Leo ve ark. 2011). Yaptığımız çalışmada, deney hayvanlarının böbreklerinde bir saat süreyle oluşturulan in vivo unilateral iskemi ve I/R sonucunda oluşacak lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma mekanizması üzerine DiOHF' un etkisini belirlemek amaçlandı. DiOHF' un oksidatif stresin neden olduğu I/R hasarı üzerine olası etkilerinin iskemi ve/veya I/R dönemlerinin hangisinde meydana geldiğini tespit etmek üzere deney grupları oluşturuldu. Çalışmada sıçanlara uygulanan böbrek iskemi ve I/R sonucunda oluşabilecek oksidatif hasarı belirleyebilmek için lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA tayini yapıldı. Bu hasara karşı gelişebilecek antioksidan savunmayı gösterebilmek için GSH ve toplam protein düzeyleri saptandı.

Woodman ve Chan (2004)' nin sıçan arka ayaklarında I/R oluşturduğu modelde DiOHF koruyucu etkisini reperfüzyon sırasında göstermiştir. Bu bulgudan farklı olarak sıçanlarda unilateral böbrek I/R oluşturduğumuz çalışmamızda DiOHF' un koruyucu etkisi farklı olarak hem iskemi hem de I/R grubunda gözlemlendi. DiOHF' un uygulandığı iskemi ve I/R gruplarında, oksidatif hasar sonucu artmış doku ve plazma MDA düzeylerinin DiOHF takviyesi ile tekrar kontrol düzeylerine düşmesi ve takviye yapılan grupların doku ve eritrosit GSH düzeylerinde artış meydana gelmesi DiOHF' un iskemi ve reperfüzyon sırasındaki koruyucu etkisinin göstergesi olarak kabul edildi.

Reaktif oksijen türleri çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile hücre membranlarına zarar vererek hücre hasara neden olur. Peroksidasyon plazma membranlarında ve mitokondri ve lizozom membranları gibi organel membranlarında meydana gelir. Lipid peroksidasyonu, membran geçirgenliğinde artış, membran iyon pompalarının bozulması, taşıma işlevlerinin kaybı, mitokondride oksidatif fosforilasyonun bozulması ve lizozomdan hidrolitik enzimlerin sızması ile membran yapı ve fonksiyonunu değiştirir (Doi ve ark. 2004). Kan damarlarında ROS' un çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan kaynakları bulunmaktadır. Vaskülatürdeki ROS' un özellikle de süperoksitin primer biyokimyasal kaynağı membran bağlantılı NADPH oksidaz enzim kompleksi gibi görünmektedir. Bu sistem bir elektron donörü olarak NADPH kullanarak moleküler oksijenin redüksiyonunu katalizler, süperoksit oluşturur (Nedeljkovic ve ark. 2003).

Oksidatif stres, hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri artışı etkisiyle oluşan bir doku hasarı olarak tanımlanır. ROS fizyolojik olarak sürekli üretilir fakat antioksidatif enzimler (SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz), C ve E vitamini ve glutatyon gibi antioksidan savunma sistemi ile etkili şekilde elimine edilir. Ancak, ROS üretimi antioksidan koruma mekanizmasını aşarsa, ROS karbonhidratlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel makromoleküllerle reaksiyon verir (Ha ve ark. 2004). Bir hidrojen atomunun alınmasıyla lipitlerin oksidatif hasarı, aldehitler, ketonlar, alkol ve eter gibi geniş bir yelpazede farklı yıkım ürünlerinin oluşumuyla lipid radikallerinin oluşumuna ve yayılmasına sebep olur (Noiri ve ark. 2001). Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin en önemli kaynaklarından biridir. Lipid peroksidasyonu hücrel membranların oksidatif yıkımına yol açan otokatalitik bir mekanizmadır. MDA ve HNE en önemli

aldehit metabolitleridir. Lipid peroksidasyonunun zararlı etkileri temizleyici antioksidan sistemlerin artırılması ile önenebilir (Yuan ve ark. 2011).

SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin ve peroksiredoksin gibi çeşitli proteinler süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerini temizleyici olarak işlev görürler. Bu protein antioksidanlar, hücre içi askorbat ve glutatyonun da dahil olduğu protein olmayan radikal temizleyiciler ile artırılır (Finkel 2003). SOD gibi enzimatik antioksidanlar, redükte glutatyon ve koenzim Q10 gibi farklı antioksidan sistemler, karotenoidler ve tokoferoller gibi diğer antioksidanlar I/R' nin sebep olduğu serbest radikal aracılı hasara karşı önemli doğal koruyucu ajanlardır (Rhoden ve ark. 2002). SOD ve E vitamini gibi antioksidanlar reperfüzyon hasarını azaltmada her zaman başarılı değildir ve bunların farmokinetikleri terapötik faydalarını kısıtlar. Büyük bir molekül olan SOD' un hücrel permeabilitesi sınırlıdır ve yarı ömrü kısadır. E vitamini etkili hücrel konsantrasyona yavaşça ulaşır ve bu yüzden akut uygulamalar için uygun değildir (Chan ve ark. 2003). Çalışmamızda antioksidan olarak kullandığımız sentetik flavonol DiOHF, uzun yarı ömre sahip olmasıyla tek doz uygulamasıyla dahi koruyucu etkilerini ortaya koymuştur.

İskemi, ROS' a karşı hücrel savunma enzimlerinin aktivitesini azaltır ve reperfüzyon veya oksijenin girişi, ROS üretimi artışıyla hassas oksidan/antioksidan dengesini daha da bozar (Malakul ve ark. 2011). Aşırı ROS üretimi lipid peroksidasyonunu, antioksidan enzimlerin inaktivasyonunu, hücre iskeleti bozulmasını, hücrel bütünlüğü, DNA bozulmasını, lökosit aktivasyonunu, endotelial hücre hasarını ve sitokin üretimini etkiler. Çeşitli klinik ortam ve deneysel modellerde doku hasarını önlemek için antioksidan ajanlar kullanılmıştır (Kim ve ark. 2010). Antioksidan polifenolik bir bileşik olan resveratrolün I/R' a bağlı böbrek hasarı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada resveratrolün MDA ve GSH parametreleri üzerine etkilerine bakılarak I/R' a bağlı böbrek hasarını azalttığı tespit edilmiştir (Şener ve ark. 2006). Edaravone hidroksil ve peroksil radikallerini güçlü bir temizleyicisidir ve lipid peroksidasyonunu engellemek için antioksidan aktiviteye sahiptir. Renal arterin 45 dakika klemplenmesi ile iskemik akut böbrek yetmezliği oluşturulduktan sonra edaravone takviyesinin böbrek tübül hücrelerinde intraselüler ROS' u temizleyerek ve hücre membranları lipid peroksidasyonunu engelleyerek I/R hasarını zayıflattığı gösterilmiştir (Doi ve ark. 2004). Deneysel iskemik böbrekte E ve C vitamini antioksidanlarının ilavesiyle

oksidatif stres yolaklarının kronik blokajı böbrek hemodinamiklerini artırır ve oksidatif stresi, inflamasyonu ve fibrozisi azaltır (Lerman ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda da daha önceki I/R çalışmalarında (Chan ve ark. 2003; Singh ve ark. 2005) antioksidan etkileri saptanmış olan sentetik flavonoid DiOHF' un böbrek I/R hasarını önlenmede antioksidan etkilerini belirlemek amaçlandı.

