

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI



**DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
LİPOİK ASİT VE DİHİDROLİPOAT KULLANIMININ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Filiz KAÇMAZ

Danışman

Yard.Doç.Dr.Oğuzhan ÖZCAN

HATAY – 2017

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
LİPOİK ASİT VE DİHİDROLİPOAT KULLANIMININ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Filiz KAÇMAZ

Danışman

Yard. Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 16341 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2017

TEŞEKKÜR

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim boyunca, bana emeği geçen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bilimsel açıdan yetişmemde çok değerli katkı ve destekleri ile tüm meslek yaşamım boyunca bana ışık tutacak olan, başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Abdullah ARPACI olmak üzere, tüm yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren mesleki olsun veya olmasın her konuda desteğini esirgemeyen tez danışmanım saygıdeğer hocam Yrd. Doç.Dr. Oğuzhan ÖZCAN'a candan teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) 'ne tezimin deneysel çalışmalarını yürütebilmem adına analitik ihtiyaçlarımı temin edebilmem için yapmış olduğu katkılardan ve ayırmış olduğu bütçeden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sırasında laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı birlikte çalıştığım yüksek lisans arkadaşlarıma ve tezimin hazırlanmasında katkılarını gördüğüm Hitit Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Ercan AYZAZ'a da çok teşekkür ederim.

Ayrıca ERASMUS⁺ programı kapsamında gittiğim İtalya Modena Üniversitesi Toksikoloji ve Farmakoloji öğretim üyesi Prof. Dr. Aldo TOMASİ ve oradaki çalışma arkadaşlarım Emanuela MONARİ, Stefania BERGAMİNİ ve Elisa BELLEİ' ye de bana yeni teknikleri öğrenmem konusunda yaptıkları özverili katkılarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan sevgi ve desteklerini esirgemeyen amaçlarıma ulaşmamda büyük pay sahibi olan aileme, özellikle biricik annem Sebiha ve babam Ali KAÇMAZ'a teşekkür ederim.

Filiz KAÇMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY.....	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Böbreğin Anatomisi.....	3
2.2. Böbrek Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi.....	5
2.3. Serbest Radikallerin Tanımı, Oluşum Şekilleri ve Sınıflandırılması	6
2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	8
2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O ₂ •).....	8
2.3.1.2. Hidroksil Radikali (OH [•]).....	9
2.3.1.3. Alkoksil (LO•) ve Peroksil (LOO•) Radikali.....	10
2.3.1.4. Nitrik Oksit Radikali (NO•).....	10
2.3.1.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	11

2.3.1.6. Singlet Oksijen (1O_2).....	12
2.4. Oksidatif Stres.....	13
2.5. Serbest Radikallerin Hasarı Sonucunda Oluşan Ürünler.....	13
2.5.1. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	13
2.5.2. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Serbest Radikallerin Etkisi	14
2.5.3. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri (LipidPeroksidasyonu)..	14
2.5.3.1. Malondialdehit (MDA).....	17
2.6. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	17
2.6.1. İskemi-Reperfüzyonda ROS Oluşumu	18
2.6.1.1. Ksantin Oksidaz Yolağı Üzerinden ROS Oluşumu.....	18
2.6.1.2. Mitokondriyal Hasar ve ROS oluşumu.....	19
2.6.1.3. Fagositler (makrofaj, nötrofil v.b.) ve Endotel Hücre Aracılı ROS.....	20
2.6.1.4. İskemi-Reperfüzyonda Nitrik Oksitin Rolü.....	20
2.7. Antioksidan Tanımı, Etki Mekanizması ve Antioksidanların Sınıflandırılması.....	21
2.7.1. Endojen Antioksidanlar.....	21
2.7.1.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	21
2.7.1.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar.....	23
2.7.2. Ekzojen Antioksidanlar.....	23
2.8. Alfa Lipoik Asit ve DHLA.....	24
2.8.1. Lipoik Asidin ve DHLA'nın Metabolizması.....	25
2.8.2. Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı.....	25

2.8.3. Lipoik Asidin Etki Mekanizması.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
3.1. Deneysel Hayvanları.....	26
3.2. Deneysel Çalışma Yöntemi	26
3.3. İskemi Reperfüzyon Modelinin Oluşturulması.....	27
3.4. Örneklerin Alınması ve Saklanması.....	28
3.5. Homojenizasyon.....	28
3.5.1. Fosfat Tamponunun Hazırlanması.....	28
3.5.2. Bıçaklı Homojenizatörde Homojenizasyon.....	28
3.6. Protein Tayini.....	29
3.6.1. Stok Standart Çözeltisi Hazırlama.....	29
3.6.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.6.3. Konsantrasyon Hesaplama.....	30
3.7. Biyokimyasal Analizler.....	30
3.7.1. Malondialdehid (MDA) Miktarının UV Spektro İle Tayini.....	30
3.7.2. Standart Eğri Çizimi.....	32
3.7.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini.....	33
3.7.4. Süperoksit Dismutaz, Total (SOD) Enzim Aktivite Tayini.....	34
3.7.5. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivite Tayini.....	38
3.7.6. Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi.....	41
3.8. Histopatolojik İnceleme.....	42
3.8.1. Işık Mikroskopik İnceleme İçin Dokuların Takibi.....	42

3.8.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü.....	42
3.8.3. Periyodik Asit Schiff Boyama Protokolü.....	43
3.8.4. Histomorfometrik İncelemeler.....	43
3.9. İstatistiksel Analiz.....	44
3.9.1. Histopatolojik İnceleme Sonuçlarının İstatistiksel Analizi.....	44
3.9.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının İstatistiksel Analizi.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. BSA ile Hazırlanan Protein Standart Grafiği ve Protein Konsantrasyonları...45	
4.2. MDA Standart Grafiği ve Grupların Doku MDA Miktarlarının Karşılaştırılması.....	46
4.3. Grupların Doku CAT Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	48
4.4. Grupların Doku SOD Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	49
4.5. Grupların Doku GSH-Px miktarları.....	49
4.6. Serum TAS-TOS Konsantrasyonları ve OSİ Değerleri.....	50
4.7. Serum Üre-Kreatinin Değerleri ile ALT-AST Aktivite Düzeyleri.....	51
4.8. Grupların Doku MDA, CAT, GSH-Px Miktarları ve Grupların İkili Karşılaştırılması	51
4.9. Histopatolojik İnceleme Bulguları.....	52
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ.....	61
7. KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Böbreğin anatomik yapısı.....	3
Şekil 2.2. Malondialdehit (MDA)' in yapısı.....	17
Şekil 2.3. Dihidrolipoik asit ve alfa lipoik asitin yapısı.....	24
Şekil 3.1. MDA'nın TBA ile reaksiyonu ve oluşan renkli TBA-MDA kompleksinin yapısı.....	30
Şekil 3.2. Glutasyon peroksidaz enzim tepkimesi.....	38
Şekil 4.1. Bradford Standart Grafiği.....	45
Şekil 4.2. MDA Standart Grafiği.....	46
Şekil 4.3. Grupların MDA Miktarlarının karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.4. Grupların CAT aktivitelerinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.5. Grupların GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması.....	50
Şekil 4.6. Grupların histoloji verilerinin karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.7. Grupların histolojik kesitlerinin karşılaştırılması.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması.....	7
Çizelge 2.2. Enzim olmayan antioksidanlar.....	23
Çizelge 2.3. Ekzojen antioksidanlar.....	23
Çizelge 3.1. BSA stok standart çözeltisi.....	30
Çizelge 3.2. MDA ölçümü (pipetleme).....	32
Çizelge 3.3. MDA stok standart çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda çözelti hazırlama.....	32
Çizelge 3.4. CAT ölçümü için kör ve numunelerin pipetlenmesi.....	34
Çizelge 3.5. Assay reaktifinin hazırlanması.....	35
Çizelge 3.6. Amonyumsülfat çözeltisi ve ksantinoksidaz çözeltisinin hazırlanması.....	36
Çizelge 3.7. Bakır klorür çözeltisinin hazırlanması.....	36
Çizelge 3.8. SOD aktivite tayini için pipetleme.....	37
Çizelge 3.9. GSH-Px aktivite tayini pipetleme yöntemi.....	40
Çizelge 4.1. BSA ile hazırlanan stok standart çözeltinin seyreltilmesi.....	45
Çizelge 4.2. Böbrek dokuda ölçülen protein miktarları	46
Çizelge 4.3. Böbrek doku MDA miktarları.....	47
Çizelge 4.4. Böbrek doku CAT aktivitesi.....	48
Çizelge 4.5. Grupların doku SOD aktiviteleri ve karşılaştırılması.....	49
Çizelge 4.6. Böbrek doku GSH-Px enzim aktivitesi.....	49
Çizelge 4.7. Serum TAS-TOS-OSİ değerleri.....	50
Çizelge 4.8. Serum Üre-Kreatinin-ALT-AST parametreleri.....	51
Çizelge 4.9. MDA ve Antioksidan enzimlerin miktarı ve gruplar arası karşılaştırma.....	51
Çizelge 4.10. Histolojik inceleme skorlaması.....	52
Çizelge 4.11. İstatistiksel analiz verilerinin karşılaştırılması.....	53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALA: Alfa lipoik asit	OH: Hidroksil
ALT: Alanin Aminotransferaz	OSİ: Oksidatif stres indeksi
AST: Aspartat aminotransferaz	O₂: Süperoksit
AVP: Arjinin vazopressin	ROS: Reaktif oksijen türleri
CAT: Katalaz	SOD: Süperoksit dismutaz
Cu: Bakır	TAS: Total antioksidan status
DHLA: Dihidrolipoik asit	TBA: Tiobarbütirik asit
ET-1: Endotelin-1	TCA: Triklorasetik asit
Fe: Demir	TOS: Total oksidatif stres
GSH-Px: Glutatyon peroksidaz	TX: Tromboksan
H₂O₂: Hidrojen peroksit	UV: Ultraviole
I/R: İskemi/Reperfüzyon	
K: Kontrol	
LA: Lipoik asit	
MDA: Malondialdehit	
NO: Nitrik oksit	

ÖZET

Deneysel Böbrek İskemi-Reperfüzyon Modelinde Lipoik Asit ve Dihidrolipoat Kullanımının Etkilerinin İncelenmesi

Bir organa veya dokuya gelen kan akımının yetersiz hale gelmesine iskemi, yeniden kanlanma döneminde meydana gelen hasara ise reperfüzyon hasarı denir. Doğal bir antioksidan olan alfalipoik asit (ALA) ve Dihidrolipoik asit (DHHLA) oksidatif stresle ilişkili hastalıkların tedavi edilmesinde etkili ajanlardır. Biz bu çalışmada böbrek dokusunda deneysel olarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon modelinde ALA ve DHHLA'nın oksidatif stres ve antioksidan enzimler üzerine uzun ve kısa dönem etkilerini karşılaştırmayı amaçladık.

Bu çalışmada ortalama 250-300 gr ağırlığında 40 erkek rat kullanıldı. Her biri 8 rattan oluşan 5 gruba ayrıldı. Kontrol (Grup 1), I/R (Grup 2), 100mg/kg IP ALA uzun dönem (iki hafta)+I/R (Grup 3), 100mg/kg IP ALA kısa dönem (iki saat önce) + I/R (Grup 4) ve 100 mg/kg DHHLA kısa dönem (iki saat önce)+ I/R (Grup 5). Süperior renal arterin 45 dakika klemplenmesi ile iskemi oluşturuldu. Sonrasında klempin gevşetilmesi ile 4 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Doku homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda malonildialdehit (MDA); antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktivitelerinin spektrofotometrik tayini yapılmıştır. Böbrek dokuları % 10'luk zinc-formaldehit solüsyonu içerisine konularak iskemi-reperfüzyonun histopatolojik incelemesi yapılmıştır. Serum örneklerinde böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri (üre, kreatinin, ALT-AST) ile serum total antioksidan ve oksidatif stress düzeyleri (TAS/TOS) otoanalizörde ölçülmüştür.

Sonuçta I/R grubunda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek iken SOD, CAT ve GSH-Px düzeyleri anlamlı derecede düşük bulundu. Serum OSI değerleri ise I/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Uzun ve kısa dönem ALA ve kısa dönem DHHLA uygulanan grupta MDA düzeylerinde anlamlı azalma ve MDA, CAT, GSH-Px düzeyleri ile serum OSI değerlerinde ve AST aktivitesinde ise iyileşme gözlemlendi. Bu iyileşme doku düzeyinde DHHLA uygulanan grupta daha belirgindi.

Hem uzun hem de kısa dönem ALA uygulamasının I/R'ye bağlı hasarı düzeltmede potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceğini ancak DHHLA'nın antioksidan etki yönünden daha etkin olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: İskemik Hasar, Reperfüzyon, Lipoik Asit, Dihidrolipoat, Antioksidan Enzim

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Lipoic Acid and Dihydrolipoate on Experimental Renal Ischemia-Reperfusion Model

Ischemia is a restriction in blood supply to tissues and reperfusion injury is the tissue damage caused by blood supply returns to the tissue after a period of ischemia. Alpha lipoic acid (ALA) and dihydrolipoate (DHLA), a natural antioxidant, can be used for the disease related to oxidative stress. In this study we aimed to investigate the effects of the long and short term usage of ALA and DHLA on oxidative stress and antioxidant enzymes in experimental renal ischemia-reperfusion model.

A total of forty male rats (250 to 300 gr) were divided into 5 groups as follows: control (Group 1), I/R (Group 2), I/R + 100 mg/kg IP ALA for two weeks (Group 3), I/R + 100 mg/kg IP ALA before two hours, (Group 4) and I/R + 100 mg/kg DHLA (Group 5). Ischemia was carried out the superior renal artery for 45 minutes followed by reperfusion for 4 hours. Malondialdehyde (MDA), Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in supernatants of renal tissue samples assayed by the spectrophotometric method. Renal tissue samples in 10 % zinc-formol solution were investigated by histopathological analyze. Urea, creatinine, ALT, AST activity and Total Antioxidant Status (TAS) and Total Oxidative Stress (TOS) levels were measured by an auto analyzer. Tissue MDA and serum OSI levels in I/R group were higher and SOD, CAT and GSH-Px levels were lower than those of control subjects. MDA, CAT and GSH-Px levels and serum OSI and AST levels were improved in the long and short term ALA-treated group and short term DHLA-treated group. This findings were more prominent in histopathological tissue samples in DHLA-treated group.

In conclusion, we consider that both long term and short term ALA application has a potential for treatment of I/R damage. Besides, DHLA is more effective in terms of antioxidant effect.

Key words: Ischemic Damage, Reperfusion, Lipoic Acid, Dihydrolipoate, Antioxidant Enzym

1. GİRİŞ

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerden dolayı yetersiz hale gelmesi veya durması iskemi olarak adlandırılır (Cotran ve ark 1995; Herbert ve ark 2001). Reperfüzyon ise dokuya kan akımının yeniden başlamasıdır (Petrasek ve Walker 1994).

Böbrek iskemisi; böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefroz gibi çeşitli klinik durumlarda görülür. İskemi ve reperfüzyon (I/R) hücrel enerjinin tükenmesine, hücre içinde sodyum, kalsiyum ve reaktif oksijen radikallerinin (ROS) birikmesine, proteazları, nitrik oksit sentetazları, fosfolipazları ve endonükleazları içeren çok sayıda enzim sisteminin aktive olmasına yol açar; hücre hasarı ve ölümüyle sonuçlanır. İskemik organlara yeniden kan akımının sağlanması, hücre ölümünün önlenmesinde hayati önem taşımaktadır. Ancak; reperfüzyonun kendisi, aktive polimorfonükleer lökositlerin ve trombositlerin dokuyu infiltre etmeleri ile ortaya çıkan akut inflamatuvar yanıtı sekonder olarak lokal hasara yol açar (Ergün ve ark. 2001; Oruc ve ark. 2009). Bu olay ise reperfüzyona bağlı doku hasarı olarak tanımlanır (Cotran ve ark 1995).

Doku hasarlanması; sitokinler, nitrik oksit (NO) seviyesindeki lokal dengesizlikler, endotel hücresi adhezyon molekülleri, trombosit aktive edici faktörler ve serbest radikaller aracılığıyla gerçekleşir (Ergün ve ark. 2001; Oruc ve ark. 2009). Oluşan hasarın şiddeti iskeminin süresi dışında ilgili dokuya ilişkin faktörlere (örn. doku ısı) bağlı olarak da değişir (Petrasek ve Walker 1994)

Bir dokuda arteriyel sistemin geçici süre ile tıkanması halinde, bu süre belli bir zaman dilimini aşarsa, geri dönüşmeyen doku hasarı ortaya çıkar. Bu kritik zaman dilimi dokudan dokuya değişiklik gösterir (Avinoam Ophir 1994). Böbrekte yapılan deneysel çalışmalarda bu kritik zaman dilimi 30 dakika olarak bulunmuştur (İslam 1997; Vandeplassche 1989). Böbreğin birçok hastalığında iskemik hasar oluşabilmektedir. Bu hasarın önlenmesinde çeşitli antioksidan maddeler kullanılmaktadır (Ergün ve ark. 2001; Oruc ve ark. 2009). Alfa lipoik asit antioksidan olarak yaygın kullanılan bir kimyasaldır (Nouf 2013).

Lipoik asit (ALA); normalde vücutta sentezlenen ve başlıca enerji üreten (örn. glikoliz) ve mitokondrideki enerji ile ilişkili enzimatik yollarda koenzim olarak görev alır (Cadenas 2001). İki farklı formda bulunur.

1- Okside lipoik asit: 6. ve 8. pozisyonlarda bulunan kükürtler kapalı halka yapısı meydana getirir.

2-Redükte lipoik asit: Dihidrolipoik asit (DHHLA) olarak isimlendirilir. Ancak 6. ve 8. pozisyonadaki kükürtler sülfidril grubu (-SH) halinde bulunur. Açık zincir yapısındadır (Karaca 2009).

Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile lipoik asidin bu iki formu organizmada birbirine dönüşebilmektedir (Karaca 2009). Lipoik asidin her iki formu da biyolojik aktiviteye sahiptir ancak DHHLA biyolojik olarak lipoik asite göre daha aktiftir (Bullock 1954).

ALA' nın indirgenmesi sonucunda ortaya çıkan DHHLA, daha güçlü antioksidan özellik gösterir. Buna ilave olarak DHHLA endojen aktivite gösteren diğer antioksidanları da rejenere etme yeteneğine sahiptir. DHHLA ve ALA, metal kelasyonu ile ROS'u uzaklaştırabilme yeteneğine sahip olup I/R hasarını hasarının tamir edilmesinde rol alırlar. ALA başlıca Fe⁺² ve Cu⁺² kelasyonu yaparken, DHHLA ilave olarak Cd⁺² kelasyonunda da rol oynayabilir (Biewenga 1997).

Birçok çalışmada böbrek iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine bazı antioksidanların ve lipoik asidin etkileri araştırılmıştır ancak lipoik asidin redükte formu olan dihidrolipoik asidin etkilerini ele alan bir araştırma mevcut değildir.

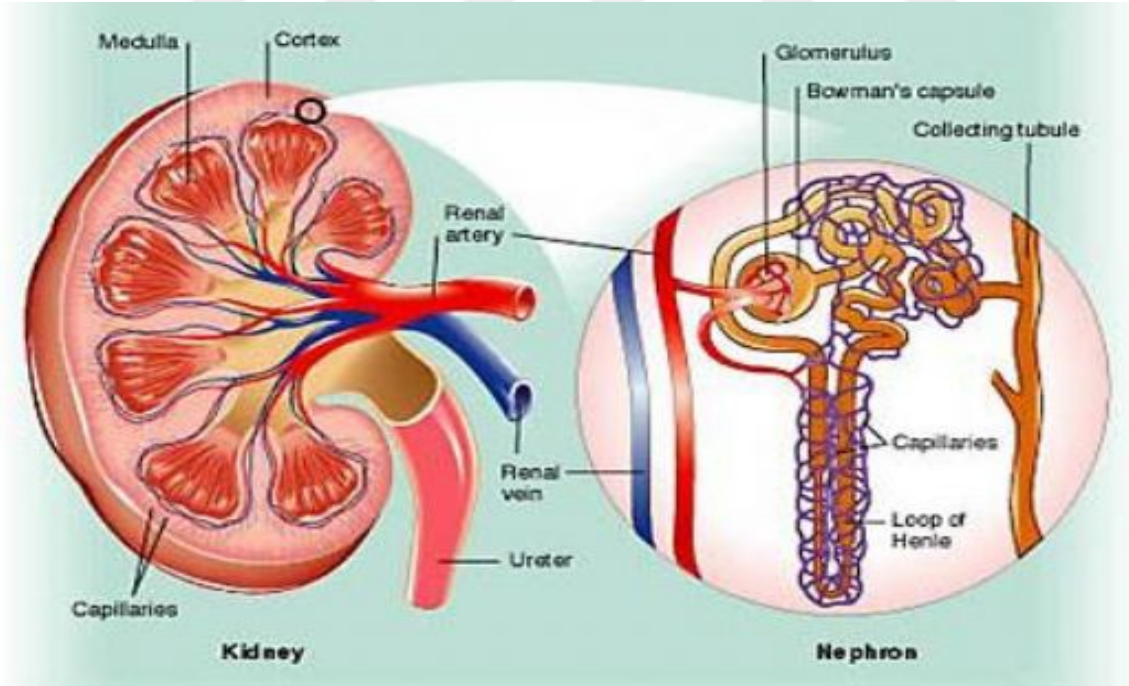
Bu çalışmada böbrekte iskemi reperfüzyon hasarında lipoik asit ve metaboliti olan dihidrolipoatın kısa ve uzun süre kullanımlarının yol açtığı etkilerin karşılaştırması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile transplantasyon, parsiyel nefrektomi, kardiyopulmoner bypass gibi yaygın klinik durumlarda ortaya çıkacak doku hasarını önleyebilecek antioksidan kimyasalların koruyucu etkileri aydınlatılmak istenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Anatomisi

Böbrekler sıvı ve elektrolit dengesinin sağlanmasında ve metabolizma artıkları ile toksik moleküllerin vücuttan atılımında rol alan organlardır. Ayrıca elektrolitlerin dış ortama salınımının düzenlenmesinde ve kırmızı kan hücrelerinin oluşumunda (eritropoetin) önemli rol oynayan bazı madde ve hormonların sentezi böbreğin işlevlerindedir (Guyton 1996).

