

Sıçanlarda Kısa Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniolün Koruyucu Etkisi

Seren Danış

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2015

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

Seren Daniş

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Biology

July 2015

Sıçanlarda Kısa Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniolün Koruyucu  
Etkisi

Seren Danış

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

Danışman: Doç. Dr. Mediha Canbek

Temmuz 2015

## ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Seren Danış'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Sıçanlarda Kısa Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniolün Koruyucu Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Mediha Canbek

**İkinci Danışman** : -

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye** : Doç. Dr. Mediha CANBEK

**Üye** : Doç. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ

**Üye** : Doç. Dr. Hakan ŞENTÜRK

**Üye** : Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

**Üye** : Doç. Dr. Pınar Öztopçu VATAN

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN  
Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Mediha CANBEK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Sıçanlarda Kısa Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniolün Koruyucu Etkisi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 23/07/2015

Seren DANIŞ

İmza

## ÖZET

Tez çalışmasında sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan böbrek iskemisi reperfüzyon hasarına karşı, antioksidan özelliğe sahip geraniolün koruyucu etkileri araştırıldı.

Deneysel çalışmada; herbirinde n=7 olmak üzere 28 adet *Wistar albino* cinsi erkek sıçanlar rastgele seçilerek 4 grup oluşturuldu. Grup I (Sham), Grup II (İ/R + Serum Fizyolojik), Grup III (50 mg/kg Geraniol + İ/R), Grup IV (100mg/kg Geraniol + İ/R) olarak belirlendi. Tüm gruplara ksilazin (10mg/kg) ve ketamin (70mg/kg) anestezisi altında sağ böbrek nefrektomisi yapıldı, 15 gün iyileşmeleri beklendi. Grup I ve II' ye 2 ml SF, Grup III ve IV' e sırasıyla 50 mg/kg ve 100 mg/kg geraniol tek doz halinde iskemiden bir saat önce intraperitoneal olarak verildi. Grup I haricindeki gruplara 45 dakika iskemisi ve 4 saat reperfüzyon uygulandı. Deney sonunda tüm sıçanlardan kan örnekleri ve böbrek dokuları alındı. Serum örneklerinde kanda üre nitrojen testi (BUN) ve kreatinin (CRE) değerlerine bakılırken, doku örneklerinde katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri ölçüldü. Doku kesitleri H&E ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Çalışma sonuçlarına göre; Grup I ve Grup II' nin serumda BUN ve CRE, doku örneklerinde CAT ve SOD değerleri karşılaştırıldığında Grup II' de yükseldiği ve bunun sonucunda İ/R hasarının olduğu gözlemlendi. Geraniol uygulanan Grup III ve Grup IV' ün değerlerinin Grup I' e yaklaştığı gözlemlendi. Birbirine paralellik gösteren bu sonuçlar; 50 mg/kg' lik geraniolün, 100 mg/kg' lik geraniole göre daha etkili olduğunu destekler nitelikteydi.

Deney sonuçlarına göre; intraperitoneal olarak uygulanan geraniolün böbrek iskemisi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Serbest Radikal, Antioksidan, Geraniol, İskemisi Reperfüzyon, Böbrek.

## SUMMARY

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

In this empirical study, 28 Wistar-albino type 28 male rats (n=7) were prepared. They were randomly separated into 4 groups. The groups were determined as follows: Group I (Sham), Group II (IR), Group III (50 mg/kg Geraniol + IR), Group IV (100 mg/kg Geraniol + IR). Under anesthesia, the right kidney nephrectomy was performed in all groups by using ksilazin (10mg/kg) and ketamin (70mg/kg). The rats were allowed to recover for 15 days before they were subjected to IR injury. Then, 2 ml SF was injected to Group I and Group II; 50 mg/kg geraniol was injected to Group III and 100 mg/kg geraniol was injected to Group IV intraperitoneally one hour before ischemia. 45 minutes ischemia and 4 hours reperfusion were applied to all groups except Group I. The dissection was performed in the Group I (without ischemia) after reperfusion. At the end of the experiment, Blood Urea Nitrogen (BUN), Creatinine (CRE) activities in the blood serum and the Catalase (CAT) and Superoxide dismutases (SOD) Hematoxylien & Eosine and investigated by light microscope.