Bitki kaynaklı bileşiklerin büyük bir grubu olan flavonoidlerin biyolojik etkilerini plazma LDL seviyelerini düşürerek, trombosit agregasyonunu inhibe ederek, serbest radikalleri temizleyerek ve hücre proliferasyonunu azaltarak gösterdiği bilinmektedir (Woodman ve Malakul 2009). Flavonoidlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada vazorelaksasyonda sentetik flavonol DiOHF' un quersetin gibi çok sayıda flavon ve flavonollerden daha güçlü olduğu gösterilmiş (Woodman ve Malakul 2009). Ayrıca, Woodman ve arkadaşlarının (2005) sentetik flavon ve flavonollerin yapı-aktivitesi üzerine yapmış olduğu bir çalışmada DiOHF' un en yüksek vazorelaktan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. DiOHF yüksek oranda lipitte çözünebilir ve bu sayede hücre içine girerek buradaki ROS' u temizleyebilir (Qin ve ark. 2011). Polifenollerin böbrek koruma etkisinin başlıca serbest radikal temizleme, metal şelasyonu ve enzim modülasyonu gibi çok çeşitli biyolojik etkilerinden dolayı olabileceği düşünülmektedir (Rodrigo ve Bosco 2006). DiOHF' un yapısında bulunan 3-OH grubunun antioksidan aktivitede önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Jiang ve ark. 2008). DiOHF' un vasküler ve fagositik NADPH oksidazlardan dolayı süperoksit birikimini güçlü şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. DiOHF' un vasküler düz kas hücrelerinde süperoksit birikimini bastırıcı etkisi, sadece milimolar aralıkta etkili olan yaygın olarak kullanılan bir antioksidan olan askorbik asitten daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Jiang ve ark. 2008).

DiOHF' un vücudun farklı kısımlarındaki I/R hasarı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Sıçan arka ayaklarında oluşturulan I/R hasarından sonra DiOHF takviyesinin antioksidan etki göstererek NO biyoyararlanımını artırdığı ve vasküler fonksiyonun geliştiği öne sürülmektedir (Chan ve ark.2003; Woodman ve Chan 2004). Ayrıca, DiOHF' un koyunlarda koroner oklüzyondan sonra miyokard infarktüsü azalttığı bulunmuştur (Wang ve ark. 2004). Qin ve ark. (2011) çalışmalarında DiOHF' un miyokardiyal I/R hasarında destekleyici bir terapötik ajan olarak potansiyele sahip olduğunu göstermişler ve

hücrel hasarın azaltılmasında sadece reperfüzyon sırasında antioksidan flavonol takviyesinin iskemi öncesi ve sonrasında verilmesi kadar etkili olduğunu tespit etmişlerdir. DiOHF' un miyokardiyal I/R hasarındaki etkisi üzerine yapılan bu çalışma sonuçları bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir.

GSH oksidatif stres gibi çeşitli zararlı uyarılara karşı hücrel koruma mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Düşük molekül ağırlıklı GSH (indirgenmiş glutasyon) sitoplazmada serbest radikallerin önemli bir temizleyicisidir (Hensley ve ark. 2000, Şener ve ark. 2006). Glutasyon, direkt olarak ROS' u temizleyerek ve aynı zamanda ROS yıkımını katalizleyen glutasyon peroksidaz için bir substrat olarak önemli bir hücre içi antioksidandır (Nitescu ve ark. 2006). GSH hücre ve organel seviyesinde nitroksit biyoredüksiyonunda önemli bir role sahiptir (Hirayama ve ark. 2005). Hücre içi glutasyonun ve diğer antioksidan bileşiklerin nispeten yüksek konsantrasyonları güçlü radikal temizleme kapasitesi sağlar (Dröge 2002).