Böbrekler arka abdominal bölgede bulunurlar ve üreter adındaki tüp aracılığıyla mesaneye bağlanırlar (Calbreath 1992). Böbrek, nefron adı verilen yapılardan meydana gelir ve her bir böbrekte yaklaşık 1,3 milyon nefron bulunur. Nefronlar, vücuttaki maddelerin filtrasyon, sekresyon ve reabsorpsiyonunda rol oynayan temel yapılardır. Herbir nefron filtrasyonun başlangıcı için gerekli olan kan akımını sağlayan glomerül, filtrasyonun başladığı yapı olan Bowman kapsülü, sekresyon ve reabsorpsiyonun gerçekleştiği proksimal ve distal tübülsler, bu tüpleri birleştiren Henle Kulpu ve idrarın mesaneye iletilmesini sağlayan üretere ulaştıran toplayıcı kanallardan oluşur (Rang 1999; Calberath 1992).



Şekil 2.1. Böbreğin anatomik yapısı (<http://www.anatomi.gen.tr/bobrek-anatomisi.html>)

Glomerül yapısı ortalama 200 µm çapında olup kapillerlerin nefronun geniş ve kör ucundaki Bowman kapsülü içerisine girmesiyle oluşur. Glomerül yapısını oluşturan kapiller kümeleri nefrona önemli oranda kan akışı sağlanmasında etkilidir (Ganong 1985). Bowman kapsülünde kan ve glomerüler filtratı birbirinden ayıran iki hücreli tabaka yer alır; kapiller endotel ve tübülüs epiteli (podositler). Kapiller endotel ve tübülüs epiteli arasında glomerüler bazal membran (GBM) yer alır. Endotel hücreleri ile bazal membran arasında bulunan mezangiyal hücreleri ise glomerülün hücreli matriksini ve destek yapısını oluşturur (Raj 1985).

Glomerüler mezangiyal yapısı mukopolisakkaridler ile glikoproteinlerden oluşan matriks içerisine yerleşmiş mezangiyal hücrelerden meydana gelir. GBM, mezangiyumun glomerüler kan akımıyla temas ettiği noktada bulunur. Burada glomerüler dolaşım 100 nm çapında gözenekler içeren fenestre (gözenekli) endotel tabakası ile mezangiyumdan ayrılır. Bu durumun sonucu olarak;

1. Makro ve mikromolekülleri taşıyan plazma mezangiyal bölgeye akabilir.
2. Mezangiyal ve endoteliyal hücrelerin pozisyonu bu hücrelerden birinden salınan maddelerin diğer hücrelerle parakrin etkileşimine olanak tanıyacak şekilde de 'çapraz- iletişimine' imkân sağlar (Raj 1993).

Mezangiyal hücreler anjiyotensin II, endotelin-1 (ET-1), tromboksan (TX) ve arjinin vazopressin (AVP) gibi çeşitli vazoaaktif peptid reseptörlerinin yanı sıra aktin ve miyozin içerirler. Mezangiyal hücreler glomerülün hiler bölgesinde jukstaklomerüler aygıtın yanısıra afferent ve efferent arteriyollerin lümenine bakan kısmı ile temas halindedirler. Bu anatomik yapı nedeniyle afferent ve efferent arteriyollerin tonüsündeki değişikliklerle uyumlu bir şekilde hareket eden mezangiyal hücrelerin kasılıp gevşemeleri mezangiyumdan plazma akımını ve ayrıca glomerüler kan akımı ve filtrasyon hızını düzenler (Raj ve Keane 1985; Schlondorff 1987; Mene ve ark. 1989).

2.2. Böbrek Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Böbreğin 3 temel fonksiyonu vardır;

1. Metabolizma esnasında oluşan ya da doğrudan vücuda alınmış olan toksik bileşenlerin atılımı.
2. Vücudun sıvı ve asit-baz dengesini düzenlemek
3. Hormon sentezinde rol almak

Böbreklerde akut veya kronik yetmezlik durumu meydana geldiğinde vücutta nitrojen metabolizmasının son ürünleri birikir ve non-proteinik nitrojenlerin miktarı artar. Bu durum kan üre-nitrojen ve serum kreatinin düzeylerinde artışa sebep olur. Nitrojen ürünlerinin birikmesi ile azotemi gelişir. Azoteminin devamında ise böbreklerin metabolizma artıklarını atabilme yeteneğini kaybettiği durum olan üremi ile sonuçlanır. Böbrekler vücut sıvısının tonisitesi, hacmi, asit-baz dengesi ve kimyasal bileşiminin düzenlenmesinden sorumlu organlardır. Hücrede metabolik fonksiyonların etkin bir şekilde gerçekleşebilmesi için hücre içi sıvı bileşiminin sabit bir aralıkta olması gerekir. Intraselüler sıvı ekstraselüler sıvının bileşiminden ciddi oranda etkilenir. Hücreyi çevreleyen ekstraselüler sıvının içeriği, solunum sistemi ve böbrekler aracılığıyla düzenlenir.

Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kreatinin, üre, nitrojen düzeylerine bakılır. Bu maddelerin serum ve idrarda eşzamanlı ölçümleri (örn. kreatinin klirensi) klinik olarak belirgin bulgular göstermeyen birtakım bozuklukların ortaya çıkarılmasında belirleyicidir (Preuss ve ark. 1991). Bir maddenin klirensi glomerüler filtrasyon hızına paralel filtrasyonda meydana gelen azalma sonucunda bu maddenin serum konsantrasyonunun artması beklenir. Normal şartlarda üretim hızının sabit olduğu varsayılan maddenin dolaşımdaki miktarının belirlenmesi glomerüler filtrasyon hızının belirlenmesinde önemlidir. Bu sebepten dolayı, böbrek yetmezliği durumunda kan kreatinin ve üre düzeyi ölçümlerinden sıklıkla yararlanır (Robinson ve Millares 1992; Preuss ve ark. 1991).

Üre, protein metabolizması son ürünüdür ve vücuttan atılan nitrojenin % 80'ini oluşturur. Kandaki üre miktarı prerenal (aşırı üretim, azalmış böbrek kan akımı), renal (parankimal böbrek hasarı) veya postrenal (genitoüriner sistem obstrüksiyonu) nedenlerle değişebilir.

Serum kreatinin konsantrasyonunun saptanması glomerüler fonksiyonun değerlendirilmesinde önemli bir diğer parametredir. Üre ile kıyaslandığında kreatinin konsantrasyonu diyetten, pre-renal ve post-renal faktörlerden daha az etkilenir (Robinson ve Millares 1992).

2.3. Serbest Radikallerin Tanımı, Oluşum Şekilleri ve Sınıflandırılması

Serbest radikaller, son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran atom ya da moleküllerdir, yüksek oranda reaktiftirler. Eşleşmemiş elektron bulunduran molekül veya atom, elektronunu başka bir moleküle aktararak ya da ondan elektron alarak daha stabil hale gelme eğilimindedir. Serbest radikaller hücrede metabolizma esnasında cereyan eden biyokimyasal reaksiyonlar sonucu ya da çeşitli dış etkenlerin varlığında oluşurlar, normal koşullarda mitokondride oluşurlar; antioksidan sistemler aracılığıyla zararlı etkileri engellenir.

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşmaktadır;

1. Bir molekülü oluşturan kovalent bağın hemolitik yarılarak bağı meydana getiren eşleşmiş elektronların her birinin ayrı pmolekülde kalması sonucunda oluşur:



2. Bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu:



3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu:



Biyolojik sistemlerdeki radikaller şu şekilde sınıflandırılabilir;

1. Oksijen kaynaklı serbest radikaller
2. Karbon kaynaklı serbest radikaller
3. Nitrojen kaynaklı serbest radikaller
4. Sülfür kaynaklı serbest radikaller
5. Geçiş metalleri ile oluşan kompleksleri
6. Fosfor merkezli radikaller

Biyolojik sistemlerde en zararlı radikaller oksijen kaynaklı radikaller olup, serbest oksijen radikalleri (SOR) ya da reaktif oksijen türevleri (ROS) olarak adlandırılırlar. Vücutta oksijen radikallerinin endojen kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden (ETZ) kaçan elektronlardır (Kehrer ve ark. 1990). Eksojen kaynaklar ise iyonize radyasyon ve geçiş metal iyonlarının varlığıdır; iyonize radyasyon (x-ray, UV), OH radikalleri oluşturacak şekilde suyu parçalar. Geçiş metal iyonları ise oksijen veya hidrojen peroksitle non-enzimatik yoldan reaksiyona girerek hidroksil radikallerinin oluşumuna öncülük ederler (Halliwell 1995; Akkuş 1995).

Reaktif oksijen türevleri; elektron eksikliği nedeniyle kolaylıkla elektron alışverişi yapabilenler (radikaller) ve elektron eksikliği olmamasına rağmen başka moleküllerle radikallere oranla daha zayıf bir şekilde birleşenler (non-radikaller) olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması

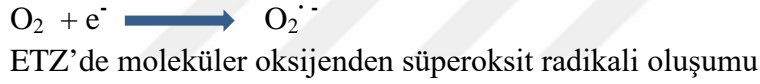
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit radikal (O_2^{\bullet})	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal (OH^{\bullet})	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Alkoksil Radikal (LO^{\bullet})	Hipoklorik asit (HOCl)
Peroksil radikal (LOO^{\bullet})	Singlet oksijen (1O_2)
Nitrik Oksit Radikali (NO^{\bullet})	

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

2.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Biyolojik sistemlerde en çok oksijen taşıyan serbest radikaldır. Özellikle aerobik hücrelerde moleküler oksijenin elektron alarak indirgenmesine bağlı olarak oluşur (Özcan ve ark. 2015).

Süperoksit radikalının hücredeki başlıca kaynakları mitokondri ve endoplazmik retikulumda yer alan elektron transport sisteminde elektron akışı sırasında kaçan elektronlardır (Gülcü Bulmuş 2006). Makromoleküllerin yıkılmasıyla açığa çıkan elektronlar mitokondri iç membranında bulunan elektron taşıyıcılarla moleküler oksijene aktarılıp su oluşturulurken elektron transport zinciri (ETZ)'den kaçan elektronlar moleküler oksijenle doğrudan reaksiyona girerek süperoksit radikalini oluştururlar (Kehrer ve ark. 1990; Valko ve ark. 2007). Ayrıca geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda süperoksit radikali oluşabilir (Özcan ve ark. 2015).



Süperoksit radikalleri, moleküler oksijenin redüksiyonunda ara basamak olup, hücreye doğrudan zarar vermez. Ancak hidrojen perosit kaynağı olup geçiş metallerinin redüksiyonuna sebep olur (Fang ve ark. 2002). Ayrıca nitrik oksitle reaksiyona girerek reaktif oksijen türevi olan peroksinitriti ($ONOO^{\cdot-}$) oluşturmaktadır.



Böylece NO'nun etkisi inhibe edilir. Peroksinitritlerin proteinler üzerine doğrudan zararlı etkileri vardır, ayrıca peroksinitritler başka reaktif ve toksik ürünlere [azot dioksit (NO₂), hidroksil radikali (·OH) ve nitronyum iyonu] dönüşebilirler (Akkuş 1995).

2.3.1.2. Hidroksil Radikali (OH[·])

Hemen hemen tüm moleküllerle reaksiyona girme yeteneğine sahip reaktif yapıdaki en aktif ve en güçlü oksidandır. Yarı ömrü oldukça kısadır. Oluştığı yerlerde ciddi hasara sebep olur. Tiyoller, yağ asitleri vb. moleküllerden proton koparıp çeşitli radikallerin oluşumuna neden olur (Akkuş 1996; Cadanas 1989; Fridovich 1997).



Hidroksil radikali hücrede DNA hasarının meydana gelmesine neden olur, iyonize radyasyonun membranlara etkisinden sorumlu radikaldir. Lipid peroksidasyonu sürecini başlatan reaktiftir (Akkuş 1995). Oluşan hidroperoksitler birikip membran bütünlüğünü bozarak hücrenin hasarlanmasına yol açar. Sonuçta ortaya çıkan hidroperoksitler ise daha ileri yıkım ürünü olan ve toksik ve reaktif özellik gösteren malondialdehit (MDA) gibi aldehit türevlerine dönüşebilirler (Uysal 1998; Girotti 1998).

Biyolojik sistemlerde hidroksil radikali çeşitli yollarla oluşur;

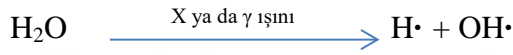
1. Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksit (H₂O₂), başta demir (Fe⁺²) olmak üzere geçiş elementleri (Cu,Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek hidroksil radikali (OH[·]) oluşturur (Cuzzocrea ve Reiter, 2001).



2. Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksitin, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) ile reaksiyona girmesi sonucu hidroksil radikali oluşur.



3. H_2O ' nun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucu:



4. H_2O_2 ' nin UV ışınına maruz kalması sonucunda:



2.3.1.3. Alkoksil (LO^{\cdot}) ve Peroksil (LOO^{\cdot}) Radikali

Poliansatüre yağ asitleri ve bunlara benzer çoklu doymamış yağ asitlerinin oksijen radikallerinden etkilenmesi ile meydana gelen radikallerden biri peroksil radikalidir. Serbest oksijen radikallerinin etkileri sonucunda karbon merkezli radikaller olan, alkoksil radikalleri ve tiyol radikalleri gibi önemli serbest radikaller oluşur (Smith 2005).

2.3.1.4. Nitrik Oksit Radikali (NO^{\cdot})

Yüksek yapılı canlılarda önemli biyolojik fonksiyonları olan, nitrojen kaynaklı bir serbest radikaldir. Reaktivitesi baskılandığı için diğer radikallere göre daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir (Kılınç ve Kılınç 2002).

Nitrik oksit radikali biyolojik sistemlerde spesifik nitrik oksit sentaz (NOSs) enzimi tarafından L-Argininden sentezlenir (Valko ve ark. 2007). Nitrik oksit oldukça reaktif bir radikaldir, fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türevleri ile

reaksiyona girerek güçlü oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturur, peroksinitritin dekompozisyonu sonucunda da $\cdot\text{OH}$ radikali meydana gelir (Southorn ve Powis 1988).

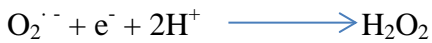


Nitrik oksit çok küçük bir molekül olduğundan dolayı ve lipofilik özellik taşıdığından hücre membranından kolaylıkla geçiş yapabilir (Garcia ve Eleno 1998; Kılıç ve ark. 2003).

2.3.1.5. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojenperoksit aslında bir prooksidandır, yani serbest radikal olmayıp reaktif oksijen türleri arasında kabul edilir, serbest radikal oluşumuna yol açar (Özcan ve ark. 2015). Membranları kolaylıkla geçerek sitozole difüze olur, uzun ömürlü reaktif oksijen türevidir. Membranla korunan bölgelere süperoksit ulaşamaz fakat hidrojen peroksit ulaşır ve bu sırada süperoksitle reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur. Geçiş metallerinin varlığında da kolaylıkla parçalanarak oksijen türevlerinden en güçlüsü olan hidroksil radikali oluştururlar (Young ve Woodside 2001).

Moleküler oksijenin (O_2) etrafındaki moleküllerden iki elektron koparması veya süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Sonuçta ortaya çıkan peroksit molekülü ise 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti meydana getirir (Akkuş 1995).



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit kaynağı süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikalinin non-enzimatik ya da süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği enzimatik dismutasyon reaksiyonudur.

İki süperoksit radikali iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni meydana getirirler (Akkuş 1995; Bors ve ark. 1980; Hochs ve Utley 1968).



Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektron bulundurmadığı için radikal değildir ancak süperoksitle reaksiyona girerek en zararlı reaktif oksijen türevi olan hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) oluşumuna neden olur (Halliwell ve Gutteridge 1989; Akkuş 1995).



Hidrojen peroksitten ayrıca Fenton reaksiyonu ile OH ve OH^- üretilir (Kavas 1989).



(Akkuş ve ark. 1996; Cadanas 1989; Slatter 1987).

2.3.1.6. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Yapısında eşleşmemiş elektron bulunmadığından serbest radikal olmadığı halde çok reaktif olduğundan dolayı ve oluşumu esnasında bazı radikal tepkimeleri oluşturduğu için reaktif oksijen türlerinden biri olarak kabul edilir (Garcia ve ark. 1998; James 1997). Oksijenin elektronlarından birine dışarıdan enerji verilmesiyle bulunduğu orbitalden bir başka orbitale ya da kendi spininin tersi yönünde bir spine yer değiştirmesi sonucunda oluşur. Ayrıca süperoksitin dismutasyona uğramasıyla veya hidrojen peroksit ile hipokloritin reaksiyona girmesi neticesinde ortaya çıkabilir (Akkuş 1995; Ryter ve Tyrrell 1998).

Singlet oksijenin DNA hasarına yol açtığı ve mutajenik etkilere neden olduğu düşünülmüştür. (Garcia ve Eleno 1998; James 1997).

2.4. Oksidatif Stres

Hücrel metabolizma yolağında açığa çıkan hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikallerinin artması ve bunları detoksifiye edici antioksidanların yetersiz kalması neticesinde oksidatif denge bozulur ve bu olaya oksidatif stres adı verilir. (Özcan ve ark. 2015). Oksidatif stresin, hücreye hasar vermesi özellikle lipid yapılar, karbonhidratlar, proteinler, DNA ve enzimler üzerinden etki göstermesiyle olur (Balkan 2010).

2.5. Serbest Radikallerin Hasarı Sonucunda Oluşan Ürünler

Reaktif oksijen türlerinin hücre içerisinde artışı veya çeşitli nedenlerle antioksidan seviyesindeki azalışın sonucunda oksidatif dengedeki değişime bağlı olarak hücre içi protein yapı ve fonksiyonlarında bozulma, hücre membranında ve DNA'nın yapısında hasar oluşabilmektedir (Özcan ve ark. 2015).

2.5.1. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikallerin yarattığı hasardan etkilenme oranları, aminoasit dizilimleri ile ilişkilidir. Yapısında sülfür atomu içeren ve doymamış bağ yapısına sahip moleküller reaktif oksijen türleri ile daha yüksek reaktiviteye sahiptir. Bu nedenle yapısında triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitler içeren proteinler serbest radikal hasarına daha çok maruz kalır (Erden 1992).

Bu aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerin parçalanmasına, çapraz bağların oluşmasına, agregasyona ve proteinlerin proteolitik parçalanmaya yatkınlığının artmasına yol açar. Protein yapıların okside olması sonucunda yan zincirleri üzerinde karbonil gruplar oluşur. Karbonil grupların oluşumuna neden olan bir diğer yolak ise sistein, histidin ve lizin rezidüleri ile lipit peroksidasyonu ürünü olan aldehitler, indirgeyici şekerler aracılığıyla oluşan karbonil deriveleri ve ayrıca lizin rezidülerinin yükseltgenmesi sonucu oluşan ürünlerle olan sekonder reaksiyonlarıdır. Oksidatif strese bağlı olarak protein yapılarında meydana gelen değişiklikler hücre iskeleti elemanları olan proteinler ve enzimlerde yapısal değişikliklere ve fonksiyon bozukluğuna neden olur. (Dalle Donne ve ark. 2003).

2.5.2. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Serbest Radikallerin Etkisi

Serbest radikaller DNA'nın yapısında mutasyon, karsinogenez ve hatta hücre ölümüne sebebiyet verebilirler. Serbest radikaller etkilerini DNA'nın yapı birimi olan nükleotidlerin yapısındaki purin ve pirimidin bazları üzerinden gösterirler. Radikallerin etkisi ile özellikle guanin bazının hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişerek mutasyonlar meydana gelmektedir. Bazlarla ve deoksiriboz şekeri ile kolaylıkla reaksiyona girebilen hidroksil radikali DNA'nın yapısında modifikasyonlara neden olur. Ayrıca inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu, solunumsal patlama ile H₂O₂ oluşturur. Oluşan hidrojen peroksit ise hücredeki membranlı yapıları aşarak çekirdek yapıda bulunan DNA üzerinde tahrip edici etki yapar (Delrio ve ark. 2005; Ahmadiasl ve ark. 2013).