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

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

**Keywords:** Kidney, Ischemia/Reperfusion, Geraniol, Free Radical, Antioxidant.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarında, bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım Sayın Doç Dr. Mediha CANBEK' e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bilgilerini, tecrübelerini benden esirgemeyen Doç. Dr. Hakan ŞENTÜRK ve Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU hocalarım başta olmak üzere Moleküler Biyoloji bölümündeki hocalarıma ve öğrencilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteği bana gösteren, çalışmalarımı kendi çalışmaları gibi görerek benimle birlikte sıkıntılara çözüm bulan arkadaşlarım Senanur CAN, Işıltan YILMAZ, Fatma YILDIZ ve Handan ÇİFÇİ' ye çok teşekkür ederim. Özlem ÖZKAN' a yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim. Her daim yanımda olan, bana en büyük desteği veren Yeşim GÜN ve Rıfat ÇİNPOLAT' a sabırlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Beni bugünlere getiren, her daim yanımda ve destek olan, her sıkıntıda beni kucaklayan, bana her zaman her konuda güvenen, emeklerinin karşılığını ödeyemeyeceğim başta annem Emine DANIŞ, babam Orhan DANIŞ ve ablam ve eniştem Açelya - Rıdvan TEZCAN olmak üzere CANIM AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET .....</b>	<b>vi</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>vii</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>xi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>	<b>xiii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>3</b>
2.1. Serbest Radikaller.....	3
2.2. Antioksidanlar.....	7
2.2.1. Antioksidan etki tipleri .....	8
2.2.2. Endojen kaynaklı antioksidanlar .....	9
2.2.3. Eksojen kaynaklı antioksidanlar .....	11
2.3. Terpenler ve Geraniol.....	13
2.3.1. Monoterpenler .....	14
2.3.2. Geraniol .....	14
2.4. İskemi Reperfüzyon.....	16
2.4.1. Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz iskemik hasar .....	18
2.5. Boşaltım Sistemi ve Böbrekler.....	20
2.5.1. Boşaltım Sistemi Fizyolojisi.....	20
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>26</b>
3.1. Deney Hayvanları.....	26

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2. Deney Grupları.....	26
3.3. Geraniol Uygulaması.....	27
3.4. Cerrahi İşlemler.....	27
3.4.1. Anestezi.....	27
3.4.2. Nefrektomi işlemi.....	28
3.4.3. İskemi reperfüzyon işlemi.....	29
3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi.....	29
3.5.1. Serum örnekleri.....	30
3.5.2. Böbrek doku örnekleri.....	30
3.5.3. İstatistiksel değerlendirmeler.....	34
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>36</b>
4.1. Bulgular.....	36
4.1.1. Biyokimyasal analizler .....	36
4.1.2. Böbrek doku örneklerinin histolojik analizleri.....	41
4.2. Tartışma.....	46
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>52</b>
<b>EK AÇIKLAMA: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı.....</b>	<b>65</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Trifenilmetil radikalının 10 izoformundan 3 tanesi .....	4
2.2 İzopren.....	13
2.3 Geraniol ve Nerol' ün kimyasal yapısı.....	15
2.4 Boşaltım sisteminin yapısı .....	21
2.5 Böbreğin iç yapısı .....	23
2.6 Nefron yapısı.....	24
3.1 Nefroktomi işlemi a) Diseksiyon, b) Kesili alanın bağ dokudan temizlenmesi, c) Sağ böbreğin çıkartılması, d) Sağ böbreğin klemp ile tutulup, sütür ile boğumlanarak vucüttan ayrılması ..	28
3.2 İskemi/Reperfüzyon İşlemi a-b) Sol renal arterin izolasyonu, c) Sol renal artere klemp takılması, d) Cerrahi bölgenin kapatılması, e) Reperfüzyon sonunda kalpten kan alınması, f) Vücuttan sol renalin alınarak, doku örneğini alınması .....	29
4.1 Grup I, II, III ve IV' e ait serum BUN değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	37
4.2 Grup I, II, III ve IV' e ait serum CRE değerlerinin ortalama ve standart hata grafiği .....	38
4.3 Grup I, II, III ve IV' e ait CAT izoenziminin elektroforetik bantları .....	39
4.4 Grup I, II, III ve IV' e ait böbrek doku örneklerinde belirlenen CAT enzim aktivitesi sonucu oluşan bantların ortalama değerleri (mm <sup>2</sup> ) .....	39
4.5 Grup I, II, III ve IV' e ait SOD izoenziminin elektroforetik bantları .....	40
4.6 Grup I, II, III ve IV' e ait böbrek doku örneklerinde belirlenen SOD enzim aktivitesi sonucu oluşan bantların ortalama değerleri (mm <sup>2</sup> ) .....	40
4.7 Grup I' e ait böbrek doku kesitlerinde normal görünümlü glomerul yapıları, bowman kapsülü ve aralığı (↗) (H&E).....	42
4.8 Grup I' e ait böbrek doku kesitlerinde normal görünümlü tübüller (↗) (H&E).....	42
4.9 Grup II' e ait yaygın kanama alanları (↗) (H&E).....	43
4.10 Grup II' ye ait böbrek doku kesitlerinde tübüller içerisinde sıvı birikimi ve hücre döküntüleri (↗) (H&E). .....	43
4.11 Grup II' e ait bozulmuş glomerüler yapı (↗) (H&E) .....	44
4.12 Grup III' e ait korunmuş glomerüler yapı (↗) (H&E).....	44