Daha önce yapılan bazı benzer çalışmalardan (Scaduto ve ark. 1988; Slusser ve ark. 1990; Aydoğdu ve ark. 2005; Nitescu ve ark. 2006) farklı olarak bizim çalışmamızda sıçanlarda in vivo böbrek I/R hasarının böbrek GSH miktarını artırdığı bulundu. Bu farklılığın çalışmamızdaki I/R uygulama sürelerinin diğerlerinden farklı olmasından oluşabileceği ve bu çalışmadaki böbrek dokusu GSH seviyelerinin iskemik ve iskemik-reperfüze gruplarda artış göstermesinin nedeninin lipid peroksidasyonuna karşı savunma cevabının artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İskemi ve I/R gruplarının (grup 3 ve 4) yanı sıra DiOHF ilavesi yapılan iskemi ve I/R gruplarında (grup 5 ve 6) da böbrek dokusunun GSH seviyelerinde de artış gözlemlendi. DiOHF ilavesinin yapıldığı gruplarda doku GSH seviyesi artışı, DiOHF' un böbrek dokusunda lipid peroksidasyonuna karşı savunma mekanizmasını daha da güçlendirdiğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Bir antioksidan olan N-asetilsisteinin böbrek I/R hasarına karşı etkilerine bakmak üzere sıçan böbreklerine 60 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulanan bir çalışmada GSH seviyelerinin I/R grubunda düşüş gösterdiği bulunmuştur (Aydoğdu ve ark. 2005). Bu bulgu, I/R grubunda artmış doku GSH düzeyleri saptadığımız çalışmamızla uyumlu değildir. Bu ve diğer bazı I/R çalışmaları (Scaduto ve ark. 1988; Slusser ve ark. 1990; Aydoğdu ve ark. 2005; Nitescu ve ark. 2006) incelendiğinde, bu çalışmalardaki reperfüzyon sürelerinin bizim çalışmamızda

uyguladığımız reperfüzyon süresinden daha uzun olduğu göze çarpmaktadır. Bizim çalışmamızdaki bir saatlik reperfüzyon sırasında oluşan serbest radikal düzeyinin antioksidan savunma cevabını artırarak GSH düzeyinin yükselmesine neden olduğu tahmin edilmektedir. Diğer çalışmalardaki daha uzun reperfüzyon süreleri ve buna bağlı olarak daha fazla serbest radikal oluşumu antioksidan mekanizmayı zayıflatarak GSH düzeylerinin düşmesine yol açmış olabilir. Bir diğer çalışmada (Mandel ve ark. 1990), böbrek proksimal tübülleri 40 dakika anoksi ve 40 dakika reoksijenizasyona maruz bırakılarak GSH seviyeleri incelenmiş ve bu çalışmada bizim bulgularımıza paralel olarak iskemi durumunda GSH düzeylerinin artış gösterdiği bulunmuştur.

Eritrositler sürekli olarak hücre içi ve hücre dışı serbest radikallere maruz kalır ve bu yüzden çoklu doymamış yağ asitlerince zengin olan eritrosit zarları lipid peroksidasyonuna uğrar (Özşahin ve ark. 2011). Yaptığımız çalışmada doku GSH parametresi iskemi, I/R ve DiOHF takviyesi yapılan gruplarda artış göstermesine rağmen, eritrosit GSH seviyelerinin yalnızca DiOHF takviyesi yapılan gruplarda artış gösterdiği tespit edildi. Bu durum DiOHF takviyesinin eritrositlerde antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirdiğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller ile hücrelerin ve mitokondrilerin lipid membranları arasındaki reaksiyonun bir sonucudur (dos Santos ve ark. 2013). Hücrel membranların yıkımına ve bunların bozulmasına yol açan otokatalitik bir süreç olan lipid peroksidasyonu ile ilişkili olarak doku I/R' u toksik ve reaktif ürünlerin oluşumuna ve hücre ölümüne neden olabilir. Serbest radikal üreten bir sistem olarak lipid peroksidasyonu I/R' nun tetiklediği doku hasarı ile sıkı ilişkilidir (Hekimoğlu ve ark. 2013). Peroksil radikalleri diğer lipidlerden hidrojen atomlarını uzaklaştırarak bir zincir reaksiyonu oluşturur ve böylece lipid peroksidasyonunu yaygınlaştırır (Doi ve ark. 2004). I/R çalışmalarında oksidatif hasarın göstergesi olarak lipid peroksidasyonu sonucu oluşan toksik aldehytlerden MDA sıklıkla incelenen bir parametredir (Kunduzova ve ark. 2004; Hekimoğlu ve ark. 2013). TBARS testi MDA miktarını belirlemede yaygın olarak kullanılan bir testtir (Singh ve ark. 2005; Kim ve ark. 2010; dos Santos ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda da böbreklerde I/R oluşturarak lipid peroksidasyonunun yol açtığı oksidan hasarı belirlemek için TBARS testi ile MDA düzeylerine bakıldı.