Hidroksil radikalleri bazlarda bulunan çift bağlara H atomu ekleyerek ya da 2-deoksiribozun karbon-hidrojen bağlarından ve timin bazındaki metil gruplarından H atomunu kopararak DNA'yı etkiler (Breen AP. ve Murphy JA. 1995). Oluşan Timin peroksil radikalleri indirgenerek hidroksihidroperoksit, timin glikol, 5-hidroksimetilurasil, 5-formilurasil ve 5 -hidroksi 5-metilhidantoin gibi ürünlere dönüşürler. DNA en fazla görülen baz mutasyonu 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin)'dir. Hidroksil radikalleri, guanin molekülünde 8. pozisyonda etkileşerek yükseltgenmeye yol açar. Ayrıca Cu⁺² iyonları DNA'da özellikle guanin bazlarına yüksek afiniteyle bağlanarak H₂O₂ ile etkileşime girer ve DNA hasarının artışına katkıda bulunurlar. Oluşan baz radikallerin proteinlerin aromatik aminoasitleri ile bir araya gelerek "DNA-protein" çapraz bağları oluşturması da oksidatif stresin DNA yapısı üzerine etkilerindedir (Cooke 2003). Bunun yanı sıra hidroksil radikalleri DNA üzerindeki karbonhidrat kalıtlarından H atomu kopararak karbonhidrat modifikasyonlarına ve zincir kırıklarına neden olur. Sonuç olarak hücrelerin H₂O₂ ya da diğer oksidan maddelere maruz kalması genetik materyalde replikasyon ve transkripsiyonu ile DNA tamir mekanizmalarını etkiler ve DNA hasarına yol açar (Hu ve ark. 1995).

2.5.3. Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Serbest radikal hasarına en çok uğrayan biyomoleküller membran lipidleridir. Membranın yapısını oluşturan glikolipid, fosfolipid, gliserid ile poliansature yağ asitlerinin (PUFA), serbest radikaller tarafından yıkılması sonucu peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ile etan, pentan gibi sekonder ürünlerin ortaya çıkması lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır (Köse ve Dogan 1992). Lipid peroksidasyonu kendi kendine ilerleyen bir zincir

reaksiyonu şeklinde gerçekleşir ve neden olduğu membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995).

Biyolojik membranlarda serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu; başlangıç, ilerleme-yayıma ve sonlanma basamağı olmak üzere üç aşamada gerçekleşir (Balz 1994; Girotti 1998).

1. Reaktif oksijen türleri biyolojik membranlardaki poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonuna yol açarak lipid peroksidasyonunu tetikler (Gupta ve ark. 2014).

Serbest radikal doymamış yağ asidinde metilen karbonuna bağlı bir H⁺ atomunu koparır ve bunun sonucunda lipid radikali oluşur, ardından oluşan lipid radikali konjuge diene dönüşür;



LH: doymamış yağ asidi

L[·]: lipid alkil radikali

Oluşan radikal O₂ ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikalının oluşmasına yol açar;



LOO[·]: lipid peroksil radikali

Ardından lipid peroksil radikalının bir başka yağ asidi ile reaksiyona girmesi ile; kendisi lipid hidroperokside indirgenirken, yağ asidi lipid alkil radikaline dönüşmektedir.



LOOH: lipid hidroperoksit

2. Lipid peroksitler ortamda geçiş metal iyonlarının bulunması halinde tekrar radikale dönüşürler; böylece lipid peroksidasyonunun daha çok ilerlemesi ve zincirleme reaksiyonun yayılmasına neden olurlar.



LO^{\cdot} : lipid alkoksil radikali

3. Yayılma evresinden sonra iki radikal bir araya gelerek ya inaktif; radikal olmayan bir ürün oluştururlar veya bir antioksidan tarafından ortadan kaldırılırlar.

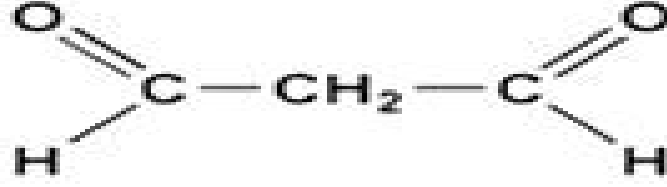


LOOOL : inaktif radikal

LOOOL radikal olmayan ürünler + O_2 (Akkuş 1995).

Lipit peroksidasyon reaksiyonlarında oluşan lipit peroksitleri sonuçta son ürünler olan malondialdehit (MDA), hidroksinonenal (HNE) ve hegzanal gibi aldehitlere dönüşür (Kanner ve ark. 1987; Esterbauer 1991). Antioksidanların yokluğunda peroksil radikalleri kendi aralarında çapraz kovalent bağ oluşturarak membran akışkanlığında bozulma, membran potansiyelinde azalma, mebranların başta H^+ olmak üzere iyonlara karşı geçirgenliğin artmasına neden olarak membranların yırtılmasına ve organellerin içeriğinin hücre sitozolüne sızmasına neden olur. Tüm bu reaksiyonlar sonucunda hücre hasarı ve ileri dönemde de hücre ölümü meydana gelir (Catala 2006).

2.5.3.1. Malondialdehit (MDA)



Malondialdehyde

Şekil 2.2. Malondialdehit (MDA)' in yapısı

Lipid peroksidasyon ürünlerinin hücredeki membranöz yapılarda direk yolla hasar meydana getirir. Ayrıca indirekt yolla da toksik etkili reaktif aldehitler üreterek hücre içi diğer yapılara zarar verir. Lipid peroksidasyonu ortaya çıkan malondialdehid (MDA), toksik etkili olup membran komponentlerinde arasında çapraz bağlanmalara ve polimerizasyona neden olur. Bu durum membran yapısında hasarlanma olması dışında membrandaki iyon transportu ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerinin değişmesine yol açar. MDA bu toksik etkileri nedeniyle mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir aldehit olarak kabul edilir.

2.6. İskemi Reperfüzyon Hasarı

Bir organa gelen kan akışının çeşitli sebeplerden ötürü yetersiz kalması veya durması iskemi olarak adlandırılır. Kan akımının yeniden başlaması olayı ise reperfüzyon olarak adlandırılır. Bir dokuya bir süreliğine kan akışının olmamasının ardından aniden kan akımının gerçekleşmesi yani dokunun reperfüzyonu, serbest radikal oluşumunda ani artışa neden olur, bu da dokuda hasar meydana getirir.

Kan akımında bozulma ya da dokularda iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı klinik olarak vasküler cerrahi, doku transplantasyonu, turnike uygulaması, travma sonrası gelişen kompartman sendromu veya çeşitli nedenlere bağlı olarak ampute olmuş ekstremitelerin cerrahi olarak replantasyonu gibi durumlarda görülür (Cotran ve ark 1995; Herbert ve ark 2001).

İskemiye bağı olarak iskeminin gerçekleştiği doku hipokside kalır ve bunun sonucunda doku hasarı meydana gelir. İskemi, hücrede enerji düzeyini düşürerek ve metabolizma sırasında oluşan toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak yaşamsal fonksiyonların bozulmasına ve sonuçta hücre ölümüne kadar süren metabolik yan yolların tetiklenmesine neden olur (Welbourn ve ark 1991).

Reperfüzyon ise dokuya kan akışının yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuya kan akışının yeniden başlaması durumunda, bölgeye toplanan polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve diğer inflamatuvar hücreler tarafından salınan serbest radikaller doku hasarının ilerlemesine yol açar. Bu süreç “reperfüzyon hasarı” olarak adlandırılır (Cotran ve ark 1995). Hasarın şiddeti sadece iskeminin süresine değil aynı zamanda dokuya özgü diğer faktörlere bağı olarak değişir (Petrasek ve Walker 1994).

İskemi-reperfüzyonda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu birbirine bağı dört ana biyokimyasal mekanizma ile açıklanmaktadır (Gupta ve ark. 2014).

- I) Ksantin oksidaz yolağı üzerinden,
- II) Elektron transport zinciri (ETZ),
- III) Nitrik oksit sentaz
- IV) Fagositik hücre aracılı olmak üzere ortaya çıkar.

2.6.1. İskemi-Reperfüzyonda ROS Oluşumu

2.6.1.1. Ksantin Oksidaz Yolağı Üzerinden ROS Oluşumu

İskemi süresince mitokondriyal ATP üretimi durur ve hücredeki var olan ATP katabolize olur (Granger ve ark. 1981). Sonuçta sırasıyla ADP, AMP, adozin, inozin ve hipoksantin açığa çıkar. ETZ'deki üretimin durması ve hücredeki ATP yıkımına bağı olarak gerçekleşen enerji kaybı, membran yapısındaki ATP bağımlı iyon pompalarında fonksiyon bozukluğuna yol açar. Bu durum hücre içinde anaerobik fazın baskın hale gelmesine neden olur. Anaerobik metabolizma sonucunda sitoplazmada son ürünlerden olan laktat ve hidrojen miktarında artış meydana gelir. Hücre içi pH düşer ve asidoz meydana gelir. Hücre sitozolünde artan hidrojen iyonlarının dengelenmesi için $\text{Na}^+\text{-H}^+$ pompası devreye girer ve artan hidrojen hücre dışarısına atılır. $\text{Na}^+\text{-Ca}^{+2}$ pompası aracılığıyla hücre dışı kalsiyum kalsiyum hücre içerisine yer değiştirir ve hücre içerisinde kalsiyum artışı olur (Baines 2009). Hasara uğramış

olan endoplazmik retikulumdan da hücre içerisine kalsiyum salınımı meydana gelir ve sonuçta hücre içi kalsiyum artışı olur (Sanada 2011). İntraselüler kalsiyumdaki artış, kalsiyum bağımlı sitozolik proteazları aktif hale getirir (De Martino 1981). Aktive olan proteazlar, hücre içi hipoksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür (Schaffer ve ark. 1983). Ksantin oksidaz ise reperfüzyonla sağlanan moleküler oksijeni yükseltgeyici olarak kullanır ve hücre içinde bulunan hipoksantini ksantine dönüştürür. Ksantin ise son ürün olan ürik asiti meydana getirir. Bu reaksiyonlar sırasında ROS ailesine ait süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur. Ksantin oksidazın etkisiyle artan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) SOD etkisi ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'e dönüşür. Oluşan hidrojen peroksit miktarı katalazın antioksidan kapasitesini aşar ve tamamen suya dönüştüremez. Artan hidrojen peroksit Fe^{+2} gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girerek hidroksil radikalinin (OH^{\cdot}) oluşumuna yol açar (Valko ve ark. 2005). Artan serbest radikaller sonuçta hücre zedelenmesine sebep olur (Esterbauer ve ark. 1991; Catalá 2006).

2.6.1.2. Mitokondriyal Hasar ve ROS Oluşumu

Fizyolojik şartlarda hücre içi oluşan süperoksit radikalinin başlıca kaynağı mitekondrideki elektron transport zinciridir. Hücreye alınan moleküler oksijenin büyük kısmı (%90) ETZ'de suya indirgenirken çok az bir kısmı (%1-2) ETZ üzerinde bulunan kompleks I ve III te meydana gelen elektron sızıntısına bağlı olarak süperoksit radikalini oluşturur. Daha sonra süperoksit radikali, SOD enzimi tarafından dismutasyonla ortamdan uzaklaştırılır. İskemi sırasında ETZ' de moleküler elektron akışı durur ve başta kompleks I olmak üzere ETZ'nin diğer üyeleri de indirgenmiş seviyede kalır. Komplekslerden sızan elektronlar ise rezidüel oksijenle birleşerek süperoksit radikalinin oluşumuna neden olurlar. Reperfüzyonda ise kan akımının sağlanması ile gelen oksijene bağlı olarak süperoksit üretiminin artması ile hasar derinleşir (Solaini and Harris 2005). İlave olarak serbest radikallerin mitokondri membranında hasar oluşturması sonucu ortama daha fazla serbest radikal salınımı olur.

Monoaminoksidaz (MAO) enzimi de mitokondride yerleşim gösterir ve ROS üretiminde rol alır. Normal şartlar altında MAO enzimi nörotransmitter sentezinde deaminasyondan sorumludur. Reaksiyon sırasında H_2O_2 bir yan ürün olarak ortaya çıkar (Di Lisa 2009). Reperfüzyonda meydana gelen ROS üretiminin artışı antioksidan kapasitenin azalmasına bağlı olarak ortamdan uzaklaştırılmaz ve oksidatif denge bozulur. Sonuç olarak hücre hasarına sebep olacak süreçleri başlatır.

2.6.1.3. Fagositler (makrofaj, nötrofil v.b.) ve Endotel Hücre Aracılı ROS Oluşumu

Reperfüzyonla bölgeye gelen inflamatuvar hücreler (başta nötrofiller) ile endotel hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşimler sonucunda ROS üretimi ortaya çıkar. Hem inflamatuvar hücrelerden (başlıca makrofaj ve mast hücreleri) hem de endotel hücrelerden sekrete edilen pro-inflamatuvar sitokinler özellikle polimorf çekirdekli lökositlerin (PMNL) bölgeye göç etmesine ve adhezyonuna sebep olur (Serracino-Inglott F. 2001). Normal fizyolojik koşullarda fagositik lökositler inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak aktive olurlar ve oksidan mediyatörler üretirler; bu olaya solunumsal patlama adı verilir. Fagositik hücrelerde ROS üretimi ile sonuçlanan bu solunumsal patlamadan NADPH oksidaz enzimi sorumludur. Bu enzim aracılığıyla üretilen süperoksit radikalleri SOD'un katalizi ile sönce hidrojen perokside ve myeloperoksidaz katalizi ile de hipokloröz asite dönüşür. Hidrojen peroksit Fe^{+2} varlığında alternatif bir yolakla Fenton reaksiyonu üzerinden hidroksil radikaline (OH^*) dönüşür. Fagositik hücrelerden salınan ROS dışında IL-1, 6 ve TNF α gibi sitokinler ile kollejenaz ve elastaz gibi proteazların sekresyonu da artarak bölgeye daha fazla inflamatuvar hücre toplanmasına yol açar (Parks and Granger 1986).

Endotel hücrelerinde ise I/R'da integrin ve selektin gibi hücreyel adhezyon molekülleri eksprese olur. Söz konusu adhezyon molekülleri bölgeye inflamatuvar hücrelerin toplanmasını kolaylaştırır ve ROS üretiminin artışına katkıda bulunur (Phillips ve ark. 2005).

2.6.1.4. İskemi-Reperfüzyonda Nitrik Oksitin Rolü

Nitrik oksit (NO^*), reaktif bir radikaldir. Başlıca nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesinin İzofomşlarınca sentezlenir. Bu izoformlar, endotelial (eNOS), indüklenbilir (iNOS) ve nöronal (nNOS) nitrik oksit sentazdır (Szocs 2004). Nitrik oksit üretiminin hızı ve miktarı değişken olup I/R hasarında önemli rol oynar. Normal fizyolojik şartlarda endotelial hücrelerde az miktarda üretilen eNOS vazodilatasyon, düz kaslarda gevşeme, antiinflamatuvar ve trombosit fonksiyonları ile hücre içi sinyal iletiminde düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir bileşiktir (Esme ve ark. 2006). Ancak iskemi-reperfüzyon durumunda ortaya çıkan süperoksit radikalleri ortamda normalde fizyolojik olarak üretilmiş olan nitrik oksit ile tepkimeye girer. Bu tepkime sonucunda peroksinitrit ($ONOO^-$) ve nitrojen trioksit (N_2O_3) bileşikleri üretilir. Her iki bileşik de yüksek derecede toksik ve hücre içi bileşenlerle reaktivite gösteren ileri derecede reaktif bileşiklerdir (Szocs 2004). Bunun yanında endojen olarak üretilen NO^* in tükenmesine de yol açtığından dolayı NO^* in normal fizyolojik etkilerini göstermesini engeller.

2.7. Antioksidan Tanımı, Etki Mekanizması ve Antioksidanların Sınıflandırılması

Okside olabilen bir maddenin oksidasyonunu geciktirme veya önleyebilme yeteneğine sahip olan maddelere antioksidan denir (Rikans ve Hornbrook 1997). Organizmada oksidanların seviyesi ve antioksidanların gücü denge halindedir. Oksidanların belirli bir düzeyin üzerinde oluşması ya da antioksidanların yetersiz kalması halinde, reaktif oksijen türleri hücre içi protein, lipit, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimlerde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara yol açarlar (Yu 1999).

Antioksidan savunma; radikal metabolitlerin üretiminin engellenmesi, ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi, hücresel yapılarda meydana gelen hasarının tamir edilmesi, ve sekonder radikal oluşumundan sorumlu zincirleme şeklinde ortaya çıkan reaksiyonların engellenmesini kapsayan mekanizmadır. Antioksidanlar; intrasellüler ve ekstrasellüler antioksidanlar veya endojen ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Gutteridge 1995).

2.7.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar genel olarak enzimatik etkili antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki şekilde incelenirler.

2.7.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Oksidasyona karşı savunmada önemli rol oynayan ve enzimatik etkili antioksidanlar sınıfında başlıca katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve mitokondriyal sitokrom oksidaz (Mit-STO) yer almaktadır.

-Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalini katalitik olarak uzaklaştırır. Genel olarak bütün aerobik hücrelerde SOD enzimi bulunur. Hücre içerisinde hem sitozolde hem de mitokondride bulunur. Görevi ise süperoksit radikallerini etkisiz hale getirerek hücreleri bu radikalın yol açtığı oksidatif hasara karşı korumaktır. Dokulara oksijen sağlanması ile SOD aktivitesinde artış meydana gelir. SOD enzimi normal fizyolojik koşullarda fagosite edilmiş bakterilerin yok edilmesinde görev alır ve inflamatuvar yanıtta önemli rol oynar. Yapısında bulunan metal iyonuna göre ise sitozolik dimerik yapıda Cu, Zn-SOD ve tetramerik yapıda mitokondriyal SOD (Mn-SOD) olmak üzere iki gruba ayrılır (Seven ve Candan 1996; Maltes ve Sanchez 1999).

- Katalaz (CAT): Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'yi ortadan kaldırır. Yapısında hem içeren bir enzim olup hem peroksidomlarda hem de sitozolde bulunur. Hidrojen peroksidin (H_2O_2)

moleküler oksijen ve suya indirgenmesinden sorumludur. (Akkuş ve ark. 1995; Seven ve Candan 1996).

-Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): H_2O_2 düzeyi düşük miktarda ise GSH-Px tarafından katalizlenir. Ayrıca organik hidroperoksitleri ortamdan uzaklaştırır. Glutasyon peroksidaz tetramerik yapıda bir enzim olup hücre içinde sitoplazmada bulunur. Yapısında dört adet selenyum (Se) atomu yer alır. Özellikle fagositik hücrelerde solunum patlamasında görev alır. GSH-Px, hem lipit peroksidasyonunun başlamasını önler, hem de lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan lipit hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar (Seven ve Candan 1996). GSH-Px enzim aktivitesinde azalma hücre hasarı ile sonuçlanır.

-Mit-STO: Oksijen taşıma zinciri içinde suya indirgenirken elektron kaçaklarını önleyerek O^{2-} , H_2O_2 , $^{\cdot}OH$ salınımını engeller.

-Glutasyon redüktaz (GR): İndirgenmiş glutasyonun yüksek seviyelerde tutulması için önemlidir. Prüdin nükleotid içeren flavo enzimdir. Flavoprotein yapısındaki glutasyon redüktaz, NADPH ile birlikte hücre içinde bulunan ve antioksidan savunmada rol alan, okside glutasyonun (GSSG), indirgenmiş glutasyona dönüşümünde rol alır. Glutasyonun indirgenmiş formda bulunması hücre içerisinde mevcut olan antioksidan enzimin aktivitesinin sürdürülebilmesi için önemlidir. Özellikle GSH-Px ve katalaz aktivitelerin eş zamanlı meydana gelebilmesi için hücre içerisinde sürekli bulunması gerekmektedir. Bunun dışında, selenyum seviyesindeki azalış da GSH-Px ve glutasyon redüktaz aktivitelerinde bozulmaya yol açar. Glutasyon redüktaz enziminin eksikliği özellikle oksidatif strese karşı yüksek duyarlılığı olan eritrositlerin H_2O_2 'i detoksifiye etmesinde yetersizliğe ve sonuçta ve eritrosit fragilitesinde artışa yol açar (Seven ve Candan 1996).

- Glutasyon S transferaz (GST): Toksik metabolitler ile GSH'ın konjuge olmasını katalizleyerek metabolitlerin detoksifikasyonu gerçekleştirir. Eksojen olarak alınan veya endojen reaksiyonlar sonucunda oluşan toksik bileşikler glutasyon ile konjuge edilerek ya da GST ile katalizlenen bir dizi reaksiyonla daha hidrofilik (suda çözünen) bileşiklere dönüştürülür ve safra veya idrar yoluyla atılırlar. GST'nin ayrıca lipit hidroperoksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizmasında rol aldığı ileri sürülmüştür (Seven ve Candan 1996).