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)****Sekil****Sayfa**

- 4.13 Grup III' e ait büyük ölçüde korunmuş tübüller (↗ ) ve glomerüler yapı (H&E)..... 45
- 4.14 Grup IV' e ait kısmen korunmuş tübüller yapı(↘), glomerüler yapı ve kanama (↗ ) (H&E)45

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b><u>Cizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Önemli bazı reaktif türler ile ilgili detaylar.....	5
2.2 Antioksidan çeşitleri ve etki etme şekilleri .....	8
2.3. Terpenlerin sınıflandırılması.....	13
4.1 Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen BUN ve CRE miktarlarının Ortalama değerleri ± Standart hata değerleri.....	36
4.2 Deney gruplarına ait hayvanların böbrek doku örneklerinde belirlenen CAT ve SOD aktivitelerinin bant alanları.....	38

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
°C	Celsius degree (santigrat derece)
n	Denek sayısı (Adet)
rpm	Devir/dakika
dk	Dakika
sn	Saniye
mL	Mililitre ( $10^{-3}$ litre)
$\mu$ L	Mikrolitre ( $10^{-6}$ litre)
gr	Gram
$\mu$ g	Mikrogram ( $10^{-6}$ gram)
mg	Miligram ( $10^{-3}$ gram)
1/kg	1/kilogram
g/mol	Molekül ağırlığı
$g/cm^3$	Yoğunluk
mA	Miliamper
V	Volt
cm	Santimetre

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
SOR	Serbest oksijen Radikalleri
İİR	İskemi/Reperfüzyon
Bkz	Bakınız
CAT	Katalaz
SOD	Süper Oksit Dismutaz
Gpx	Glutasyon peroksidaz
KO	Ksantin oksidaz
KDH	Ksantin dehidrogenaz
H&E	Hematoksilin ve Eosin
NAPDH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
AP	Amonyum persülfat
NBT	Nitroblue tetrazolium
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
PMS	Phenazine methosulphate
HCl	Hidroklorik asit
TEMED	Tetrametil etilen diamin
DNA	Deoksiribonükleikasit
ATP	Adenozintrifosfat
PMNL	Polimorf Nükleer Lökosit
NOS (RNS)	Reaktif nitrojen türleri
BUN	Kan Üre Nitrojen Testi (Blood Urea Nitrogen)
CRE	Kreatinin
SF	Serum Fizyolojik