I/R hasarının, MDA ve NO gibi oksidasyon ürünlerinin birikmesine, antioksidan enzimlerde değişimlere ve apoptozisin indüklenmesine neden olduğu bulunmuştur (ArunaDevi ve ark. 2010). MDA seviyesinin yükselmesi, büyük olasılıkla peroksinitrit serbest radikal aktivitesinin artışıyla olumsuz etkide bulunabilir (Rhoden ve ark. 2002). MDA aynı zamanda DNA' a hasar vererek mutasyonlara neden olabilir (Halliwell 2006). DiOHF etkili biçimde süperoksidi temizler ve böylece bazal ve uyarılmış NO biyoyararlanımını artırır. Bu sayede I/R' dan kaynaklanan vasküler bozukluğa karşı koruma sağlayabilir (Woodman ve Chan 2004). Çalışmamızda I/R sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonunun incelenmesi amacıyla böbrek dokusunda MDA değerlerine bakıldı. Böbrekte iskeminin tam anlamıyla gerçekleşmiş olduğunun bir göstergesi olarak en yüksek MDA değerleri iskemi grubunda tespit edildi. Bunun yanı sıra I/R grubunun doku MDA seviyelerinde görülen artış, reperfüzyon sırasında da oksidan hasarın devam ettiğinin göstergesidir. DiOHF takviyesinin yapıldığı gruplarda doku MDA seviyesi kontrol gruplarındaki benzer seviyelere düşmüştür. I/R' la artmış doku MDA seviyelerinin DiOHF takviyesi ile tekrar azalması DiOHF' un oksidan hasarı önemli oranda zayıflattığını göstermektedir.

Tüm deney gruplarında lipid peroksidasyonun tespiti için doku MDA değerleri yanı sıra plazma MDA değerleri de incelendi. Doku MDA değerlerinde olduğu gibi plazma MDA değerlerinin de iskemi ve I/R gruplarında en yüksek seviyede olduğu tespit edildi. Yine benzer olarak DiOHF uygulanan grupların plazma MDA seviyelerinde kontrol grubunun sahip olduğu değerlere yakın düşüş gözlemlendi. Dokuda olduğu gibi plazmada da DiOHF takviyesi yapılan grupların plazma MDA seviyelerindeki düşüş ile DiOHF' un lipid peroksidasyonuna karşı göstermiş olduğu savunma mekanizması gösterilmiş oldu. Doku ve plazma MDA seviyelerindeki bulgulardaki tek farklılık, doku MDA seviyeleri en yüksek değerinin iskemi grubunda, plazma MDA seviyelerinin I/R grubunda en yüksek olmasıydı.

Araştırmanın bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, iskemi ve reperfüzyon hasarının tam anlamıyla oluştuğu oksidanların artışı ve antioksidan sistemin baskılanmasından görülmektedir. İskemi-reperfüzyon yaralanması sırasında dokudaki oksidan hasarın göstergesi olan MDA düzeylerinin artış gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu aktiviteye sahip olan GSH düzeyleri, dokuda antioksidan aktivitedeki artışın bir sonucu olarak yükselme