2.7.1.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

Çizelge 2.2. Enzim olmayan antioksidanlar

Albümin: Bakır ve Hem grubu bağlar, HOCl'u ortamdan temizler.
Seruloplazmin: Bakır iyonlarını bağlar, H ₂ O ₂ 'i kullanarak bakırın reoksidasyonunu
Transferrin: Ferrik haldeki demir iyonlarını (Fe ³⁺) bağlar.
Laktoferrin: Ferrik haldeki demir iyonlarını (Fe ³⁺) düşük pH değerlerinde bağlar.
Haptoglobin: Hemoglobini bağlar .
Hemopeksin: Hem grubunu bağlar.
Bilirubin: Peroksil radikallerini temizler.
Glikoz: Hidroksil radikallerini (OH [•]) temizler.
Ürat: Radikalleri temizler ve metalleri bağlar.
Melatonin: Hidroksil radikallerini (OH [•]) temizler.
Mukus: Hidroksil radikallerini (OH [•]) temizler.
Makromoleküller: Seruloplazmin, transferin, ferritin, hemoglobin, miyoglobin,
Tiyol İçerenler: Glutatyon, N-asetil sistein, metiyonin, kaptopril.
Mikromoleküller: Glukoz, ürik asit, bilirubin, albümin, ubiquinon, melatonin,

2.7.2. Ekzojen Antioksidanlar

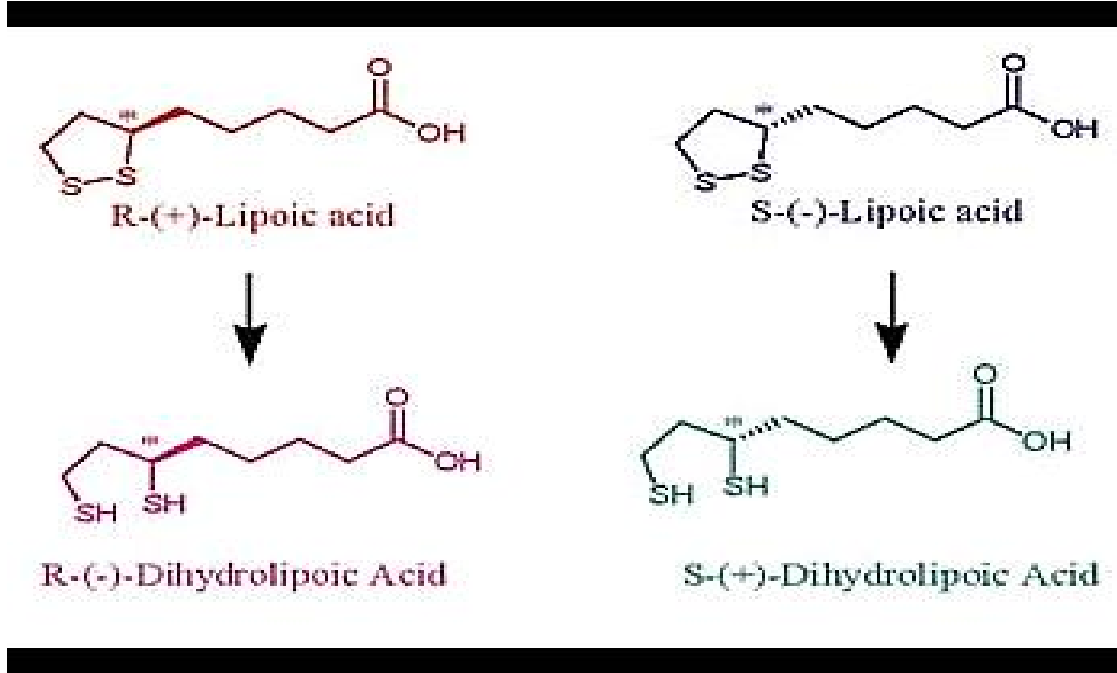
Çizelge 2.3. Ekzojen antioksidanlar

Ksantin oksidaz inhibitörleri	Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler	
NADPH oksidaz inhibitörleri		
Nötrofil adhezyon inhibitörleri		Non-enzimatik serbest radikal
Soya fasulyesi inhibitörleri		toplayıcıları
Rekombinant human-SOD		Demir şelatörleri
Trolox-C		Sitokinler
	Barbitüratlar	
	Flavonoidler	

(Navari ve ark. 2002).

2.8. Alfa Lipoik Asit ve DHLA

Alfa lipoik asit kimyasal adı 1,2 ditiolan-3-pentanoik asit olan, sekiz karbonlu yağ asididir. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin tümünde bulunur. İnsanda oksidatif glikoz ve hücrel enerji üretiminde rol oynayan bazı mitokondriyal enzimlerin kofaktörüdür (Song ve ark. 2005). Alfa lipoik asit sekiz karbonlu bir bileşiktir ve yapısında ditiyolen halka yapısında iki adet sülfür atomu bulunur (Cadenas 2001).



Şekil 2.3. Dihidrolipoik asit ve alfa lipoik asitin yapısı

Alfa lipoik asit, enzimin açıl grubunu bağlar ve enzimin bir tarafından diğer tarafına transfer eder. Kendisi de dihidrolipoik aside (DHLA) indirgenir. Dihidrolipoik asit lipomid dehidrogenaz enzimiyle yeniden okside olur. Biyolojik hücrelerde alfa lipoik asitin güçlü antioksidan form olan dihidrolipoata redüksiyonu enzimatik reaksiyonlarla gerçekleşir.

Alfa lipoik asiti DHLA'e indirgeyen bazı enzimler vardır, bunlar ALA'in R enantiyomerine oldukça spesifik bir enzim olan lipoamid dehidrogenaz, S-enantiyomerine spesifik olan glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktazdır (Song ve ark. 2005).

2.8.1. Lipoik Asidin ve DHLA'nın Metabolizması

Lipoik asit oral yolla alındığında büyük oranda (yaklaşık % 93) gastrointestinal sistem aracılığıyla emilir. Karaciğerde yaklaşık % 20-30 oranında ilk geçiş eliminasyonuna uğrar. Lipoik asit emilimini takiben karaciğerde DHLA formuna indirgenir. Hem alfa lipoik asit hem de dihidrolipoik asit aynı zamanda β -oksidasyona uğrarlar. Ratlarda da insanlarda da ALA idrarla atılır; ana metaboliti 4,6 bismetilmerkaptiheksanoik asittir (Song ve ark. 2005).

2.8.2. Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı

ALA, bir süreden beri diyabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar chagas hastalığı ve HIV gibi çeşitli hastalıkların ve alkole bağlı karaciğer hasarı, radyasyon hasarı, mantar zehirlenmesi, iskemi ve reperfüzyon (I/R) hasarı, ağır metal zehirlenmesi gibi toksik patolojilerin tedavisinde kullanılmaktadır (Pfaffly 2001).

2.8.3. Lipoik Asidin Etki Mekanizması

Lipoik asit açıl taşıyıcı özellikte olup yapısında iki adet elektron taşımaktadır. Karbonhidrat metabolizmasında görevli enzimlerden olan pirüvat dehidrogenaz ve alfa-ketoglutarat dehidrogenaz multienzim kompleksleri yapısında yer alır (Ersoy E., Baysu N. 1986). Asetil koenzim A sentezi sırasında pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonunda koenzim olarak rol alır. Pirüvat ilk önce karboksil grubunu kaybeder ve hidroksietil türevi halinde enzime bağlı tiyamin pirofosfata bağlanır. Ardından elektronlar ve asetil grubu dihidrolipoil transasetilaz enzimine bağlı olan lipoik aside transfer edilir ve 6-asetildihidrolipoik asit meydana gelir. Bunun ardından lipoik asit üzerindeki asetil grubunu koenzim A'ya transfer eder ve böylece redükte dihidrolipoik asit meydana gelir. Lipoik asidin okside forma dönüşmesi dihidrolipoildehidrogenaz enzimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Lipoik asit karboksil grubundan dihidrolipoil dehidrogenaz enzimidaki lizin aminoasidinin ϵ -amino grubuna ATP bağımlı sentetaz aracılığıyla bir amid bağıyla bağlanmaktadır. Lipoik asit açıl gruplarını bağlar, ardından bu grupları diğer enzim kompleksine transfer eder. Bu esnada lipoik asit dihidrolipoik aside indirgenir. Dihidrolipoik asit daha sonra NADH oluşumunda lipoamid dehidrogenaz enzimi aracılığıyla reokside olur. Böylelikle lipoik asit ile dihidrolipoik asit redoks çifti gibi davranarak, NAD' ye dehidrogenazın substratından elektron taşırlar. İnsanda R-Lipoik asit oksidatif metabolizmada temel rol oynayan mitokondriyal proteinlerde lipoillisin formunda bağlı halde bulunur (Gözükara 1989).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları

Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen, 12-16 haftalık, ağırlıkları 300-350 gr arasında değişen, her grupta 8 adet rat olacak şekilde (5 grup) 40 adet Wistar albino cinsi erkek rat çalışmaya alınmıştır. Ratlar, tel kafeslerde; herbir kafeste 4 hayvan olacak şekilde 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusların sağlandığı ortamda, ortam sıcaklığı 20-24 °C ve nem oranı %40-50 olacak şekilde tutulmuştur. Çalışma protokolü ve deneysel yöntem Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup çalışma süresince etik kurallara uyulmuştur (2015/8-2).

3.2. Deneysel Çalışma Yöntemi

Sıçanlar, eşit sayıda (n=8) ve rastgele olarak beş gruba ayrılmıştır. Gruplar; Kontrol Grubu (grup 1), İskemi-reperfüzyon grubu (grup 2), Uzun Dönem Lipoik Asit Grubu (grup 3), Kısa Dönem Lipoik Asit Grubu (grup 4) ve Kısa Dönem Dihidrolipoat Grubu (grup 5) olacak şekilde düzenlenmiştir.

Grup 1; Kontrol grubu, standart rat yemi ve distile su ile kısıtlama olmadan (ad libitum) çalışma süresince (14 gün) beslenmiştir, çalışma süresince herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Çalışma sonunda anestezi altında kalpten kan alma yöntemiyle sakrifiye edilmiştir.

Grup 2; İskemi-reperfüzyon grubu, standart rat yemi ve distile su ile kısıtlama olmadan (ad libitum) çalışma süresince (14 gün) beslenmiştir, ardından deneysel olarak böbrekte 45 dakika İskemi/4 saat reperfüzyon modeli oluşturulmuştur. İskemi-reperfüzyon süresinin sonunda anestezi altında kalpten kan alma yöntemiyle sakrifiye edilmiştir.

Grup 3; Uzun Dönem Lipoik Asit Grubu, çalışma süresince ratlar standart rat yemi ve distile su ile kısıtlama olmadan (ad libitum) beslenmiştir. Çalışma süresince (14 gün) günlük 100 mg/kg intraperitoneal yoldan lipoik asit uygulaması yapılmıştır, süre bitiminde 45 dakika İskemi/4 saat Reperfüzyon oluşturulmuştur. Ardından anestezi altında kalpten kan alma yöntemiyle ratlar sakrifiye edilmiştir.

Grup 4; Kısa Dönem Lipoik Asit Grubu, çalışma süresince (14 gün) ratlar standart rat yemi ve distile su ile kısıtlama olmadan (ad libitum) beslenmiştir. İskemi/Reperfüzyondan sadece 2 saat

önce 100 mg/kg şeklinde lipoik asit intraperitoneal tek doz olarak uygulanmıştır, uygulamadan iki saat sonra deneysel olarak 45 dk iskemi/4 saat reperfüzyon modeli oluşturulmuştur, ardından anestezi altında kalpten kan alma yöntemiyle ratlar sakrifiye edilmiştir.

Grup 5; Kısa Dönem Dihidrolipoat Grubu, çalışma süresince (14 gün) ratlar standart rat yemi ve distile su ile kısıtlama olmadan (ad libitum) beslenmiştir. İskemi/Reperfüzyondan sadece 2 saat önce 100 mg/kg şeklinde dihidrolipoat intraperitoneal tek doz olarak uygulanmıştır, uygulamadan iki saat sonra deneysel olarak 45 dk iskemi/4 saat reperfüzyon modeli oluşturulmuştur, ardından anestezi altında kalpten kan alma yöntemiyle ratlar sakrifiye edilmiştir.

3.3. İskemi Reperfüzyon Modelinin Oluşturulması

Deneysel iskemi-reperfüzyon modeli; Deneklerin anestezisi 80 mg/kg ketamin ve 12 mg/kg Ksilazin verilerek gerçekleştirilmiştir. Karın ön duvarı tıraşlanarak, kesi alanı karın orta çizgisi (Linea Alba) antiseptik özellikteki %10'luk povidon-iyot solüsyonu ile muamele edilmiştir. Kesi, ksifoidden pubise kadar yapılmıştır. Obturator kaslar küt diseksiyonla açılmıştır. Kesi kenarları, bağırsaklar ve karaciğer dikkatli bir şekilde ekarte edilip nemli ılık gazlı bezlerle örtülmüştür. Böbrekler L1 ile L3 vertebralar arası seviyede yerleşmiş şekilde ortaya konmuştur (Barry 2002; Jakubowski 1985). Sol böbrek arter bulunup bulldog klemp (Vascu-statts, Scanlan, USA) vasıtasıyla klemlenmiştir. Pulsasyon olmayışı ile arteriel kan akımının olmadığı tespit edilmiştir. 45 dk'lık iskemi sonrası klempler kaldırıldıktan sonra böbrek renginin açılması ve pulsasyonun görülmesi ile arteriovenöz akımın tekrar başladığı anlaşılmıştır. Karın iki adet prolen dikiş (3/0 polypropylene, Prolene®; Ethicon, USA) ile yaklaştırılmıştır. 4 saatlik reperfüzyonun sonunda nefrektomiyle biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için doku örneği ile intrakardiyak ponksiyonla biyokimyasal inceleme için kan örneği alınmış, alınan kan örnekleri vakumlu jelli tüplere (BD Vacutainer SST, UK) konulmuştur, alınan doku örneği ikiye bölünmüş olup yarısı alüminyum folyo ile paketlenerek hızlıca -80°C'ye kaldırılmıştır, diğer yarısı histolojik incelemeler yapılmak üzere zinc-formaldehit çözeltisi içerisine konmuştur ve deney sakrifikasyonla sonlandırılmıştır.

3.4.Örneklerin Alınması ve Saklanması

Jelli Biyokimya tüplerine alınan kanlar 1500 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımları alınarak ependorflara porsiyonlandı, biyokimyasal analizler yapılmak üzere -80 °C'de saklandı.

Böbrek dokusu çıkarıldıktan sonra ikiye bölünerek yarısı histopatolojik inceleme için %10 luk zinc-formaldehit içerisine kondu, diğer yarısı oksidatif stres parametrelerine bakmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.5. Homojenizasyon

3.5.1. Fosfat tamponunun hazırlanması

A Solüsyonu Hazırlanışı: NaH_2PO_4 ten 6,805 gr alındı 1000 ml distile su ile tamamlandı.

B Solüsyonunun Hazırlanışı: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17,907 gr alınıp 1000 ml ye distile su ile tamamlandı.

A ve B solüsyonu aşağıda belirtilen miktarlarda karıştırıldı ve pH:7.00 olacak şekilde ayarlandı.

Tampon: 413 ml A Solüsyonu + 587 ml B Solüsyonu (pH:7.00)

3.5.2.Bıçaklı Homojenizatörde Homojenizasyon

Dokular tartıldı, ağırlıkları kaydedildi.

Tampon miktarı doku ağırlığının 9 katı olacak şekilde hesaplandı (Doku ağırlığı x 9).

Tartılan doku homojenizasyon yapılacak tüplere alındı, ilk önce hesaplanan tamponun yarısı koyularak soğuk zincirde (buz dolu kabın içerisinde) homojenizasyon işlemine başlandı.

2 dk homojenize ettikten sonra tamponun diğer yarısı eklendi, doku tamamen homojenize olana kadar homojenizasyon işlemine devam edildi.

Elde edilen homojenatların 700 μL si MDA ve homojenat protein tayinleri yapılmak üzere ependorflara porsiyonlanarak -80 °C'de saklandı.

Elde edilen homojenatların kalan kısmı 3220 rpm'de 40 dk +4 °C'de santrifüj edildi.

Santrifüj edilen örneklerin süpernatantları porsiyonlanarak -80 °C’de saklandı.

Ayrılan süpernatantların bir kısmı ile CAT, GSH-Px, ve süpernatant protein tayinleri yapıldı, kalan kısım SOD enzim aktivite tayini için etanol-kloroform fazı oluşturmak üzere -80 °C’de saklandı.

SOD aktivite ölçümü için porsiyonlanmış süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile (Sun Y, 1988) vortexlenip cam tüpte 3220 rpm / 40 dakika +4°C’de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

3.6. Protein Tayini

Protein miktar tayini Bradford’un boya bağlama esaslı yöntemi ile yapılmıştır. 1976 yılında ilk kez Bradford tarafından tarif edilmiştir. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılır. Kısaca, proteinlerin fosforik asitli ortamda Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile bağlanarak renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası negatif yüklüdür bu sebeple pozitif yüklü proteinlerle kompleks oluşturarak rengi kırmızıdan maviye dönüşür. Bradford protein tayin yöntemi uygulanırken standart çözelti hazırlandı. Stok standart çözelti bovine serum albümin (BSA) kullanılarak konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde istenilen miktarda hazırlandı.

3.6.1.Stok Standart Çözeltisi Hazırlama

Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde 5 mL stok standart çözeltisi için;

5 mg BSA alındı, 5 mL distile suda çözüldü.

Standart çözeltinin doğru hazırlandığını test etmek için 280 nm’deki absorbansına bakılır; 0,66-0,75 absorbans veriyorsa hazırlanan stok çözelti güvenle kullanılabilir.

3.6.2.Standart çözeltilerin hazırlanması

Stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Ölçülen absorbanslar ve çözelti konsantrasyonlarından yararlanılarak kalibrasyon eğrisi elde edildi.

Çizelge 3.1. BSA stok standart çözeltisi

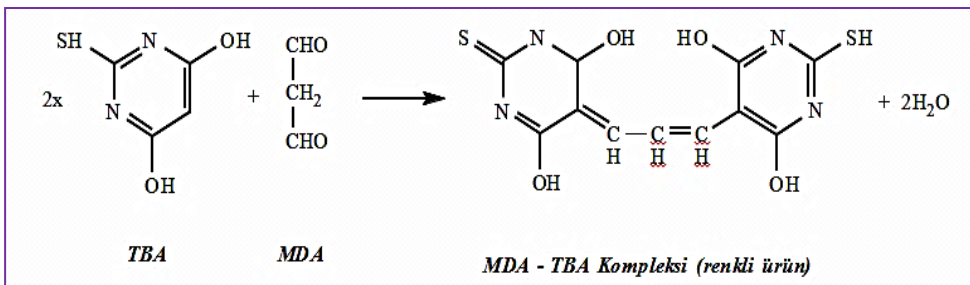
Standartlar	Dilüsyon Oranı	Konsantrasyon mg/ml
ST1	1	1
ST2	1/2	0,5
ST3	1/4	0,25
ST4	1/8	0,125
ST5	1/16	0,0625

3.6.3. Konsantrasyon Hesaplama; Elde edilen kalibrasyon grafiğindeki formül kullanılarak ml'deki protein miktarı (mg/ml) hesaplandı. Gram dokudaki protein miktarı için elde edilen sonuç gr dokuya oranlandı.

3.7. Biyokimyasal Analizler

3.7.1. Malondialdehid (MDA) Miktarının UV Spektrofotometre ile Tayini

Malondialdehid tayini Hammode ve Arkadaşları'nın modifiye ettiği, çift kaynatma esasına dayalı yöntem ile çalışıldı. İlk kaynatmada proteinlere bağlı olan MDA'nın serbestleşmesi için proteinler çöktürülür; ikinci kaynatmada total MDA, TBA ile sıcak ve asidik ortamda reaksiyona girer ve renkli kompleks oluşturur. TBA-MDA'nın oluşturduğu (Şekil 4) renkli kompleks, 532 nm dalga boyunda MDA konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak absorbans verir.



Şekil 3.1. MDA'nın TBA ile reaksiyonu ve oluşan renkli TBA-MDA kompleksinin yapısı

Kullanılan reaktifler:

TCA' nın hazırlanması

10g %10'luk trikloroasetik asit (TCA) alındı 100 ml distile suya tamamlandı.

TBA'nın hazırlanması

0,675g %0,675'lik tiobarbitürik asit (TBA) alındı 100ml distile suya tamamlandı.

Deneyin yapılışı:

MDA tayini yapmadan önce vidalı cam tüplere grup isimleri ve numaraları yazıldı; tüpler 90 °C benmaride 15 dakika inkübasyona maruz kalacağı için yazılar su buharı nedeniyle silinmeyecek şekilde yazıldı.

1. MDA tayini için kör tüpüne 500 µl distile su, numune tüpüne ise 500 µl numune (homojenat) eklendi.
2. Daha sonra herbir numunenin üzerine önceden hazırlanmış olan TCA çözeltisinden 2500 µl eklendi ve vortekslendi. Vorteksin ardından hemen ağzı vidalandı ve daha önce hazırlanmış 90°C benmaride yerleştirilerek, 15 dakika inkübasyon yapıldı.
- 3.İnkübasyonun ardından tüpler soğuk suyla soğutuldu. Tüpler soğuduktan sonra kapaklar çıkartılarak; tüplerin ağzı parafilmlelenerek 3000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj aşaması bittikten hemen sonra tüpler sarsılmayacak şekilde çıkartılıp parafilmlemler açıldı.
5. Daha sonra herbir numune için önceden hazırlanmış diğer vidalı tüplere ekstrakt edilmiş tüplerden çökeleğe dokunmadan süpernatant kısmından 2 ml pipetlenip aktarıldı.
- 6.Daha sonra kör ve numune tüplerine 1'er ml önceden hazırlanmış olan TBA'dan eklendi.
7. Eklemeden sonra tüm tüpler hızlıca vortekslenip tekrar 90 °C benmaride 15 dakika inkübe edildi, inkübasyon esnasında numunelerin hafif turuncu; inkübasyon sonunda ise yavruağzı rengine döndüğü izlendi. Ardından tüpler benmariden çıkartılıp soğutuldu, Son olarak spektrofotometre ile 532 nm dalga boyunda fotometrik ölçüm yapıldı. Körden başlamak suretiyle yapılan ölçümde körün absorbansı sıfırlanıp kör tüpü spektrofotometreden çıkarıldı ve diğer tüplere sırasıyla fotometrik ölçüm yapıldı, çıkan absorbans değerleri kaydedildi.