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bilimsel/biyomedikal literatürde, “serbest radikal” terimi geniş bir alanda kullanılır. Serbest radikal oluşumuna sebep olan hal; “uyarılmış durum” un veya serbest radikal reaksiyonlarıyla reaktif türlerin meydana gelmesidir (Devasagayam, vd., 2004). Serbest radikallerin oldukça kararsız elektronları olduğu için hücre içerisindeki diğer moleküllerle etkileşerek daha kararlı duruma geçmek isterler. Bunu da; bir molekülden bir hidrojen atomu ( $H^+$ ) çalarak, başka bir moleküle bağlanarak ya da başka serbest radikallerle çeşitli şekillerde etkileşime girerek gerçekleştirirler (Kopani, vd., 2006). Radikaller; lipit, protein ve nükleik asitler gibi önemli hücresel bileşenlere zarar verebilir (Sies, 1997; Kopani, vd., 2006). Bu hasarlar, antioksidan sistem ve antioksidan enzimler tarafından bertaraf edilmektedir (Yokuş ve Çakır, 2002).

Antioksidanlar, serbest radikalleri veya serbest radikallerin eylemlerini nötralize eden maddelerdir (Sies, 1997). Diyet antioksidan savunma sisteminin üretimi açısından önemli bir rol oynamaktadır. E ve C vitamini,  $\beta$  – karoten, flavanoidler dâhil diğer antioksidan bitkisel fenoller ve esansiyel mineraller gibi temel besin maddelerini içeren besinlerin alınması antioksidan enzimlerinin oluşmasına yardımcı olmaktadır (Willcox, vd., 2004).

Terpenler, doğada yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Genellikle bitkilerde bulunurlar ve küçük moleküllü olanları bitkilerin yaprakları, çiçekleri ve meyve kabuklarının seçkin kokularını oluşturmaktadırlar (Zimmerman, vd., 1978). Geraniol, bilinen en eski organik bileşiklerden biridir. Terpenlerde ve çeşitli bitkilerde bulunmaktadır (Miyazawa, vd., 1998; Hamiza, vd., 2013). Geraniol (2,6 – dimetiltrans – 2,6 – oktadien – 8 – ol ya da 3,7 – dimetilokta – trans – 2,6 – dien – 1 – ol) kapalı formülü  $C_{10}H_{18}O$  olan asiklik monoteren bir alkoldür. Geraniol (trans) ve nerol (cis) olmak üzere iki adet izomeri bulunmaktadır (Chen ve Viljoen, 2010; Madankumar, vd., 2013). Geraniolün yapılan araştırmalar sonucu radikallere karşı belirgin bir süpürücü etki gösterdiği görülmektedir (Choi, vd., 2000).



Atar ve toplardamarlarda kan akışının azalması ile bağlı olduğu organın veya dokunun beslenememesinden dolayı, organ ya da dokunun oksijenden yoksun kalmasına “iskemi” denilmektedir. Bu durum hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne neden olmaktadır. İskemik dokunun hücre rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için kan akımının tekrar başlaması gerekmektedir. Tekrar kan akımının başlamasına “reperfüzyon” denilmektedir (Zimmerman ve Granger, 1992; Birincioğlu, 2012).

Reperfüzyon hasarında en hassas olan hücrel yapılar; zar lipitleri, proteinler ve nükleik, deoksiribonükleik asit molekülleridir (Wilhelm, 1989). İskeminin devamlı olması halinde, dokularda meydana gelen bozuklukların geri dönüşümü olmaz, eğer kan akımı tekrar sağlanırsa hasar geri dönüşümlü olmaktadır (Gelman, 1995; Mauney, vd., 1995; Tetik ve Gürbüz, 2000).

Vücudun iç dengesine katılan en önemli organ sistemlerinden birini boşaltım sistemi oluşturmaktadır. Vücut sıvılarının hacim ve içeriğinin, kan basıncının, pH' nın, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi, hücrelerde metabolizma sonucu oluşan ve kana verilen artık ürünlerden kanın temizlenmesi boşaltım sistemi fonksiyonları arasında sayılmaktadır (Bullock J, 2001).

İskemi reperfüzyon olayından en fazla etkilenen organ böbreklerdir. Tıbbın gelişmesine rağmen giderek artan akut böbrek yetmezliğinin aydınlatılması ve tedavisi için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Abel, vd., 1971; Molitoris, 1999).