göstermiştir. Bunlara ilave olarak çalışmada kullanılan DiOHF'un hem oksidanları baskılayarak hem de antioksidanların etkisini artırmak suretiyle deneysel iskemi reperfüzyonda lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkiye sahip olduğu görülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Akhlaghi M, Bandy B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009; 46: 309-17.
2. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları. 1995, 38 Sağlık Dizisi:5, Konya, Türkiye, s: 15-33.
3. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmalarda glutatyonun rolü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2002; 22: 442-8.
4. ArunaDevi R, Lata S, Bhadoria BK, Ramteke VD, Kumar S, Sankar P, Kumar D, Tandan SK. Neuroprotective effect of 5,7,3',4',5'-pentahydroxy dihydroflavanol-3-O-(2''-O-galloyl)-beta-D-glucopyranoside, a polyphenolic compound in focal cerebral ischemia in rat. *Eur J Pharmacol.* 2010; 25: 205-12.
5. Atroshi F, Sandholm M. Red blood cell glutathione as a marker of milk production in finn sheep. *Res Vet Sci.* 1982; 33: 256-9.
6. Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında N-asetilsisteinin etkileri. *Fırat Tıp Dergisi.* 2005; 10(4): 151-5.
7. Bors W, Heler W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 343-55.
8. Chan ECH, Drummorol DR, Woodman OL. 3',4'-Dihydroxyflavonol enhances nitric oxide bioavailability and improves vascular function after ischemia and reperfusion injury in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42: 727-35.
9. Chander V, Chopra K. Protective effect of nitric oxide pathway in resveratrol renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Archives of Medical Research.* 2006; 37: 19-26.
10. Coşkunfırat N, Cengiz M, Yılmaz M. Akut böbrek yetersizliği üzerine hayvan modelleri. *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi.* 2010; 8(1): 38-45.
11. Cutrin JC, Zingaro B, Camandola S, Boveris A, Pompella A, Polı G. Contribution of g glutamyl transpeptidase to oxidative damage of ischemic rat kidney. *Kidney Int.* 2000; 57: 526-33.
12. Çimen MYB. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 1999; 19(5): 296-304.
13. Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair and replacement systems. *IUBMB Life.* 2000; 50(4-5): 279-89.

14. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 1503–20.
15. Doi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Noiri E. Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Kidney Int.* 2004; 65(5): 1714-23.
16. dos Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho Tde J, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, Pêgas KL, Katz B, Meyer FS, Marroni NA, Corso CO. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cir Bras.* 2013; 28(8): 568-73.
17. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-31.
18. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95.
19. Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010; 59(4): 459-69.
20. El Sabbahy M, Vaidya VS. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011; 3(5): 606-18.
21. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82: 70-7.
22. Finkel T. *Curr Opin Cell Biol.* 2003, 15: 247-54.
23. Güven E, Otkun G, Boyacıoğlu D. Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *Gıda.* 2010 35(5): 387-94.
24. Ha H, Park J, Kim YS, Endou H. Oxidative stress and chronic allograft nephropathy. *Yonsei Med J.* 2004; 45: 1049-52.
25. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141(2): 312-22.
26. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut.* 2002; 96: 67-202.
27. Hekimoglu A, Toprak G, Akkoc H, Evliyaoğlu O, Özekinci S, Kelle İ. Oxytocin ameliorates remote liver injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2013; 17(2): 169–73.
28. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd AR. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Bio Med.* 2000; 28(10): 1456-62.
29. Hirayama A, Nagase S, Ueda A, Oteki T, Takada K, Obara M, Inoue M, Yoh K, Hirayama K, Koyama A. In vivo imaging of oxidative stress in ischemia-reperfusion