Çizelge 3.2. MDA ölçümü (pipetleme)

	Kör tüpü	Numune tüpü
% 10'luk TCA (mL)	2500 µl	2500 µl
Numune (mL)	-	500 µl
Distile su (mL)	500 µl	-

3-5 sn vortekslendi. Tüpün ağzı kapatılarak 90 °C'de 15 dakika benmaride inkübe edildi.

Soğuk çeşme suyunda soğutuldu. 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.

	Kör tüpü	Numune tüpü
Süpernatant (mL)	2000 µl	2000 µl
% 0.675'lik TBA (mL)	1000 µl	1000 µl

3.7.2. Standart Eğri Çizimi

MDA stok standartından (1,1,3,3 tetrametoksipropan) 10 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart çözelti hazırlandı.

Eğri çizimi için hazırlanan günlük standart çözeltilerden distile su ile 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/8 oranlarında seyreltme yapılarak 7.5, 15, 30, 60, 75 nmol/ml derişiminde çalışma standartları hazırlandı.

Çizelge 3.3. MDA stok standart çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda çözelti hazırlama

Dilüsyon	1/80	1/40	1/20	1/10	1/8
Konsantrasyon	7.5nmol/ml	15nmol/ml	30nmol/ml	60nmol/m	75nmolml
Stok Çözelti	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
dH₂O	7900 µl	3900 µl	1900 µl	900 µl	700 µl
Toplam Hacim	8000 µl	4000 µl	2000 µl	1000 µl	800 µl

Her standardda deney prosedürü içinde bir örnek gibi muamele edildi, ölçülen absorbanlardan ve bilinen konsantrasyonlardan yararlanılarak standart grafiğı oluşturuldu.

Hesaplama: Standart grafiğinden elde edilen formülden yararlanılarak MDA miktarları belirlendi. Sonuçlar protein miktarına oranlandı.

3.7.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışılmıştır (Aebi 1974). Hidrojen peroksit (H_2O_2) 240 nm'de maksimum absorbands verir. Ortama sonradan ilâve edilen H_2O_2 , katalaz tarafından su ve oksijene dönüştürülür ve ultraviyole spektrumda absorbands azalmasına yol açmaktadır. Absorbandaki bu azalma CAT enziminin spesifik aktivitesi ile doğru orantılı olarak seyretmektedir. CAT enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon şu şekildedir:



Kullanılan reaktifler:

Fosfat tamponunu; Daha önceden homojenizasyon için hazırlanan pH: 7,00 olan fosfat tamponudur.

H_2O_2 Çözeltisinin hazırlanışı:

H_2O_2 çözeltisi; 240 nm'deki absorbandsı 0,500'e ayarlanmış olan H_2O_2 'li fosfat tamponudur.

- 1) Spektrofotometre 240 nm fotometrik ölçüme ayarlandı.
- 2) 300 mL pH: 7,00'lık, 50 mM fosfat tamponu ışık geçirmeyen reaktif şişesin aktarıldı.
- 3) Reaktif şişesindeki fosfat tamponuna 10-20 μ L hacimlerle H_2O_2 ilâve edildi.
- 4) Spektrofotometrede 2. küvete H_2O_2 ilave edilmemiş fosfat tamponu koyuldu, kör absorbands alındı ve sıfırlandı. Ardından H_2O_2 çözeltisinin absorbands ölçümü yapıldı. Optik Dansite (OD) 0.500 oluncaya kadar H_2O_2 ilâvesine devam edildi.

Enzim aktivitesinin kinetik ölçümü

Pipetleme; 2990 μ l H_2O_2 Çözeltisi üzerine 10 μ l ölçümü yapılacak numune (örnek süpernatantı) pipetlendi; çözelti hızlıca karıştırıldı, kuvarz küvete aktarılarak kinetik okuma başlatıldı.

Çizelge 3.4. CAT ölçümü için kör ve numunelerin pipetlenmesi

	Fosfat Tamponu	H₂O₂ Çözeltilisi	Numune (µl)
Kör Tüpü	3000	-	-
Numune Tüpü	-	2990	10

1) Spektrofotometre 240 nm’de kinetik ölçüm yapacak ve 60 saniye boyunca 5 saniye aralıklarla ışın gönderecek şekilde ayarlandı.

2) Spektrofotometrede 2. kısma içerisinde yalnızca fosfat tamponu (kör) bulunan küvet konularak, absorbans sıfırlandı; küvet kinetik ölçüm boyunca bu kısımda sabit tutuldu. 1. kısımda ise sırasıyla numunelerin kinetik ölçümü yapıldı.

Absorbans azalışı bir dakika boyunca izlendi ve absorbanstaki değişimler kaydedildi.

Hesaplama

$$k = \{ [2,3 \times \log (OD_1 / OD_2)] / \Delta t \text{ (sn)} \}$$

OD₁: başlangıçta ölçülen optik dansite

OD₂: bir dakika süre sonunda ölçülen optik dansite

Δt: Ölçüm süresi (1 dakika)

k: Katalaz için hesaplanan 1. derece katsayısı

Daha sonra çıkan değer aynı süpernatandaki protein konsantrasyonuna oranlandı.

$$k/\text{mg protein} = k / [(\text{mg/mL protein}) \times 1000]$$

3.7.4. Süperoksit Dismutaz (Total) Enzim Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi; Sun ve arkadaşlarının metoduna (Sun 1988) ve Durak ve arkadaşlarının uyarladığı değişiklikler (Durak 1993) esas alınarak tayin edilmiştir; metodun prensibi nitro blue tetrazoliumun (NBT) ksantin/ksantin oksidaz sistemi aracılığıyla üretilmiş olan süperoksit tarafından indirgemesidir. Bu sistem aracılığıyla oluşmuş süperoksit radikalleri ortamda bulunan NBT’yi indirgemek suretiyle renkli bileşik oluşturur. Bu bileşik maksimum absorbansı 560 nm dalga boyunda verir. SOD ortamda

mevcut değilse bu indirgeme gerçekleşerek reaktif mavi-mor renk oluştur ancak ortamda SOD bulunduğunda süpreoksitleri ortamdan uzaklaştırdığı için NBT indirgenmesi gerçekleşmez, oluşan kompleksin rengi SOD miktarına ve aktivitesine bağlı olarak açıklık göstermektedir..

1- Ekstrakt Hazırlanması

SOD aktivite tayini için süpernatanda ayrı bir ekstrakt fazı oluşturuldu. Oluşturulan ekstrakt fazından yine süpernatant kısmı alındı ve SOD aktivitesi süpernatantın süpernatantında ölçüldü.

Ekstrakt fazı oluşturmak için özetle;

- 1) Kloroform(3V) / etanol(5V) karışımı hazırlandı.
- 2) (Kloroform + etanol)/ numune V/V oranlarında karıştırıldı.

Ependorflara grup ismi ve numarası yazıldı.

Her tüpe etanol/kloroform karışımından 400 µl koyuldu, üzerlerine 400 µl numune pipetleterek vortekslendi.

Vorteksin ardından hazırlanan ekstrakt 3220 rpm de +4 °C'de 40 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj bittiğinde ependorflar çöken kısmın hareket edip süpernatanta karışmaması için yavaşça sarsılmadan çıkartıldı.

2-Assay Reaktifinin Hazırlanması

İlk olarak ışık geçirmeyen bir reaktif şişesi hazırlandı çünkü assay reaktifinin hazırlanmasında kullanılan ksantin ışığa duyarlıdır.

Çizelge 3.5. Assay reaktifinin hazırlanması

	Kimyasal Adı	Kullanılacak	Distile Su (mL)
1	0,3 mmol/L Xanthine	4,565	100
2	0,6 mmol/L EDTA (2 Na tuzu)	12,5	50
3	150 µmol/L NBT	6,13	50
4	400 mmol/L Na ₂ CO ₃	1270	30
5	1g/L bovine serum albumin (BSA)	15	15

Hazırlanan her bir kimyasal çözeltisi koyu renk cam şişeye köpürtülmeden aktarılmış, 5'i birleştirilerek assay reaktifi hazırlanmıştır.

3-Ksantin Oksidaz (XO) hazırlanması:

Ksantin oksidaz (XO) enzim çözeltisi için alüminyum folyolu bir tüp hazırlandı. İnsulin iğnesi yardımıyla şişe ters çevrilerek alınan XO daha önce hazırlanmış ve folyolu tüpe aktarılmış olan soğuk 2M (NH₄)₂SO₄ çözeltisinin içerisine aktarıldı.

Her numune için 50µl çözelti gerekli. Çalışmada 2,5ml XO çözeltisi hazırlandı.

Öncelikle 0,66 gr 2M (NH₄)₂SO₄ 2,5 ml distile suda çözüldü alüminyum folyolu tüpe aktararak dolapta soğutulduktan sonra üzerine 25 µl XO pipetlendi ve 2-8 °C'de bekletildi.

Çizelge 3.6. Amonyumsülfat çözeltisi ve ksantinoksidaz çözeltisinin hazırlanması

	2M (NH ₄) ₂ SO ₄ (Amonyum Sülfat)	Distile Su (ml)
Amonyum Sülfat	0,66 gr	2,5
0,66 gr amonyum sülfat 2,5 ml soğuk distile su içerisinde çözülür. Buzdolabında bekletilir.		

	XO Enzimi	Amonyum Sülfat Çözeltisi
XO Enzim Çözeltisi	25 µl	2,5 ml
2,5 ml soğuk amonyum sülfat çözeltisi içerisine 25 µl XO enzimi pipetlenir, buzdolabında bekletilir.		

4- 0,8 mmol/L CuCl₂ çözeltisi hazırlanması:

Çizelge 3.7. Bakır klorür çözeltisinin hazırlanması

	0.8 mmol/L	Distile su
CuCl ₂ Çözeltisi	5,4 mg	50 mL
5,4 mg CuCl ₂ 50 ml distile suda çözülür.		

Deneyin Yapılışı

Numune ve kör tüpleri hazırlandı; 3 ayrı kör tüpü hazırlandı.

Herbir numune tüpüne ve kör tüplerine 2,85ml assay reaktifi kondu,

Numune tüplerinin üzerine 100 µl ekstraktın supernatanından eklendi, körlere ise 100 µl distile su eklendi; hemen ardından vortekslendi.

Ardından herbir kör ve numune için 50 µl soğuk XO çözeltisi eklenir, hızlıca vortekslenir.

Bu işlemlerden sonra 25 °C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sona erdiğinde kör tüpleri mor-menekşe rengi alırken numune tüplerinde daha açık mor renk gözlemlendi.

Renk değişiminin devam etmemesi ve absorbansın sağlıklı çıkması için hazırlanan CuCl_2 çözeltisi ile reaksiyon durduruldu. Bunun için CuCl_2 çözeltisinden 1ml kör ve numune tüpleri üzerlerine hızlıca eklenerek ardından vorteks yapıldı.

CuCl_2 eklemesi bitince spektrofotometrik ölçüme geçildi.

Çizelge 3.8. SOD aktivite tayini için pipetleme

	Kör (mL)	Numune (mL)
ASSAY reaktifi	2,85	2,85
Ekstrakt süpernatantı	-	0,10
Bidistile su	0,10	-
XO çözeltisi	0,05	0,05

Kör tüpüne enzim ilâvesinin ardından vortekslenir ve inkübasyon süresi başlatılır.

25 °C’de 20 dakika inkübasyonun ardından hızlıca CuCl_2 ilavesi ile reaksiyon durdurulur;

CuCl_2 çözeltisi	1	1
---	---	---

Spektrofotometrik Ölçüm

Spektrofotometre fotometrik ölçüm için 560 nm dalga boyuna ayarlanarak, havaya karşı sıfırlandı. Distile suya karşı körden başlanarak sırayla körlere ve numuneler için 560 nm’de fotometrik ölçüm yapıldı, absorbanslar kaydedildi.

Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması:

NBT indirgenmesini % 50 inhibe eden SOD enzim aktivitesi bir SOD ünitesi olarak adlandırılır. SOD aktivite tayininde sonuçlar doku için; U/mg protein şeklinde gösterilir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [\text{Absorbans kör (AK)} - \text{Absorbans numune (AN)}] / \text{Absorbans kör (AK)} \times 100$$

% 50'lik inhibisyon 1 U olarak kabul edildiğinden;

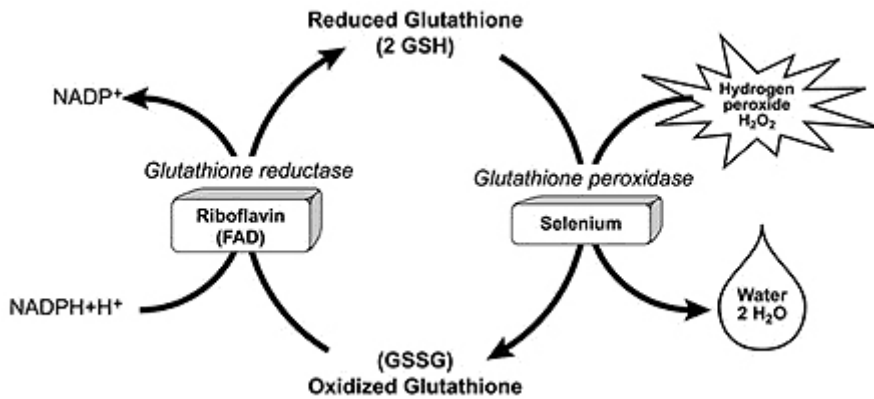
$$\%50 \text{ inhibisyon} = (\% \text{ İnhibisyon} / 50) \times 1 / 0.1 = \text{U} / \text{mL} = (\text{AK}-\text{AN})/\text{AK} \times 20 = \text{Spesifik aktivite (SA)}$$

$$\text{Birimi: Doku için: SA} / (\text{mg protein} / \text{mL}) = (\text{U/mL}) / (\text{mg protein/mL}) = \text{U} / \text{mg protein}$$

3.7.5. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivite Tayini

GSH-Px (EC 1.11.1.9) enzim aktivite tayini Paglia ve arkadaşlarının bulduğu deneysel çalışma yöntemine göre çalışıldı. Glutasyon peroksidaz, redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizleyen enzimdir, bu yükseltgenme hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında gerçekleşir. Ortamda hidrojen peroksit bulunduğu takdirde GSH-Px'ten meydana gelen GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, glutasyon redüktaz ve NADPH aracılığıyla gerçekleşir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP^{+} 'ya oksidasyonu esnasında spektrofotometrik ölçümde absorbans azalışı ile kendini gösterir. Spesifik aktivite 340 nm dalga boyunda yapılan kinetik ölçümle belirlenir.

Enzim Ünitesi: Oksidasyona uğrayan NADPH'ın birim zamandaki mikromol cinsinden miktarıdır.



Şekil 3.2. Glutasyon peroksidaz enzim tepkimesi

Reaktiflerin Hazırlanması

1) GSH-Px Tamponu Hazırlama

Önceden hazırlanmış olan pH:7.00 olan fosfat tamponuna EDTA ilavesi ile hazırlanan tampondur.

500 ml Fosfat Taponu +1,04 gr EDTA

2) Kokteyl Hazırlama

Kokteyl için gerekli çözeltiler;

1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Amonyum sülfat) çözeltisi: 1,056 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 2500 μL su (bu çözelti GSH-redüktaz çözeltisi yapmak için kullanılmıştır).

2) GSH-Px Tamponu: 132,5 ml (önceden hazırlanan GSH-Px tamponu)

3) GSH: 0,25 gr GSH + 5 ml GSH-Px Tamponu

4) NADPH: 0,0333 gr NADPH + 5 ml distile su

5) NaN_3 : 0,0325 gr NaN_3 + 500 μL GSH-Px Tamponu

6) GSH-redüktaz: 25 μL GSH-redüktaz + 750 μL amonyum sülfat (bu miktar 75 numune içindir, 50 numune için hazırlanan çözeltinin içerisinde 500 μL alınmıştır).

Kokteyl için hazırlanan 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı çözeltiler reaktif şişesine sırasıyla aktararak karıştırılmıştır.

3) H_2O_2 Çözeltisi Hazırlama

%30'luk H_2O_2 ve daha önceden hazırlanan GSH-Px kokteyli karıştırılarak hazırlandı.

15 μL H_2O_2 + 5 ml GSH-Px tamponu

4) Pipetleme

Pipetleme için önceden hazırlanmış ve üzerinde grup isim-numarası bulunan tüplerin herbirine GSH-Px aktivite tayini için hazırlanan kokteyl 2870 μL pipetlendi, üzerine 20 μL numune ilavesi yapılarak 30 dk 25 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 100 μL H_2O_2

çözeltisi pipetlenerek tüp hızlıca alt üst edildi ve önceden kinetik ölçüm için hazırlanan spektrofotometrede ölçüm başlatıldı.

Çizelge 3.9. GSH-Px aktivite tayini pipetleme yöntemi

Kokteyl	2870 µL
Numune	20 µL
30 Dk 25 °C Benmari	
H₂O₂ Çözeltisi	100 µL

5) Kinetik Okuma

Spektrofotometre cihazı 340 nm dalga boyunda kinetik ölçüm için ayarlandı, havaya karşı sıfırlandıktan sonra 2 dk boyunca numunelere kinetik okuma yapıldı. Ölçüm boyunca gözlemlenen absorban azalışı kaydedildi.

GSH-Px aktivitesinin hesaplanması:

Kaydedilen absorban azalışından ve NADPH' ın ekstinksiyon katsayısından yararlanılarak GSH-Px enzim aktivitesi hesaplandı, sonuçlar proteine oranlandı.

$$\text{Hesap: IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

$$\text{IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

$$\Delta A = \text{OD değişimi}, t = \text{zaman (dk)}, W = \text{Enzim çözeltisinin protein miktarı (mg/mL)}$$

$$\text{NADPH ekstinksiyon katsayısı} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} = 6.22 \text{ mM}^{-1}$$

3.7.6. Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi

Rutin parametrelerin ölçümü Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında Abbot Architect C-8000 marka otoanalizörde yapılmıştır.

Total Antioksidan Status (TAS): Total antioksidan kapasitesi Erel'in geliştirmiş olduğu Rel Assay kit (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak belirlendi. Trolox adı verilen ve E vitamininin suda çözünür bir analogu olan kalibratör kullanılarak ölçüm yapıldı. Sonuçlar mmol Trolox equiv./lt şeklinde gösterildi. (Erel 2004).

Total Oksidan Status (TOS): Total antioksidan seviyeleri Erel'in geliştirmiş olduğu Rel Assay kitler (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon hidrojen peroksit ile gerçekleştirildi. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./lt şeklinde gösterildi. (Erel 2005).

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ): total oksidan seviyenin total antioksidan kapasitesine oranının yüzdesi olarak bilinen OSİ'yi hesaplarken, TAS sonucunun gösterimindeki mmol değeri TOS sonucunun gösteriminde olduğu gibi μmol birimine dönüştürülerek, sonuçlar "arbitrary unit" (AU) olarak ifade edildi ve aşağıdaki formül esas alınarak hesaplandı. (Erel 2005).

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./lt}}{\text{TAS, mmol Trolox equiv./lt} \times 10}$$

Hesaplama yapılmadan önce Total antioksidan kapasitenin birimi mmol Trolox Ekivalent/L den $\mu\text{mol Trolox Ekivalent/L}$ ye dönüştürülmüştür.

3.8.Histopatolojik İnceleme

3.8.1. Işık Mikroskopik İnceleme İçin Dokuların Takibi

Mikroskopik inceleme için alınan dokular fiksasyon için zink-formaline alındı ve en az bir gün bekletildi. Tespit edilen dokular 12 saat akarsu altında yıkanarak zink-formalin solüsyonundan arındırıldı. Daha sonra sırasıyla, %30, %50, %70, %80, %90 ve %96'lık alkollerde 8 saat bekletilen dokular absolut alkol (%99,9) içerisinde 2X20 dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Şeffaflaştırma ve alkolü dokudan uzaklaştırmak için 2X15 dakika ksilolde bekletilen dokular 1/1 hacimde parafin/ksilol içerisinde 1 saat bekletildikten sonra, saf parafin içine alınıp 4 saat kadar daha bekletildi. İnfiltrasyon işleminin ardından parafin bloklara gömme işlemi gerçekleştirildi. Her bir parafin bloktan, tam otomatik, rotary mikrotom (Leica RM2265,Germany) yardımıyla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlere Hematoksilen-Eosin (H-E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama yapıldı. Preparatlar, Nikon DS- Rİ2 dijital kameralı Nikon Eclipse Ni marka ışık mikroskopunda, NIS-Elements 4.50 yazılım programı kullanılarak incelendi. İncelemeler iki histopatolog tarafından körlemesine yapıldı.