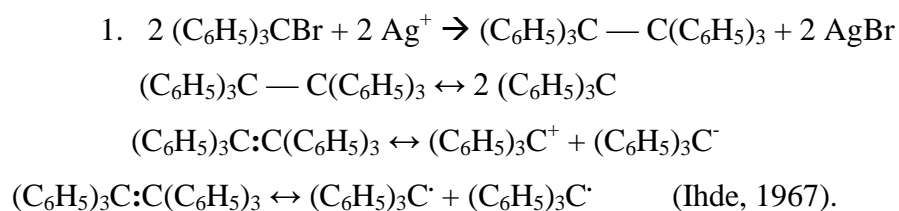
Bu çalışmada; renal iskemi/reperfüzyon sırasında oluşan oksidatif stres hasarına karşı antioksidan özelliğe sahip geraniolün biyokimyasal, histopatolojik ve doğal jel elektroforez yöntemleriyle koruyucu etkisi araştırılmıştır.

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

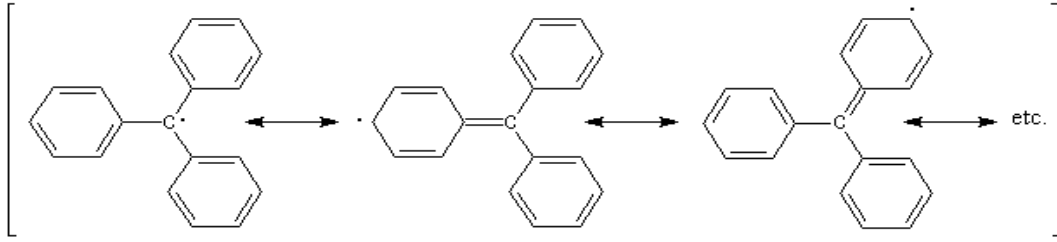
### 2.1. Serbest Radikaller

Lavoisier' a göre mineral maddelerin büyük çoğunluğu oksijenin temel rol oynadığı oksijenli bileşiklerdir. Bu bileşikler oksitlenen metaller olan bazlar, oksitlenen ametaller olan asitler ve her ikisinin reaksiyonu sonucu oluşan tuzlardır. Lavoisier asit ve baz oksidasyonu sonucu ortaya çıkan temel ürünü “radikal” olarak tanımlamıştır (Gomberg, 1928). Lavoisier' in bu tanımından sonra Berzelius, Dumas, Liebig ve Bunsen, Kolbe Frankland ve diğerleri tarafından geliştirilen “radikal” kavramı, geçirdiği tüm kimyasal transformasyonlara rağmen bozulmadan kalan en az bir adet değişmez atom grubu bulunduran organik moleküller olarak tanımlanır (Gomberg, 1924). Başka bir tanımla; atom veya bileşiklerin yapısında eşleşmemiş elektron bulunması ile o atom ve bileşikleri “serbest radikal” olarak tanımlar (Staroverov ve Davidson, 2000).

Gomberg, heksafeniletan sentezi sırasında renksiz trifenilmetil halojenlerinin tesadüf sonucu gümüş ile tepkimeye girdiğini ve sarı renkli trifenilmetil radikali oluştuğunu gözlemlemiştir. Bu oluşan radikalın ayrıca; hem çözültü formunda hem de kristal formunda oldukça dayanıklı olduğunu belirlemiştir (Gomberg, 1900; 1914).



Genellikle radikallerin birçoğu dayanıksız formda olmasına rağmen, Gomberg' in (1914) keşfettiği trifenilmetil radikalının dayanıklı olması radikal haldeki karbon atomuna bağlı üç benzen halkasının yapıları nedeniyle bağlandıkları radikal haldeki karbon atomuna 120° lik bağlarla bağlanmaları olarak açıklanmıştır (Şekil 2.1). Gomberg' in bu radikali keşfetmesiyle, serbest radikallerin araştırılmasına başlanmıştır (Ihde, 1967; Tidwell, 1978).