- renal injury using electron paramagnetic resonance. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288: 597-603.
30. Hutchens PM, Dunlap J, Hurn DP, Jarnberg PO. Renal ischemia: does sex matter. *International Anesthesia Research Society*. 2008; 107(1): 239-49.
31. Jiang F, Guo N, .Dusting GJ. Modulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase expression and function by 3',4'-dihydroxyflavonol in phagocytic and vascular cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324(1): 261-9.
32. Kahraman A, SerteserM, Köken T. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2002; 3: 1-8.
33. Kim J, Jang HS, Park KM. Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion trigger protection against subsequent renal ischemia and reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 298(1): 158-66.
34. Koga H, Hagiwara S, Kusaka J, Goto K, Uchino T, Shingu C, Kai S, Noguchi T. New  $\alpha$ -lipoic acid derivative, DHL-HisZn, ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res*. 2012; 174(2): 352-8.
35. Kunduzova OR, Escourrou G, De La Farge F, Salvayre R, Séguélas MH, Leducq N, Bono F, Herbert JM, Parini A. Involvement of peripheral benzodiazepine receptor in the oxidative stress, death-signaling pathways, and renal injury induced by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(8): 2152-60.
36. Leo CH, Hart JL, Woodman mail OL. 3',4'-Dihydroxyflavonol reduces superoxide and improves nitric oxide function in diabetic rat mesenteric arteries. *PLoS One*. 2011; 6(6): e20813.
37. Lerman LO, Textor SC, Grande JP. Mechanisms of tissue injury in renal artery stenosis: ischemia and beyond. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009; 52(3): 196-203.
38. Malakul W, Ingkaninan K, Sawasdee P, Woodman OL. The ethanolic extract of *Kaempferia parviflora* reduces ischaemic injury in rat isolated hearts. *J Ethnopharmacol*. 2011; 137(1): 184-91.
39. Mandel JL, Schnellmann RG, Jacobs WR. Intracellular glutathione in the protection from anoxic injury in renal proximal tubules. *J. Clin. Invest*. 1990; 85: 316-24.
40. Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. Inhibition of nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2005; 129: 236-41.

41. Mehmetoğlu İ, Ünlü C, Gökçe R, Kurban S. Çay, baharat ve bitki kaynaklı bazı gıda maddelerinin flavonoid içerikleri ve antioksidan özellikleri. *Türkiye Klinikleri*. 2005; 25(3): 407-11.
42. Montaña MP, Pappano N, Giordano SO, Molina P, Debattista NB, García NA. On the antioxidant properties of three synthetic flavonols. *Pharmazie*. 2007; 62(1): 72-6.
43. Munshi R, Hsul C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BMC Medicine*. 2011; 9(11): 1-6.
44. Müller V, Losonczy G, Heemann U, Vannay A, Fekete A, Reusz G, Tulassay T, Szabó AJ. Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int*. 2002; 62(4): 1364-71.
45. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J*. 2003; 79(930): 195-199.
46. Nitescu N, Ricksten SE, Marcussen N, Haraldsson B, Nilsson U, Basu S, Guron G. N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21(5): 1240-7.
47. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita F, Brodsky S, Goligorsky MS. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J of Physiol Renal Physiol*. 2001; 281: 948-57.
48. Osawa T. Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mech Ageing Dev*. 1999; 111: 133-9.
49. Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidan olarak prostoglandin E<sub>1</sub> (pgE<sub>1</sub>) kullanımının incelenmesi: deneysel çalışma. *Fırat Tıp Dergisi*. 2004; 9(3): 67-71.
50. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney. *Int J Nephrology*. 2012: 1-9.
51. Özşahin AD, Yımnaz Ö, Tuzcu M. Oksidatif strese maruz kalan ratların eritrositlerinde lipid peroksidasyonu oluşumu üzerine meyve fenolik bileşiklerinin koruyucu rolü. *F.Ü. Sađ. Bil. Vet. Derg*. 2011; 25(1): 37-41.
52. Pamplona R, Costantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 301: 843-63.
53. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2): 89-96.

54. Qin CX, Williams SJ, Woodman OL. Antioxidant activity contributes to flavonol cardioprotection during reperfusion of rat hearts. *Free Radical Biol. Med.* 2011; 51: 1437-44.
55. Rhoden EL, Rhoden CR, Lucas ML, Lima LP, Zettler C, Klein AB. The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia–reperfusion injury in rats. *Transpl Immunol.* 2002; 10: 277–84.
56. Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. *Comp Biochem and Physiol.* 2006; Part C 142: 317-27.
57. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther.* 1988; 37: 231-49.
58. Scaduto RC, Gattone VH, Grotyohann LW, Wertz J, Martin LF. Effect of an altered glutathione content on renal ischemic injury. *Am J Physiol.* 1988; 255(5): 911-21.
59. Selçuk NY, Yakan B, San A, Başoğlu M, Tonbul Z, Kızıltunç A, Gündoğdu C. Deneysel sıcak renal iskemi ve reperfüzyonda lipid peroksidasyonu ve alfa-tocopherol tedavisinin değerlendirilmesi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi.* 1996; 1: 5-10.
60. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiemermann C, Yaqoob MM. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15(8): 2115-24.
61. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 1993; 215: 213-9.
62. Singh D, Chander V, Chopra K. Protective effect of catechin on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacol Rep.* 2005; 57: 70-6.
63. Slusser SO, Grotyohann LW, Martin LF, Scaduto RC. Glutathione catabolism by the ischemic rat kidney. *Am J Physiol* 1990; 258(6): 1546-53.
64. SlyvkaY, Nowak FV, Hayes TM, Inman SR. Short-term antioxidant diet prevents hyperfiltration in young male rat kidney subjected to ischemia/reperfusion injury. *OJMIP.* 2013; 3: 36-41.
65. Şahna E, Deniz E, Aksulu HE. Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı ve melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006; 6: 163-8.