3.8.2. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

- 1.Parafin kesitler ksilolde deparafinize edilerek, azalan alkol derecelerinden geçirilip distile suya kadar getirildi.
- 2.Filtre edilmiş Harri's hematoksilen solüsyonunda yaklaşık olarak 8 dakika kadar bekletildi.
- 3.Kesitler 5 dakika akar suda bekletilerek, Hematoksilen artıklarından arındırıldı.
- 4.Differensiyasyonu sağlamak için % 1 lik asit-alkol solüsyonuna 1 kez batırılıp çıkarılan dokular tekrar akar sudan geçirilerek yıkanmaları sağlandı.
- 5.Amonyaklı suda çekirdekler parlak mavi oluncaya kadar bekletildi.
- 6.10 dakika çeşme suyunda yıkandı ve %80'lik etil alkolde 1-2 dakika bekletildi.
- 7.Zıt boyama için eozin-floksin solüsyonunda 2 dakika bekletildi.
- 8.Dehidratasyon ve parlatma için yükselen derecelerde etil alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

3.8.3. Periyodik asit schiff Boyama Protokolü

- 1.Parafin kesitler ksilolde deparafinize edilerek, azalan alkol derecelerinden geçirilip distile suya kadar getirildi.
- 2.Peryodik asitte 5 dakika bekletildi.
- 3.Distile suda çalkalandı.
- 4.Coleman schiff’de 8 dakika bekletildi.
- 5.Akarsuda 5 dakika yıkandı.
- 6.Harris Hematoksilende 3 dakika bekletildi.
- 7.Cesme suyunda çalkalandı.
- 8.%1’lik Asit alkole batırılıp çıkarıldı.
- 9.Cesme suyunda yıkandı.
- 10.Dehidratasyon ve parlatma için yükselen derecelerde etil alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı

3.8.4. Histomorfometrik İncelemeler

İntertisiyel tübüler hasar değerlendirmede Goujen ve arkadaşlarının kullandığı morfolojik hususlar incelendi. Bu hususlar;

- 1) Hücre apikalinde vokoulizasyon
- 2) Tübüler nekrozis
- 3) Tübüler dilatasyon
- 4) Fırçamsı kenar hasarı
- 5) Hücre ayrılması
- 6) Tübül bazal membran hücresizleşmesi (denudasyonu).

Değerlendirmeye alınan gruplar 6 husus bakımından verilen skorlar toplandı ve diğer gruplarla istatistiksel farkın olup olmadığı araştırıldı.

3.9. İstatistiksel Analiz

3.9.1. Histopatolojik İnceleme Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analizler SPSS (Versiyon 22) kullanılarak yapılmış olup sürekli değişkenler Ortalama±Standart Sapma ve medyan (min-max) olarak sunuldu. Normallik dağılımı Shapiro wilks testi ile değerlendirildi. 2 den fazla grup ortalama karşılaştırmaları Kruskal-Wallis Varyans Analizi ile test edildi. Varyans Analizi sonrasında farklı olan grupları belirlemek için post-hoc ikişerli karşılaştırma için bonferroni testi kullanıldı. İstatistiki anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

3.9.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Grupların istatistiksel olarak tanımlanmasında grup sayısı (N), Ortalama (Mean), Standart Sapma (SD), Ortanca (Median), Çeyrekler Arası mesafe, 25. percentil ve 75. percentil değerleri verilmiştir. Ayrıca grupların normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov-Smirnov normalite testi kullanılarak tespit edildi. $p<0,05$ değerinden küçük olan gruplar normal dağılım göstermemektedir.

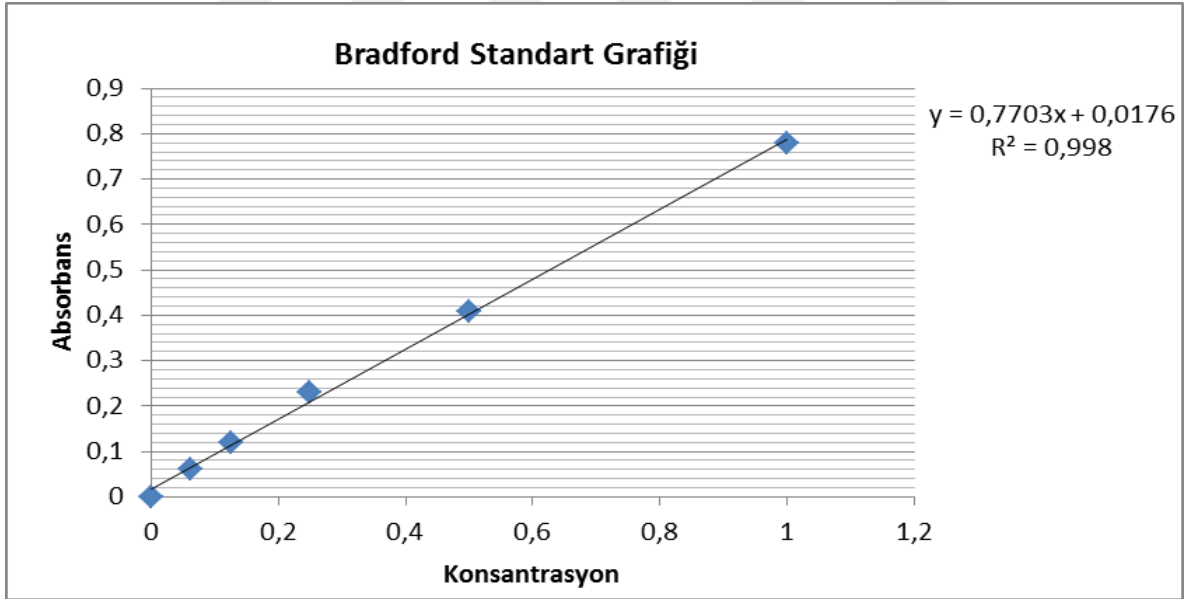
Grupların karşılaştırılmasında, normal dağılıma uyanlarda Tek-yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) testi $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi. Anlamlı farklılık görülen grupların Post-hoc analizi için Student-Newman-Keuls testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan gruplarda ise Tek-yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) testinin non-parametrik karşılığı olan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı fark $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi. Fark çıkan grupların ikili karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Farklılık görülen gruplar box-whisker grafisi ile gösterildi. İstatistiksel analiz için MedCalc (versiyon 15.8) istatistik programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1.BSA ile Hazırlanan Protein Standart Grafiği ve Protein Konsantrasyonları

Çizelge 4.1. BSA ile hazırlanan stok standart çözeltinin seyreltilmesi

Standartlar	Dilüsyon oranı	Konsantrasyon(mg/ml)
St1	1	1
St2	1/1	0,5
St3	1/2	0,25
St4	1/4	0,125
St5	1/8	0,0625
St0	-	0

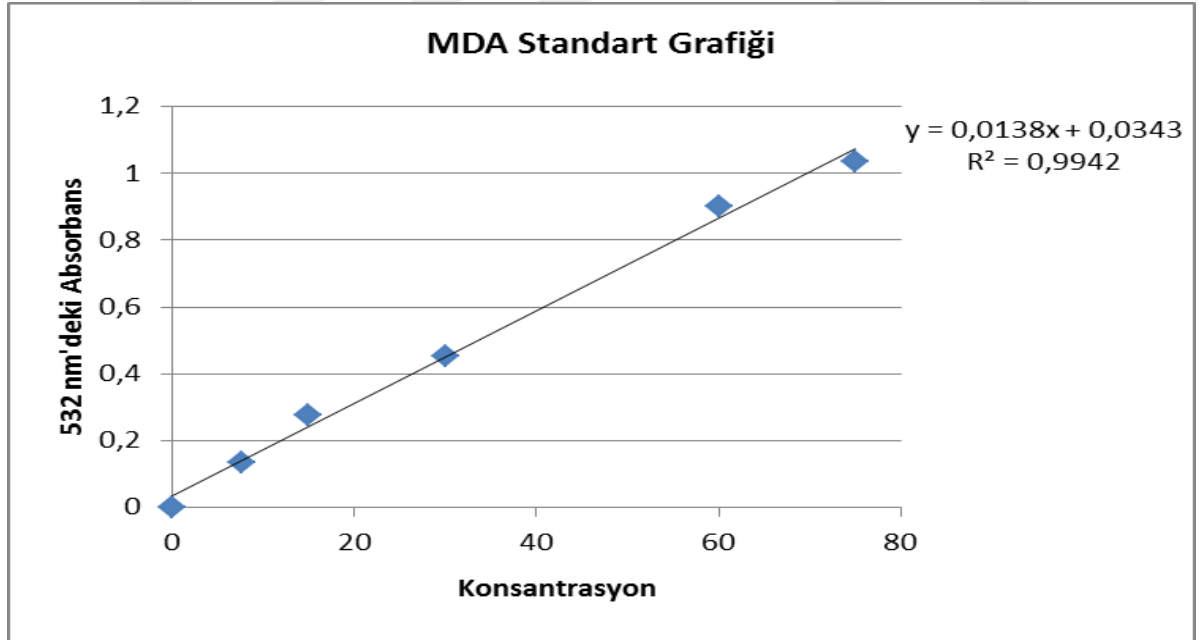


Şekil 4.1. Bradford Standart Grafiği

Çizelge 4.2. Böbrek dokuda ölçülen protein miktarları

Gruplar	Homojenat Protein Miktarı Ortalama±SD (mg protein/gr doku)	Süpernatant Protein Miktarı Ortalama ± SD (mg protein/gr doku)
Kontrol (K)	272 ±62,9	163±7,54
İskemi/Reperfüzyon (I/R)	294,3±39,9	194,4±22,9
Uzun Dönem ALA+I/R	192,2±27,3	177,5±19,2
Kısa Dönem ALA+I/R	222±30	179,9±13,7
Kısa Dönem DHLA+I/R	271,1±33,8	192,6±23,5

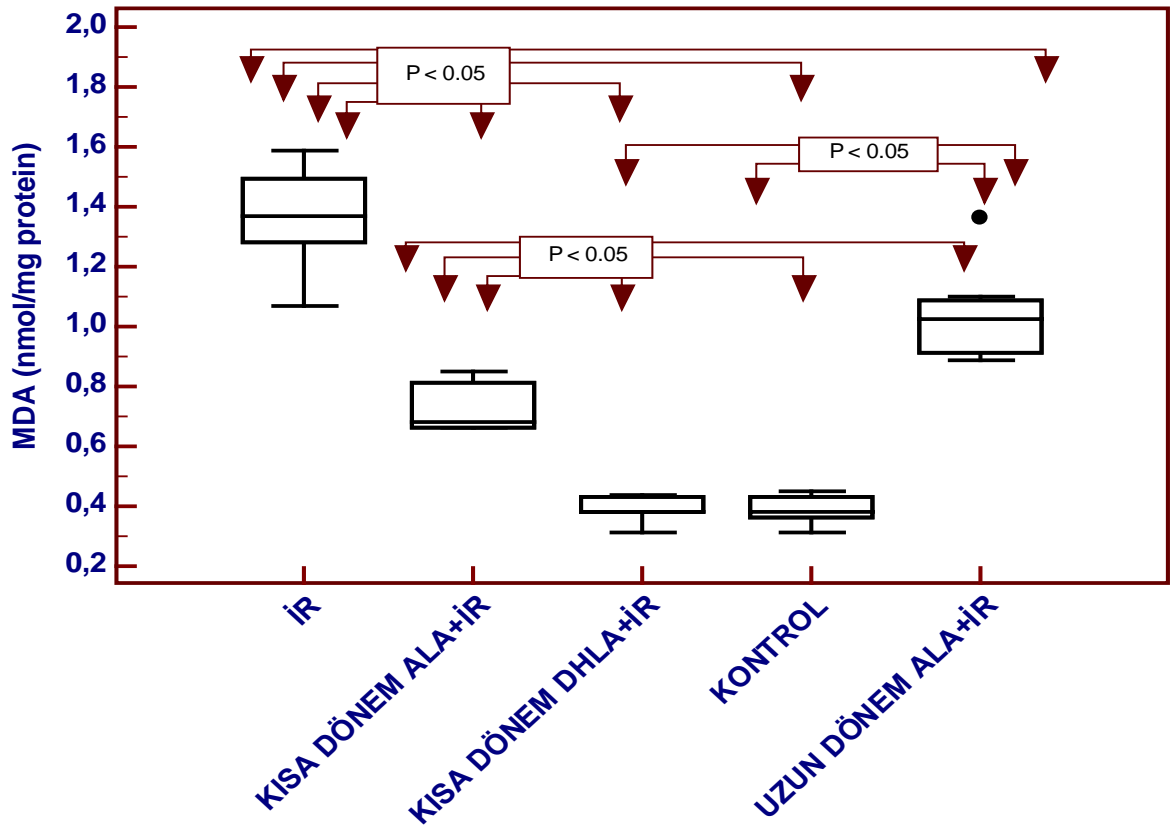
4.2. MDA Standart Grafiği ve Grupların Doku MDA Miktarlarının Karşılaştırılması



Şekil 4.2. MDA Standart Grafiği

Çizelge 4.3. Böbrek doku MDA miktarları

Gruplar	Homojenat MDA Miktarı Ortalama±SD (nmol /mg protein)
Kontrol (K)	0,39±0,049
İskemi/Reperfüzyon (I/R)	1,36±0,172
Uzun Dönem ALA+I/R	1,04±0,152
Kısa Dönem ALA+I/R	0,72±0,089
Kısa Dönem DHLA+I/R	0,39±0,045

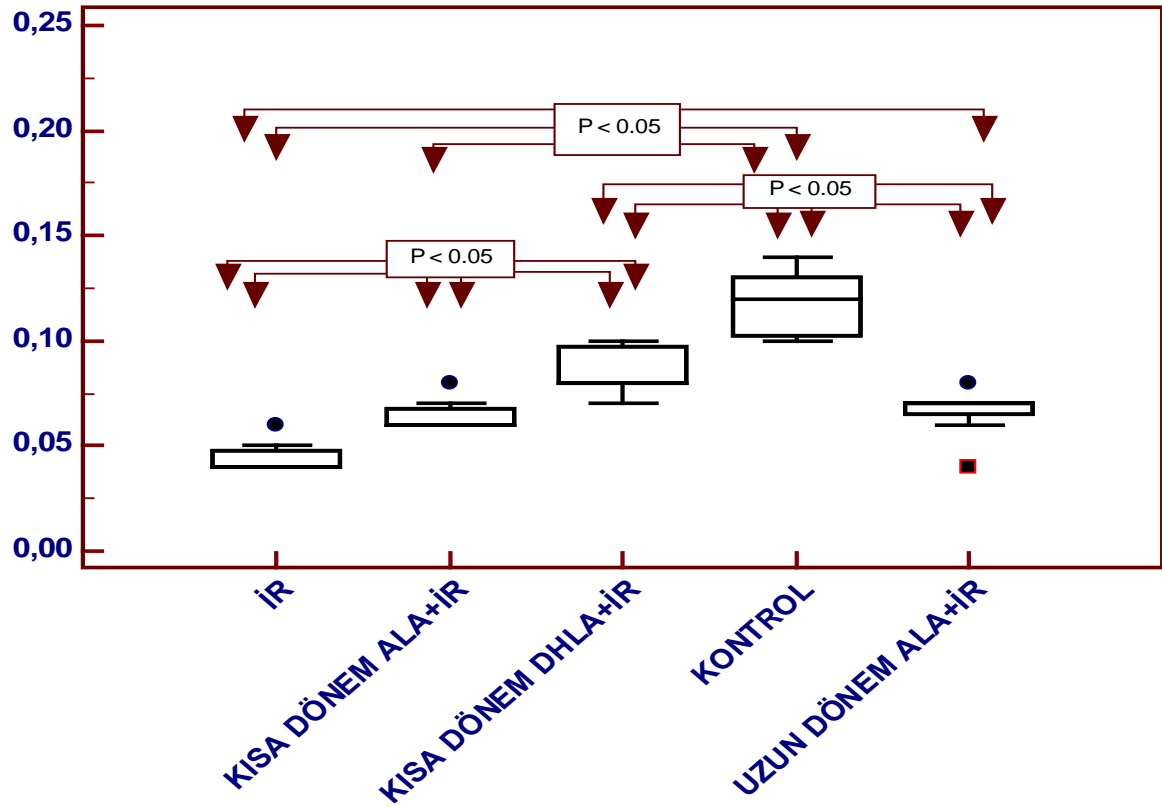


Şekil 4.3. Grupların MDA Miktarlarının karşılaştırılması

4.3. Grupların Doku CAT Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Çizelge 4.4. Böbrek doku CAT aktivitesi

Gruplar	CAT Enzim Aktivitesi Ortalama±SD (k /mg protein)
Kontrol (K)	0,119±0,016
İskemi/Reperfüzyon (I/R)	0,045±0,008
Uzun Dönem ALA+I/R	0,066±0,012
Kısa Dönem ALA+I/R	0,064±0,008
Kısa Dönem DHLA+I/R	0,086±0,011



Şekil 4.4. Grupların CAT aktivitelerinin karşılaştırılması

4.4. Grupların Doku SOD Aktivitelerinin Karşılaştırılması

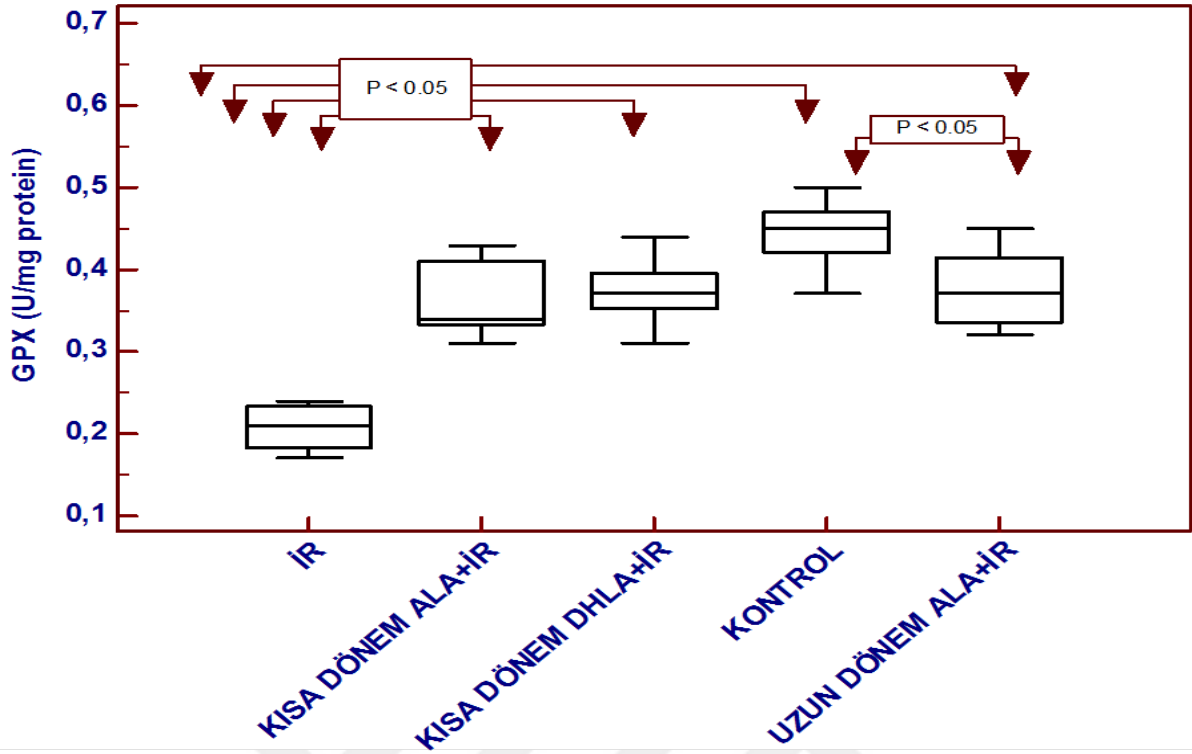
Çizelge 4.5. Grupların doku SOD aktiviteleri ve karşılaştırılması

SOD (U/mg protein)															
GRUPLAR	KONTROL (1)	I/R (2)	UZUN DÖNEM ALA+I/R (3)	KISA DÖNEM ALA+I/R (4)	KISA DÖNEM DHLA+I/R (5)	Grupların Post Hoc İkili Karşılaştırılması (P değeri)									
						1 & 2	1 & 3	1 & 4	1 & 5	2 & 3	2 & 4	2 & 5	3 & 4	3 & 5	4 & 5
ORT.	0,712	0,596	0,603	0,626	0,598	<0.001					N.S.				
SD	0,027	0,065	0,064	0,036	0,07										

4.5. Grupların Doku GSH-Px Miktarları

Çizelge 4.6. Böbrek doku GSH-Px enzim aktivitesi

Gruplar	GSH-Px Enzim Aktivitesi Ortalama±SD (U /mg protein)
Kontrol (K)	0,446±0,043
İskemi/Reperfüzyon (I/R)	0,206±0,028
Uzun Dönem ALA+I/R	0,376±0,047
Kısa Dönem ALA+I/R	0,364±0,047
Kısa Dönem DHLA+I/R	0,373±0,041



Şekil 4.5. Grupların GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması

4.6. Serum TAS-TOS Konsantrasyonları ve OSİ Değerleri

Çizelge 4.7. Serum TAS-TOS-OSİ değerleri

Gruplar	TAS±SD (mmol/l)	TOS ±SD (umol/l)	OSİ ± SD
Kontrol (K)	1,524±0,06655	19,783±2,0919	1,3±0,1533
İskemi/Reperfüzyon(I/R)	1,274± 0,05028	38,139±6,3715	2,993±0,4398
Uzun Dönem ALA+I/R	1,543±0,1356	27,812±3,7115	1,804±0,2076
Kısa Dönem ALA+I/R	1,696±0,08324	31,534±7,1644	1,851±0,3707
Kısa Dönem DHLA+I/R	1,64±0,1514	25,493±3,6354	1,559±0,21

4.7. Serum Üre-Kreatinin Değerleri ile ALT-AST Aktivite Düzeyleri

Çizelge 4.8. Serum Üre-Kreatinin-ALT-AST parametreleri

Gruplar	ÜRE (mg/dL)	KREATİNİN (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
Kontrol (K)	20,693±1,9254	0,5±0,02309	65,157±5,3047	139,857±33,5282
İskemi Reperfüzyon (I/R)	40,129±4,8221	0,716±0,1406	86,429±9,3783	278,571±49,0403
Uzun Dönem ALA+I/R	32,763±3,15	0,606±0,08634	65,375±8,4505	143,125±34,6016
Kısa Dönem ALA+I/R	40,543±3,7354	0,584±0,06554	66±11,3284	149,286±19,0588
Kısa Dönem DHLA+I/R	47,686±5,1402	0,574±0,1113	61,857±12,1988	162,857±31,4665

4.8. Grupların Doku MDA, CAT, GSH-Px Miktarları ve Grupların İkili Karşılaştırılması

Çizelge 4.9. MDA ve Antioksidan enzimlerin miktarı ve gruplar arası karşılaştırma

GRUPLAR (Ortalama±SD)	KONTROL (1)	I/R (2)	UZUN DÖNEM ALA+I/R (3)	KISA DÖNEM ALA+I/R (4)	KISA DÖNEM DHLA+I/R (5)	Grupların Post Hoc İkili Karşılaştırılması (P değeri)							
						2 & 1	2 & 3	2 & 4	2 & 5	3 & 1	5 & 1	3 & 4	4 & 1
MDA (nm/mg protein)	0,391±0,0488	1,363±0,1715	1,039±0,1521	0,721±0,0886	0,391±0,0449	<0.001				NS.		<0.001	
CAT (k/mg protein)	0,119±0,0157	0,0443±0,0080	0,0663±0,0119	0,0643±0,0079	0,0857±0,0113	<0.001				NS.		<0.001	
GSH-Px (U/mg protein)	0,446±0,0431	0,206±0,0276	0,376±0,04749	0,364±0,0465	0,373±0,04071	<0.001				N.S.			