Şekil 2.1 Trifenilmetil radikalinin 10 izoformundan 3 tanesi (Ihde, 1967)

II. Dünya Savaşı'nda (1939 – 1945) atılan iki atom bombasının (6 Ağustos 1945 Hiroşima ve 9 Ağustos 1945 Nagasaki) tüm nüfus için kitlesel ölümlere ve hayatta kalanların ömürlerinin kısalmasına neden olmuştur. Bu olay doğrudan serbest radikal biyokimyasının gelişimine yol açmıştır (Devasagayam, vd., 2004).

20 yıl önce yapılan gözlemler serbest oksijen radikalinin (SOR) hücrel fonksiyonu düzenleme de rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Son yıllarda bu, SOR' un ( $O_2^{\cdot -}$  ve  $H_2O_2$  gibi) ikinci haberci olarak hareket edebileceğini belirgin hale getirmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar, dış kaynaklı  $H_2O_2$ ' nin insüline benzer büyüme faktörü etkisini taklit ettiği saptanmıştır. Redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin keşfi ve enzimatik olarak üretilen bir serbest radikal nitrik oksit, vasodilasyon ve çözünür guanilat siklaz aktivasyonu yoluyla nörotransmisyonunda fizyolojik bir rol oynadığını ayrıca SOR ve reaktif nitrojen türevleri (RNS) sinyal yollarının modüle edilmesi için ikinci haberci olarak davranması, bu kavramı desteklemektedir. Bu redoks sinyalizasyon alanında bilgi eksikliğinin giderilmesini sağlamakla birlikte, çeşitli sistemlerde veri birikimi ile sinyal yollarını ve SOR/RNS' den etkilenen özel hedefleri net bir şekilde ortaya çıkarmaktadır (Devasagayam, vd., 2004).

Bir biyokimyasal süreçte, ara ürün olarak oluşan serbest radikaller kısa ömürlü ve hücrenin daha fazla veya daha az kalıcı bileşenlerin katkısının yetersiz olduğu düşünüldüğü için canlılar üzerindeki etkisi gösterilememiştir. Bu eksiklik elektron spin rezosans tekniklerinin (ESR) gelişmesiyle giderilmiştir (Commoner, vd., 1954; Kopani, vd., 2006).

Bilimsel/biyomedikal literatürde, “serbest radikal” terimi geniş bir alanda kullanılır. Serbest radikal oluşumuna sebep olan “uyarılmış durum” daki veya serbest radikal reaksiyonlarıyla meydana gelen reaktif türleri kapsamaktadır. Genel olarak, serbest radikallerin yarılanma ömrü mili, mikro veya nano saniye kadar kısadır (Çizelge 2.1). Serbest radikaller yaşlanmanın yanında birçok hastalığın da nedeni olsa da, hem SOR hem de reaktif nitrojen türleri (NOS) normal sağlıklı dokularda hemostazı sürdürmek ve sinyal molekülleri hücresele düzeyde düzenlemede de önemli bir rol oynamak için üretilirler (Devasagayam, vd., 2004).

Çizelge 2.1. Önemli bazı reaktif türler ile ilgili detaylar (Devasagayam, vd., 2004)

Reaktif Türleri	Sembol	Yarılanma Süresi (sn)	Reaktivitesi
<b>Reaktif Oksijen Türleri</b>			
Süperoksit	$O_2^-$	$10^{-6}$ sn	Kardiyavasküler sistem ve diğerlerinde, mitokondri de üretilir
Hidroksil radikali	$\cdot OH$	$10^{-9}$ sn	Demir yüklenmesi ve bu koşullar sırasında oluşan çok yüksek reaktif
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	stable	Vücudumuzda çok sayıda reaksiyon ve ürünleri sonucunda oluşan $\cdot OH$ gibi güçlü radikal
Peroksit radikali	$ROO\cdot$	sn	Oksidatif hasar sırasında lipid, protein, DNA ve şekerden meydana gelen reaktif
Organik hidrojen peroksit	$ROOH$	stable	Geçici metal iyonlarıyla reaktif türler vermek üzere reaksiyona girer
Singlet oksijen	$^1O_2$	$10^{-6}$ sn	Işığa duyarlı ve kimyasal reaksiyonlar sırasında oluşan son derece reaktif oksijen radikali
Ozon	$O_3$	sn	Günümüzde atmosferik bir kirletici olarak çeşitli moleküllerle reaksiyona girebilir. $^1O_2$ ’ den elde edilir.
<b>Reaktif Nitrojen Türleri</b>			
Nitrik oksit	$NO\cdot$	sn	Nörotransmitter ve kan basıncı düzenleyici, patolojik durumları sırasında güçlü oksidanlar verir
Peroksinitrit	$ONOO^-$	$10^{-3}$ sn	Son derece reaktiftir ve nitrik oksit ve süperoksiti oluşturur
Peroksi nitroz asit	$ONOOH$	Oldukça stable	Peroksinitritin protonlanmış şekli
Azot dioksit	$NO_2$	sn	Atmosfer kirliliği sırasında oluşur