66. Şener G, Tuğtepe H, Yüksel M, Cetinel S, Gedik N, Yeğen BC. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res.* 2006; 37(7): 822-9.
67. Şengül İ, Şengül D. İskemik ön koşullanma ve sonradan koşullanma mekanizmalarından biri: potasyum-ATP Kanalları (mitokondriyal ve sarkolemmal). *Yeni Tıp Dergisi.* 2012; 29(1): 7-11.
68. Şentürk H, Kolankaya D, Şahin Y. Renal iskemi-reperfüzyonu sırasında sıçan böbreğinde oluşan oksidatif stres hasarına silimarin etkisi. *Çankaya University Journal of Science and Engineering.* 2010; 7(1): 59-74.
69. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Amara MA, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 2008; 150: 304-30.
70. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malondyaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1977; 86(1): 271-8.
71. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.
72. Viñas JL, Hotter G, Pi F, Palacios L, Sola A. Role of peroxynitrite on cytoskeleton alterations and apoptosis in renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292: 1673-80.
73. Walker LM, York JL, Imam SZ, Ali SF, Muldrew KL, Mayeux PR. Oxidative stress and reactive nitrogen species generation during renal ischemia. *Toxicol Sci.* 2001; 63: 143-148.
74. Wang S, Disting GJ, May CN, Woodman OL. 3', 4'- Dihydroxyflavonol reduces infarct size and injury associated with myocardial ischemia an reperfusion in sheep. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 142: 443-452.
75. Wang S, Thomas CJ, Disting GJ, Woodman OL, May CN. 3',4'- Dihydroxyflavonol improves post-ischaemic coronary endothelial function following 7 days reperfusion in sheep. *Eur J Pharmacol.* 2009; 10; 624(1-3): 31-7.
76. Wardle EN. Cellular oxidative processes in relation to renal disease. *Am J Nephrol.* 2005; 25(1): 13-22.
77. Woodman OL, Chan ECH. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Annual Scientific Meeting of ASCEPT 2003. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004; 31: 786-90, Sydney, Australia.



78. Woodman OL, Meeker WF, Boujaoude M. Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones: Structure–activity relationships. *Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 46( 3): 302-9.
79. Woodman OL, Malakul WW. 3',4'-Dihydroxyflavonol prevents diabetes-induced endothelial dysfunction in rat aorta. *Life Sci.* 2009; 85: 54-9.
80. Yap S, Woodman OL, Crack PJ, Williams SJ. Synthesis of a hypoxia-targeted conjugate of the cardioprotective agent 3',4'-dihydroxyflavonol and evaluation of its ability to reduce ischaemia/reperfusion injury. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011; 21(17): 5102-6.
81. Yarsan E. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Y. Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 1998, 9(1-2): 89-95.
82. Yuan O, Hong S, Han S, Zeng L, Liu F, Ding G, Kang Y, Mao J, Cai M, Zhu Y, Wang QX. Preconditioning with physiological levels of ethanol protect kidney against ischemia/reperfusion injury by modulating oxidative stress. *PLoS One.* 2011; 6(10): e25811.
83. Zhang H, Forman HJ. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; 23(7): 722-8.