4.9.Histopatolojik İnceleme Bulguları

Histomorfometrik İncelemeler; İntertisiyel tübüler hasar değerlendirmede Goujen ve arkadaşlarının kullandığı morfolojik hususlar incelendi. Histopatolojik değişiklikler aşağıdaki gibi skorlandı;

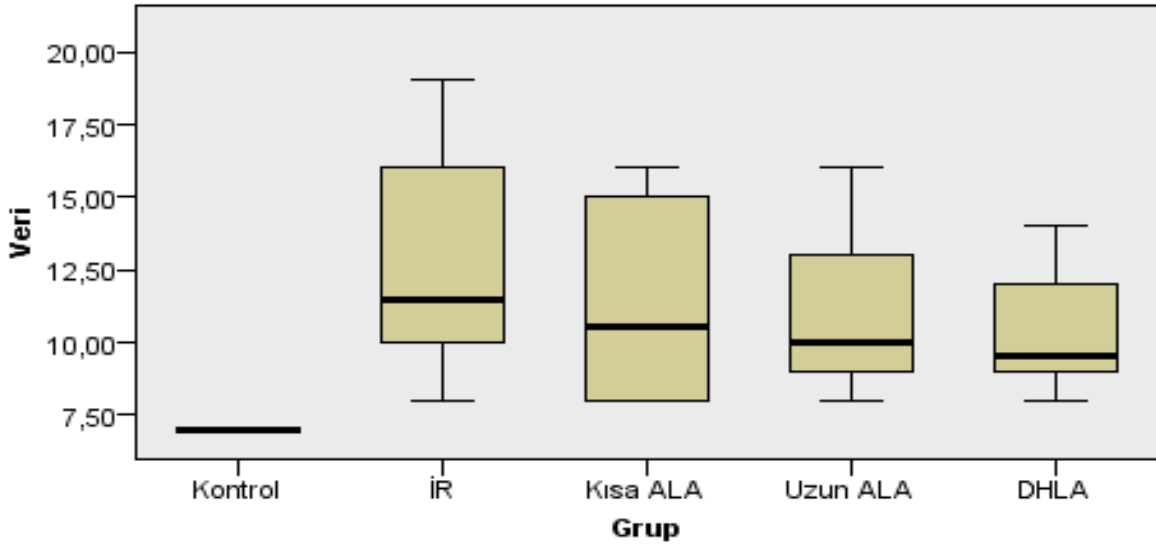
- 1) Hücre apikalinde vokoulizasyon
- 2) Tübüler nekrozis
- 3) Tübüler dilatasyon
- 4) Fırçamsı kenar hasarı
- 5) Hücre ayrılması
- 6) Tübül bazal membran hücresizleşmesi (denudasyonu).

Çizelge 4.10. Histolojik inceleme skorlaması

Grup	N	Mean	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum	P
Kontrol	6	7,00	,000	7,00	7	7	0.005*
I/R	6	12,67	4,179	11,50	8	19	
Kısa ALA	6	11,33	3,445	10,50	8	16	
Uzun ALA	6	11,00	2,966	10,00	8	16	
DHLA	6	10,33	2,251	9,50	8	14	
Total	30	10,47	3,340	10,00	7	19	

N= 1)hücre apikalinde vokoulizasyon 2)tübüler nekrozis 3) tübüler dilatasyon 4) fırçamsı kenar hasarı 5) Hücre ayrılması 6)tübül bazal membran hücresizleşmesi

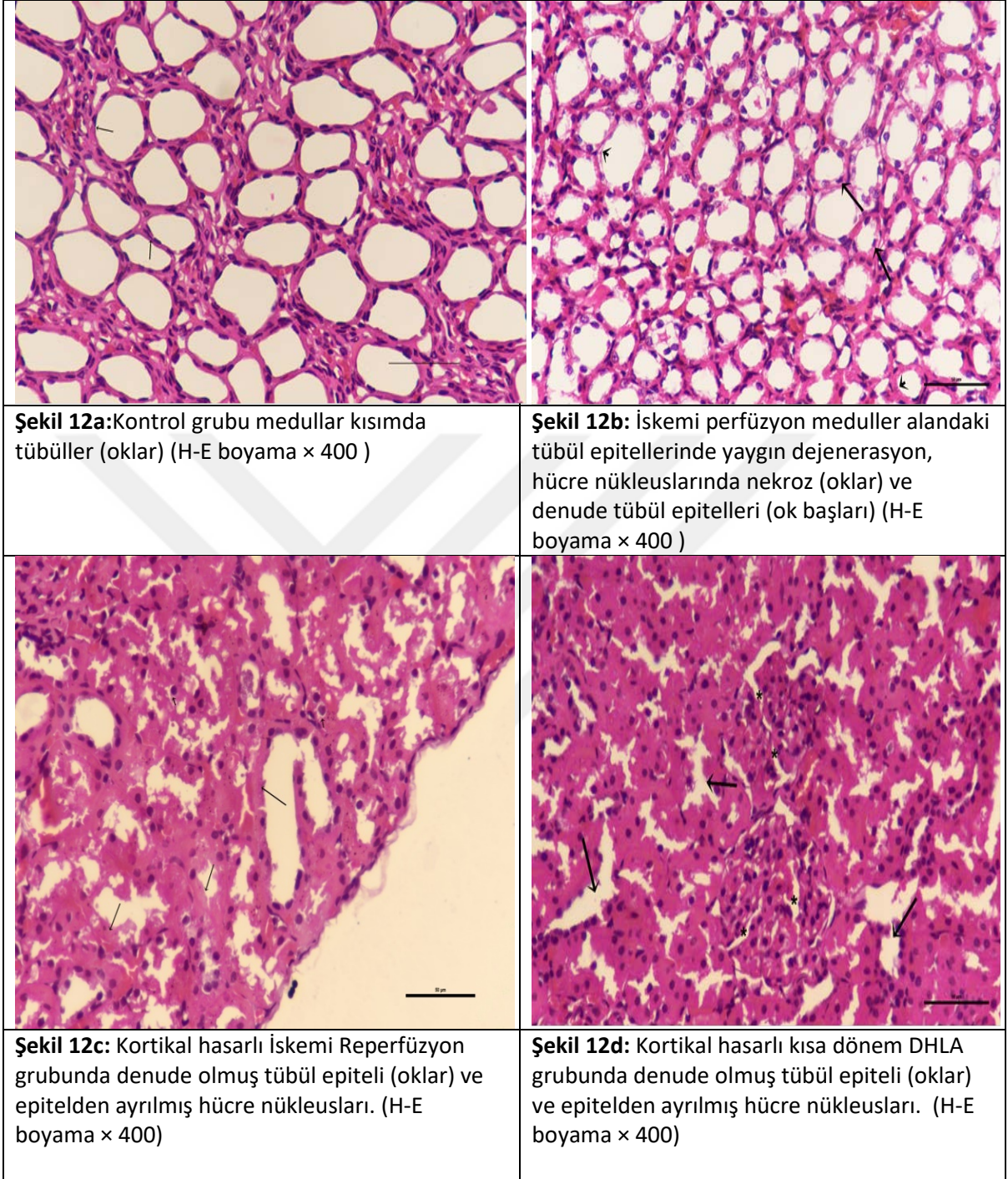
Mean: skorların toplamı



Şekil 4.6. Grupların histoloji verilerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.11. İstatistiksel analiz verilerinin karşılaştırılması

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
Kontrol-DHLA	-13,083	5,026	-2,603	,009	,092
Kontrol-Uzun ALA	-14,583	5,026	-2,901	,004	,037
Kontrol-Kısa ALA	-14,917	5,026	-2,968	,003	,030
Kontrol-İR	-17,417	5,026	-3,465	,001	,005
DHLA-Uzun ALA	1,500	5,026	,298	,765	1,000
DHLA-Kısa ALA	1,833	5,026	,365	,715	1,000
DHLA-İR	4,333	5,026	,862	,389	1,000
Uzun ALA-Kısa ALA	,333	5,026	,066	,947	1,000
Uzun ALA-İR	2,833	5,026	,564	,573	1,000
Kısa ALA-İR	2,500	5,026	,497	,619	1,000



Şekil 4.7. Grupların histolojik kesitlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında deneysel olarak oluşturulmuş renal iskemi reperfüzyon modelinde antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinen lipoik asit (ALA) 'in kısa ve uzun dönem uygulaması ile lipoik asidin redükte şekli dihidrolipoik asit (DHHLA)'in kısa dönem uygulanmasının böbrek dokusundaki lipit peroksidasyonu, antioksidan enzimler ve serumdaki sistemik oksidatif denge üzerine olan etkileri ile böbrek dokusu üzerine histopatolojik etkileri incelenmiştir. Hem ALA'in hem de DHHLA'in dokudaki oksidatif hasarı belirgin derecede azalttığı ve dolaşımda sistemik oksidatif stresi istatistiksel olarak anlamlı derecede düzelttiği gösterilmiştir. Bunun yanında uzun dönem ALA kullanımının oksidatif denge üzerine olan etkisinin ve DHHLA'in kısa dönem uygulamasında doku düzeyindeki histopatolojik etkinliğinin daha belirgin olduğu saptanmıştır. Önceki çalışmalarda hem ALA'in hem de DHHLA'in farklı organ ve dokulardaki iskemi-reperfüzyon üzerine etkileri gösterilmiştir. Ancak literatürde şimdiye kadar böbrek iskemi reperfüzyon hasarı üzerine bu iki bileşimin etkisini aynı çalışmada gösteren bir kaynak mevcut olmadığından çalışmamız bu konuda yapılan ilk çalışmadır.

Böbrek iskemisi, böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ile hidronefroz gibi birçok klinik durumda görülen önemli bir klinik patolojidir. İskeminin neden olduğu hasara ilave olarak organa gelen kan akışının yeniden sağlanması olarak bilinen reperfüzyon da iskeminin neden olduğu hasarın genişlemesine yol açarak lokal ve sistemik etki ile yüksek morbidite ve mortaliteye yol açar (Douzinas ve ark. 2012; Jaeschke 2003). İskemi-reperfüzyonda ortaya çıkan hasardan başlıca reaktif oksijen türleri (ROS) olmak üzere serbest radikal oluşumundaki artış ve/veya antioksidan enzim sistemlerindeki azalma sorumlu tutulmuştur. Reaktif oksijen türleri miktarındaki bu artış sonuçta hücre membranlarında lipit peroksidasyonuna yol açarak lipit peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit (MDA), konjuge dienler, kısa zincirli alkenler ve lipid hidroperoksitleri meydana getirirler (Esterbauer ve ark. 1991; Catalá 2006). Dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak en çok kullanılan parametrelerin başında malondialdehit tayini gelir. Literatürde daha önce yapılan böbrek iskemi reperfüzyon çalışmalarında lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden olan MDA'nın önemli şekilde artış gösterdiği rapor edilmiştir (Ahmadiasl ve ark. 2013; Ahmadiasl ve ark. 2014). Bizim çalışmamızda da lipid peroksidasyonun göstergesi olarak MDA değerleri böbrek dokusunda I/R öncesi ve I/R sonrası ilaç uygulamalarını takiben ölçüldü. İR sonrası dönemde doku MDA düzeylerinin istatistiksel

olarak anlamlı derecede arttığı ve önceki çalışmalarla paralellik gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 21).

ALA ve onun bir ürünü olan DHLA'in oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Birçok çalışmada ALA'nın I/R hasarında oluşan MDA düzeylerini azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Cosar ve ark. (2007), ALA'nın, ovaryum iskemi-reperfüzyonuna olan etkisine baktıkları çalışmada, iskemi gruplarında yüksek olan doku ve plazma MDA düzeyinin, ALA verilmesiyle belirgin olarak düştüğünü. Bir başka çalışmada Manda ve ark. (2007) sıçanlarda karaciğer, böbrek, dalak, testis ve beyin gibi belirli organlarda x ışınlarının yol açtığı oksidatif strese bağlı MDA artışını göstermişlerdir. Aynı çalışmada ALA (200 mg/kg) uygulaması ile MDA seviyesinin önemli oranda azaltılabildiği kanısına ulaşılmıştır. Toklu ve ark.'nın (2009) ALA'nın beyin üzerine koruyucu etkilerini araştırdığı bir başka çalışmada ise travmatik beyin hasarı sonucunda yükselen MDA seviyesinin, (100 mg/kg) ALA uygulanarak azaltılabildiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da ALA'in hem uzun ve kısa dönemde, DHLA'in de kısa dönemde doku MDA düzeyleri üzerine azaltıcı yönde bir etki yaptıkları gözlemlendi. Tüm bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzere çeşitli dokularda oluşan oksidatif stres sonucunda artmış MDA düzeyleri ALA uygulanarak düşürülmektedir. MDA seviyelerinde gözlemlenen azalış ALA'nın antioksidan özelliğe sahip olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Dokularda genellikle serbest radikallerin ve bilinen spesifik serbest radikal grubu olan ROS'un hücrelerde oluşturduğu hasarı engeleyen antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Bu sistemlerin başında antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px enzimleri gelir. Birçok çalışmada çeşitli antioksidan ajanların bu enzim sistemleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Bir çalışmada OH ve ark. (2009) reperfüzyondan önce uygun dozlarda ALA takviyesinin miyokardiyal reperfüzyon hasarından koruyabildiğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada Bae ve ark. (2009) iskemi-reperfüzyona bağlı oluşan renal disfonksiyona karşı ALA etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, iskemiden önce ve hemen sonra verilen ALA'nın, böbrek dokusunu iskemi-reperfüzyona bağlı hasardan koruduğunu (renal hemodinamiklerin, üriner konsantrasyonun, sodyum ekskresyonunun normalleştirilmesi) göstermişlerdir (Bae E. 2008).

Sivaprasad ve ark. (2004), kurşunun fare karaciğerlerinde lipid peroksidasyonu oluşturmasına karşı ALA (25 mg/k-gün, ip)'nin, koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada antioksidan enzimler olan SOD, CAT, GSH-Px enzim aktiviteleri saptanmış ve ALA

uygulaması yapılan grupta enzimlerin her üçünde de anlamlı bir artış tespit etmişlerdir (Sivaprasad R. ve ark. 2004).

Bizim çalışmamızda da ALA ve DHLA'nın antioksidan enzimler olan CAT, GSH-Px ve SOD üzerine etkileri araştırılmış ve doku düzeyinde enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre I/R grubunda CAT, GSH-Px ve SOD seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslandığında kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde azalmış olarak bulunmuştur. Bununla birlikte uzun dönem ve kısa dönem ALA uygulanan grupla DHLA uygulanan grupta CAT ve GSH-Px düzeylerinde I/R gruba göre anlamlı derecede artış gözlenmiş olup SOD düzeylerinde bir değişiklik saptanmamıştır. Bu bulgular literatürdeki benzer çalışmalarla uyumludur. Maritim AC. ve ark. (2003) nın streptozotosin uygulayarak diyabet oluşturulmuş ratlarda ALA'nın antioksidan parametreler üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada SOD enzim aktivitesinin lipoik asit uygulamasından etkilenmediği gözlemlenmiştir. Sadi G. ve ark. (2008) nın yaptığı bir çalışmada ise streptozotosin uygulanmış diyabette gen ekspresyonu üzerine vitamin C ve lipoik asitin etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda lipoik asit uygulamasının protein seviyesini artırmasına rağmen SOD ekspresyonunu etkilemediği gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda ALA ve DHLA uygulanan gruplarda SOD dışındaki antioksidan enzim aktivitesilerinde düzelmeye saptanmıştır. Buna göre hem ALA'nın uzun ve kısa dönem uygulamasının hem de DHLA'nın kısa dönem uygulamasının antioksidan enzimler üzerinde iyileştirici bir etki gösterdiği söylenebilir. Lipoik asit veya redükte form olan dihidrolipoatın, süperoksit, hidroksil, peroksil ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türleriyle reaktif olduğu bilinmektedir (Packer L. ve ark. 1995). ALA'nın aynı zamanda vitamin E ve vitamin C'nin yenilenmesine yol açtığı ve glutatyon ile etkileşime girerek membranları koruduğu da önceki çalışmalarda ileri sürülmüştür. Ayrıca ALA'nın hem redükte hem de okside formlarının dokular üzerinde antioksidan etkilere sahip olduğu ve bunun yanısıra DHLA'nın antioksidan fonksiyonları yerine getirmekte daha etkin olduğu düşünülmektedir (Han D. ve ark. 1997). Benzer şekilde DHLA'nın güçlü bir redüktan olduğu ve böylece okside antioksidanları rejenere edebileceği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise DHLA'nın antioksidan etkinliği direkt ve indirekt olarak askorbat, glutatyon, koenzim Q10 ve vitamin E' yi rejenere ettiği yönünde açıklanmıştır (Aalt ve Guido 2002; Kagan ve ark. 1992). Glutatyon rejenerasyonu üzerine olan etkisi özellikle ayrı bir önem taşır. Çünkü glutatyonun indirgenmiş hali, GSH-Px enzim aktivitesi için özellikle önem taşır ve bu enzimin aktivite gösterebilmesi için sürekli bir indirgenmiş glutatyon kaynağına ihtiyaç olduğu bilinmektedir. DHLA'da gözlenen bu etkiden, glutatyon rejenerasyonuna yaptığı olumlu katkı sorumlu olabilir. Aynı mekanizmanın SOD

için geçerli olmaması, SOD üzerine belirgin etki gözlenmeyişinin bir nedeni olarak ileri sürülebilir.

Antioksidan etki olarak ileri sürülen bir başka mekanizma ise ağır metaller üzerinden olduğu düşünülmektedir. ALA ve DHLA'nın çinko, manganez, kurşun, kobalt, nikel, kadmiyum ve demir iyonları ile kompleks oluşturduğu gösterilmiş ve ALA'nın ağır metallere bağlanması, serbest radikallerin doku hasarı ve enzim inaktivasyonuna yol açmasını önlediği ileri sürülmüştür (Park ve ark. 2005).

Çalışmamızda ilave olarak sistemik oksidatif stresin göstergesi olarak serumda TAS ve TOS ölçümleri yapılmış ve OSİ değerleri hesaplanmıştır. Buna göre I/R grupta OSİ değerleri kontrol gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş olup ($P<0,001$) diğer bulguları destekler niteliktedir (Çizelge 19). Uzun dönem ve kısa dönem lipoik asit kullanılan grupta ve dihidrolipoat kullanılan grupta ise OSİ değerinin kontrole yakın olduğu, anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlemlenmiştir. Yani tedavi gruplarında da I/R olmasına rağmen OSİ değerlerinin kontrol grupla benzer olması lipoik asitin uzun ve kısa dönem kullanımının ve DHLA'nın kısa dönem kullanımının sistemik oksidatif stres üzerine iyileştirici etkisi olduğu söylenebilir. TAS değerleri I/R grubunda kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Tedavi gruplarında ise kontrolden daha yüksek çıkmakla birlikte kontrol ile tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. TOS değerleri ise uzun dönem ALA ve kısa dönem DHLA uygulaması ile belirgin derecede azalmış olup her iki uygulamanın da iyileştirici etkilerinin sistemik dolaşıma da yansıdığı bir göstergesi olduğu söylenebilir. Bunu destekleyen bir diğer bulgu da I/R grubundaki gözlenen AST yüksekliğidir. AST, bir aminotransferaz olup karaciğer hücre harabiyetinin bir göstergesidir. I/R grubundaki AST yüksekliğinin I/R'ye bağlı uzak organ hasarı ile oluştuğu söylenebilir. I/R grubunda gözlenen AST yüksekliği ALA ve DHLA uygulanan gruplarda belirgin düzeyde azalmış ve kontrol gruba yakın seviyelere inmiştir. Sonuç olarak hem ALA hem de DHLA uygulamasının sadece doku düzeyindeki hasarı değil sistemik etki ile uzak organ hasarında da etkin maddeler olduğu söylenebilir. Avcı B. ve ark. (2016) nın yapmış olduğu çalışmada bisfenol-A'nın neden olduğu karaciğer ve overyan doku hasarına tokoferol ve lipoik asitin etkileri araştırılmış, lipoik asit kullanımının Bisfenol-A uygulanmış grupla kıyaslandığında ALT ve AST miktarında azalmaya neden olduğu ve iyileştire etkileri. Lipoik asitin AST ve ALT seviyelerini düşürdüğünü destekleyen bir diğer çalışma ise Dulundu E. ve ark. tarafından yapılmış olan hepatik iskemi reperfüzyon hasarına karşı lipoik asitin koruyucu etkisi isimli çalışmadır; bu çalışmada iskemi

reperfüzyon grubunda ALT ve AST seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunmuş, lipoik asit uygulanan grupta ise önemli ölçüde düştüğü görülmüştür (Dulundu E. ve ark. 2007).

Çalışmamızda ayrıca böbrek dokusundaki oksidatif hasar ve antioksidan savunma mekanizmalarının belirlenmesinin yanı sıra histopatolojik etkiler de değerlendirilmiştir. Böbrek dokusu incelendiğinde özellikle iskemi-reperfüzyona bağlı olarak korteks tübüler yapılarında bozulmalar gözlenmiş (Şekil 12c) ve iskemi-reperfüzyon öncesi DHLA uygulaması ile ortaya çıkan bu patolojik değişimlerin kısmen düzeldiği ve kontrol seviyelerine yaklaştığı gösterilmiştir (Şekil 12d). Takaoka M. ve ark. (2002) nın sıçanlarda alfa-lipoik asidin iskemik akut böbrek yetmezliğine karşı koruyucu etkisini araştırdığı çalışmada akut böbrek yetmezliği olan grupta tübüler nekroz, medüller tıkanıklık gibi bulgulara rastlanmış olup lipoik asit uygulanan tedavi grubunda tübüler nekroz ve medüller tıkanıklığın bastırılmış olduğu gözlemlenmiştir. Williams P. ve ark.(1997) nın yapmış olduğu bir çalışmada iskemi-reperfüzyon böbrek dokusunda tübüler hasara neden olduğu ve iskeminin önemli ölçüde tübül hasarı ile karakterize olduğu ve bunun yanında tübüler dilatasyon, infiltrasyon gibi bulgular da gösterilmiştir. Hussein Abdel-Aziz M. ve ark.'nın çalışmasında ise renal arterden klempin gevşetilmesi ile iskemik tübüler değişiklikler ve proksimal ve distal tübüler reabsorbsiyon kapasitesinin azalmasından dolayı iskemi-reperfüzyonun sodyum atılımının fraksiyonel artışıyla sonuçlandığı gözlemlenmiştir (Hussein Abdel-Aziz M. ve ark. 2012).

Bizim çalışmamızda da yapılan histopatolojik incelemede önceki çalışmalarla uyumlu olarak iskemi reperfüzyon grubunda böbrek medullada iç alanda, kortekste ise dış kortikal alan tübül epitelinde hasar daha fazla mevcuttu. İntraglomerüler ve peritübüler kanlanmada artış mevcuttu. Glomerüler alanlarda ödem de mevcuttu. Hücre apikallerinde vokoulizasyon, tübüler nekrozis, tübüler dilatasyon, fırçamsı kenar hasarı, tübül bazal membran hücresizleşmesi (denudasyonu), ayrıışan hücrelerin yoğun şekilde intratübüler infiltrasyonu mevcuttu. Bu histopatolojik farklılıklar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede saptandı ($P<0,005$)

Tedavi gruplarını kontrol grubuyla istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda DHLA'nın farklı olmadığı diğer iki grupta ise anlamlı fark olduğu görülmektedir. I/R grup ile uzun ve kısa dönem ALA uygulanan gruplar arasında histolojik skorlama açısından istatistiksel fark yoktu. Yani tedavi gruplarında iskemi reperfüzyon gruplarında olduğu gibi intraglomerüler ve peritübüler kanlanmada artış ayrıca glomerüler alanlarda yer yer ödem de mevcuttu. Farklı

olarak gruplarda intratübüler veya bowman aralıklarında eozinofilik infiltrasyon şeklinde yapılar görüldü. Buna göre I/R hasarına bağlı doku düzeyinde gözlenen hasarın ilaç uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı derecede değişmediği söylenebilir. Bir başka deyişle dokudaki antioksidan enzim aktivitelerinde ve serum total oksidatif stres parametrelerinde gözlenen dramatik etkinin doku düzeyinde gözlenmediği söylenebilir. Bunun nedeni olarak tedavi sonrası ilaç etkinliğinin kısa dönemde doku düzeyinde yapılan incelemelerde istatistiksel olarak gözlenebilmesi için ilaç uygulaması sonrasında daha fazla zamana ihtiyaç olabileceği ileri sürülebilir.



6. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada böbrek dokusunda oluşturulan deneysel iskemi reperfüzyon modelinde I/R grubunda gözlenen belirgin oksidatif hasar ve antioksidan enzimlerde gözlenen aktivite kaybı, uzun ve kısa dönem ALA ve kısa dönem DHLA uygulaması ile belirgin ölçüde geri kazanılmıştır. Buna göre I/R hasarının geri döndürülmesinde uzun ve kısa dönem ALA ile DHLA uygulamasının önemli bir potansiyele sahip olduğunu, uzun dönem lipoik asit kullanımının kısa dönem lipoik asit kullanımından daha etkili olduğunu ve buna ilave olarak DHLA uygulamasının ALA uygulamasına göre antioksidan enzimler ve özellikle doku düzeyinde daha etkin olduğunu ve I/R ile ilişkili klinik patolojilerde ALA'ya tercih edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Aalt Bast and Guido RMM Haenen.** The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2002**, 11: 251-258.
2. **Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A.** Combination antioxidant effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci*, **2013**, 16(12):1209-16.
3. **Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A, Baradaran B, Azimian E.** Effect of a combined treatment with erythropoietin and melatonin on renal ischemia reperfusion injury in male rats. *Clin Exp Nephrol*, **2014** Feb.
4. **Akkuş İ.** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, **1995**, 1-60.
5. **Akkuş I, Kalak S, Vural H.** Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*, **1996**, 244:221-7.
6. **Arthur C.** *Guyton Textbook of Medical Physiology*. 10th Ed, W.B. Saunders Company, **2000**.
7. **Avcı B, Bahadır A, Tuncel OK, Bilgici B.** Influence of α -tocopherol and α -lipoic acid on bisphenol- A-induced oxidative damage in liver and ovarian tissue of rats. *Toxicol Ind Health*, **2016** Aug, 32(8):1381-1390. Epub 2014 Dec 29.
8. **Bae EH, Lee KS, Lee J, Ma SK, Kim ve ark.** Effects of alpha lipoic acid on ischemia-reperfusion induced renal dysfunction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2008**, 294:272-280.
9. **Baines CP.** The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, **2009**, 104:181-8.
10. **Balkan S.** Sıçanlarda Benomil Toksisitesine Karşı Kondroitin - 4-Sülfat (C4S) ve α -Lipoik Asidin (LA) Koruyucu Etkileri, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, **2010**.
11. **Balz F.** Ischemia reperfusion injury. *British Journal of Surgery*, **1994**, 81: 637-647.
12. **Barry JM.** Renal transplantation. Campbell's Urology. (Şef Editör:PC Walsh) 8.Basım, Saunders An Imprint of Elsevier Science-Philadelphia, **2002**, s:345
13. **Biewenga GP, Haenen GB, Bast A.** The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol*, **1997**, 29(3):315-31.
14. **Bors W, Saran M, Czapski G.** In Biological and Clinical Aspects of superoxide and Superoxide dismutase. NY. Elsevier/North Holland, **1980**.
15. **Bullock MW, Brockmann JA, Patterson EL, Pierce JV, Macchi ME.** Proposed structures for protogen-A and protogen-B. *J. Am. Chem Soc.*, **1954**, 76:1827-1828.
16. **Cadanas E.** Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, **1989**, 58:79-110.
17. **Cadanas E.** *Handbook of Antioxidants*, Second Edition, Revised and Expanded. New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated, **2001**, 477-478.
18. **Calbreath, DF.** Anatomy and physiology of the kidney. *Clinical Chemistry: A Fundamental Textbook*. Editör: D.F. Calbreath, W.B. Saunders Company, Philadelphia, **1992**, 11:240-248.
19. **Catalá A.** An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol.*, **2006**, 38:1482-95.
20. **Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J.** Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J.*, **2003**, 17:1195-214.
21. **Cosar E, Sahin FK, Köken G, Toy H, Basaralı K, Büyükbas S.** The protective effect of α -lipoic acid in experimental ovarian ischaemia-reperfusion injury. Australian and New Zealand. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **2007**, 47:499-503.
22. **Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.** *Temel patoloji*. Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul: Nobel ve Yüce, **1995**.
23. **Cuzzocrea S, Reiter RJ.** Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, **2011**, 426:1-10.
24. **Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini O, et al.** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, **2003**, 29:23-38.
25. **Delrio D, Stewart AJ, Pellegrini N.** A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **2005**, 15:316-28.

- 26. De Martino GN.** Calcium-dependent proteolytic activity in rat liver: identification of two proteases with different calcium requirements. *Arch Biochem Biophys*, **1981**, 211:253-7.
- 27. Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabó R, Giorgio M.** Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66 (Shc) and monoamine oxidase. *Basic Res Cardiol*, **2009**, 104:131-9.
- 28. Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis MK, Prigouris P, Bakos D. ve ark.** Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: the role of hypoxemic resuscitation. *PLoS ONE*, **2012**, 7:3.
- 29. Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, Sehirli O, Ercan F, Gedik N, Sener G.** Alpha-lipoic acid protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmacology*, **2007**, 79(3):163-70.
- 30. Erden M.** Serbest radikaller. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, **1992**, 12: 201-207.
- 31. Erel O.** A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, **2004**, 37(4): 277-85.
- 32. Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, **2005**, 38(12): 1103-11.
- 33. Ergün O, Ulman C, Kılıçalp AS, Ulman I.** Carnitine as a preventive agent in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *Urol Res.*, **2001** Jun, 29(3):186-9.
- 34. Ersoy E, Baysu N.** Biyokimya. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, **1986**, 454.
- 35. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O.** Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg.*, **2006**, 29:294-8.
- 36. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H.** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.*, **1991**, 11:81-128.
- 37. Fang Y-Z, Yang S, Wu G.** Regulation of physiological systems by nutrients Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **2002** October, 18(10): 872-879.
- 38. Fridovich I.** Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem*, **1997**, 272: 18515-18517.
- 39. Ganong, WF.** Formation and Excretion of Urine. Review of Medical Physiology, Editör: W.F.Ganong, *Lange Medical Publications*, California, **1985**, 8:572-574.
- 40. Garcia FJ, Eleno N.** Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Am J Transplant*, **1998**, 66:982-90.
- 41. Girotti AW.** Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research*, **1998**, 39: 1529-1542.
- 42. Gözükkara EM.** Biyokimya. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları*, Malatya, **1989**, 55,56,705,845-848.
- 43. Granger DN, Rutili G, McCord JM.** Role of superoxide radicals in intestinal ischemia. *Gastroenterology*, **1981**, 81:22-29.
- 44. Gupta RK, Patel AK, Shah N. et al.** Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2014**, 15:4405-4409.
- 45. Gutteridge JM.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, **1995**, 41:1819-28.
- 46. Gülcü Bulmuş F.** Kronik Hiperhomosisteinemi Oluşturulan Ratlarda Alfa-Lipoik Asidin Plazma Ve Çeşitli Dokularda Oksidan Antioksidan Sistem Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, **2006**.
- 47. G. Vandeplassche, C. Hermans, F. Thone, M. Borgers.** Mitochondrial hydrogen peroxide generation by NADH-oxidase activity following regional myocardial ischemia in the dog. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* Volume 21, Issue 4, April **1989**, Pages 383-392.
- 48. Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free Radicals in Biology and Medicine. Second ed, *Clarendon Press, Oxford*, **1989**.
- 49. Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: *Oxford University Press*, **1999**, 246-350.
- 50. Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S ve ark.** Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization. *Biofactors*, **1997**, 6: 321-338.
- 51. Herbert KJ, Hickey MJ, Lepore DA, Knight KR, Morrison WA ve ark.** Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Eur J Pharmacol*, **2001**, 424:59-67.

- 52. Hochs P. And Utley H.** Hydrogen peroxide Detoxication by Glutathione Peroxidase and catalase in rat liver Homogenates. *Mol. Pharmacol.*, **1968**, 4: 574.
- 53. Hu JJ, Dubin N, Kurland O, Ma BL and Roush GC.** The effects of hydrogen peroxide on ONA repair activities. *Mutat Res.* **1995**, 336:193-201.
- 54. Hussein Abdel-Aziz M, Barakat N, Awadalla A, Shokeir AA.** Systemic and renal haemodynamic changes in renal ischemia/reperfusion injury: impact of erythropoietin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **2012**, 90: 1535–1543.
- 55. İslam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA.** Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol.*, **1997** Jun, 79(6):842-7.
- 56. Jaeschke H.** Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2003**, 284:15-26
- 57. James TW.** Pharmacologic approaches to reperfusion injury. *Br J Pharmacol*, **1997**, 9:291–313.
- 58. Jakubowski HD.** Renal transplantation in the rat. Microsurgical models in rats for transplantation research (Editörler: A Thiede, E Deltz, R Engemann ve H Hamelmann) *Springer- Verlag, Berlin*, **1985**, s:47.
- 59. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E.** Dihidrolipoic acid-a universal antioxidant both membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol*, **1992**, 44:1637-1649.
- 60. Kanner J, German JB, Kinsella JE.** Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **1987**, 25:317-364.
- 61. Karaca GE.** Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **2009**, 8(1).
- 62. Kavas GÖ.** Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, **1989**, 9(1):1-8.
- 63. Kehrer JP.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*, **1993**, 23(1):21-48.
- 64. Kılınç K, Kılınç A.** Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **2002**, 33(2):110-8.
- 65. Kılıç K, Topaloğlu S, Abbasoğlu O.** Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Liver Int*, **2003**, 23:300-7.
- 66. Köse K, Dogan P.** Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi*, **1992**, Ek-1: 340-350.
- 67. Lv J, et al.** Protective effect of epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *International Urology and Nephrology* **2015**, 1429-1435.
- 68. Manda K, Ueno M, Moritake T. And Anzai K.** A-Lipoic Acid Attenuates X-irradiation-Induced Oxidative Stress In Mice. *Cell Biol. Toxicol.*, **2007**, 23:129-137.
- 69. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB.** Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.*, **2003** May, 14(5):288-94.
- 70. Mates JM, Sanchez-Jimenez F.** Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Frontiers in Bioscience*, **1999**, 4: 339-345.
- 71. Mene P, Simonson MS, Dunn MJ.** Physiology of the mesangial cell. *Physiol. Rev.*, **1989**, 69: 1347-1424.
- 72. Nouf M, Al-Rasheed Nawal M, Al-Rasheed Hala A, Attia Iman H, Al-Amin M ve ark.** Adverse cardiac responses to alpha-lipoic acid in a rat-diabetic model: possible mechanisms?. *J Physiol Biochem*, **2013**, 69:761–778.
- 73. Oh SK, Yun KH, Yoo NJ, Kim N, Kim M, Park B, Jeong J.** Cardioprotective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Myocardial Reperfusion Injury: Suppression of Reactive Oxygen Species Generation and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Korean Society of Cardiology*, **2009**, 39(9):359-366.
- 74. Oruc O et al.** Sildenafil Attenuates Renal Ischemia Reperfusion Injury by Decreasing Leukocyte Infiltration. *Acta Histochem*, **2009** Mar 25, 112 (4), 337-344.
- 75. Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N and Averbukh E.** Protection of the Transiently Ischemic Cat Retina by Zinc-Desferrioxamine. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, March **1994**, Vol. 35, No. 3.
- 76. Özcan O., Erdal H, Çakırca G, Yönden Z.** Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *JCE/Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **2015**, 6 (3): 331-336.
- 77. Packer L, Witt E, Tritschler HJ.** Lipoic acid as a biological antioxidant. *Science Direct-Free Radical Biology & Medicine*, **1995**, 19(2): 227-250.
- 78. Parks DA, Granger DN.** Xanthine oxidase: biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiol Scand*, **1986**, 548:87–99.

- 79. Park S, Seo S, Choi O, Park C.** Alpha lipoic acid protects against cholecystokinin induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol*, **2005**, 11(31):4883-4885.
- 80. Petrasek PF, Walker PM.** A clinically relevant small-animal model of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Invest Surg*, **1994**, 7:27-38.
- 81. Pfaffly JR.** Lipoic acid: The antioxidant chameleon. **2001**.
- 82. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH.** Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*, **2009**, 22:46-55.
- 83. Preuss HG, Podlasek SJ, Henry JB.** Evaluation of Renal Function and Water, Electrolyte, and Acid-Base Balance. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Editor: J. B. Henry, W.B. Saunders Company, Philadelphia, **1991**, 7:119-139.
- 84. Raij L. ve Keane WF.** Glomerular mesangium: Its function and relationship to angiotensin II. *Am. J. Med*, **1985**, 79 (suppl 36):24-30.
- 85. Raij L.** Nitric oxide and the kidney. *Circulation*, **1993**, 87 (suppl 5): V26-V29.
- 86. Rang HP, Dale MM, Ritter JM.** The kidney. *Pharmacology*. Editör: H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, Churchill Livingstone, **1999**, 20:351-369.
- 87. Rikans LE, Hornbrook KR.** Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica Biophysica Acta*, **1997**, 31:116-27.
- 88. Robinson DC. ve Millares M.** Acute and Chronic Renal Diseases. *Clinical Pharmacy and Therapeutics*, editörler: E.F. Herfindal, D.R. Gourley, L.L.Hart. Williams and Wilkins, Baltimore, **1992**, 5:347-371
- 89. Ryter SW, Tyrrell RM.** Singlet molecular oxygen (1O₂): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med*, **1998**, 24: 1520-1534.
- 90. Sadi G, Yılmaz Ö, Güray T.** Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, February **2008**, Volume 309, Issue 1-2, pp 109-116.
- 91. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M.** Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol* **2011**, 301:1723-41.
- 92. Schaffer SW, Roy RS, and McCord JM.** Possible role for calmodulin in calcium paradox-induced heart failure. *Eur Heart J*, **1983**, 4:81-7.
- 93. Schlondorff D.** The glomerular mesangial cell: An expanding role for specialized preicyte. *FASEB J*, **1987**, 1:272-281.
- 94. Serracino-Inglott F, Habib NA, and Mathie RT.** Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*, **2001**, 181:160-6.
- 95. Seven A, Candan G.** Antioksidant defense systems. *Cerrahpasa J Med.*, **1996**, 27: 41-50.
- 96. Sivaprasad R, Nagaraj P, Varalakshmi P.** Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J. of Nutritional Biochemistry*, **2004**, 15: 18-23.
- 97. Slatter T.** Free radicals and tissue injury: Fact and the fiction. *Br J Cancer*, **1987**, 55:5-10.
- 98. Smith C, Marks Allan D, Lieberman M.** Basic Medical Biochemistry, 2th Edition. Philadelphia, Lippincott Williams &Wilkins, **2005**, 441.
- 99. Solaini G, Harris DA.** Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*, **2005**, 390:377-94.
- 100. Song KH, Lee WJ, Koh JM, Kim HS, Youn JY ve ark.** Alpha lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetesprone obese rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005** Jan, 7;326(1):197202.
- 101. Southorn PA, Powis G.** Free radicals in medicine, I. Chemical nature and biologic reactions, Mayo Clinic Proceedings, **1988**, 63:381-9.
- 102. Szocs K.** Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys*, **2004**, 23:265-95.
- 103. Takaoka M, Ohkita M, Kobayash Y, Yuba M, Matsumura Y.** Protective effect of alpha- lipoic acid against ischaemic acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. **2002** Mar, 29(3):189-94.
- 104. Toklu HZ., Hakan T, Biber N, Solakgölu S, Ögünç A ve ark.** The Protective Effect of Alpha Lipoic Acid Against Traumatic Brain Injury In Rats. *Free Radical Research*, **2009**, 43(7): 658-667.
- 105. Uysal M.** Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, **1998**, 11:336-341.

- 106. Valko M, Morris H, Cronin MT.** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, **2005**, 12:1161-208.
- 107. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, ve ark.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **2007**, 39:44- 84.
- 108. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, ve ark.** Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.*, **1991**, 78:651-5.
- 109. Williams P, Lopez H, Britt D, Chan C, Ezrin A, ve ark.** Characterization of Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **1997**, 37, 1-7.
- 110. Young IS, Woodside JV.** Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.*, **2001** Mar, 54(3):176-86.
- 111. Yu BP.** Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties, Mechanism of Ageing and Development, **1999**, 111:73-87.
- 112. <http://www.anatomi.gen.tr/bobrek-anatomisi.html>**



ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Hatay’da doğdu. 2010 yılında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı ve 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.