Hücreler ihtiyaçlarına göre süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrik oksit ( $NO\cdot$ ) üretirler. Bu nedenle, serbest radikallerin önemli ve faydalı rolleri vardır. Bunlar;

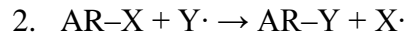
- Oksidatif fosforilasyon da ADP’ den ATP üretimi,

- Sitokrom P450 (enzim oksitleyici) tarafından ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu,
- Yaşlanmış veya hasarlı hücrelerin apoptozu,
- Makrofajlar ve sitotoksik lenfositler tarafından mikro organizmalar ve kanser hücrelerinin öldürülmesi,
- Oksijenazların prostaglandin ve lökotrienlerin üretimi için birçok düzenleyici işlevleri vardır (Harman, 1955).

Serbest radikallerin oldukça kararsız elektronları olduğu için hücre içerisindeki diğer moleküllerle etkileşerek daha kararlı duruma geçmek isterler. Bunu da; bir molekülden bir hidrojen atomu ( $H^+$ ) çalarak, başka bir moleküle bağlanarak ya da başka serbest radikallerle çeşitli şekillerde etkileşime girerek gerçekleştirirler (Kopani, vd., 2006).

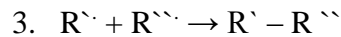
- Radikal – Molekül Etkileşimi:

Doymamış sistemlere eklenir. Genel reaksiyon; bir radikal ile aromatik substitüentin yer değiştirmesine dayanır.



- Radikal – Radikal Etkileşimi:

Dimerleşme ile ya da radikal bağlamayla gerçekleşir. Lokalize radikallerin (metil, fenil radikalleri) dimerleşmesi kolayca gerçekleşir. Delokalize radikallerin dimerleşmesi sadece çözelti içinde gerçekleşir.



Eğer;  $\text{R}' = \text{R}''$  ise reaksiyon dimerleşme reaksiyonu,  $\text{R}' \neq \text{R}''$  ise reaksiyon bağlama ya da birleşim reaksiyonudur (Aruoma, 1998).

Serbest radikallerin vücutta aşırı miktarda bulunması proteinlere ve nükleik asitlere zarar verir, lipitlerde de peroksidasyona sebep olarak hücrel fonksiyonları bozar (Tola, 2014). Bu durum “oksidatif strese (hasara)” sebep olabilir. Oksidatif stres, bir organizmadaki pro-oksidatif ve antioksidan dengesindeki bozukluk olarak adlandırılır. Sigara ve alkol tüketimi, stresli hayat tarzı, ultraviyole, mikrodalga ve X ışınlarının da serbest radikallerin düzeylerini etkilediği bilinmektedir. Radikaller; lipit, protein ve nükleik asitler gibi önemli hücrel bileşenlere zarar verebilir (Sies, 1997; Kopani, vd., 2006). Bu hasar, aynı zamanda bazı hastalıkların oluşumundan sorumlu tutulurken, vücudun yaşlanma sürecinde de bir etkiye sahiptir (Kawamoto, vd., 2005). Bu hasarlar, antioksidan sistem ve antioksidan enzimler tarafından bertaraf edilmektedir (Yokuş ve Çakır, 2002).

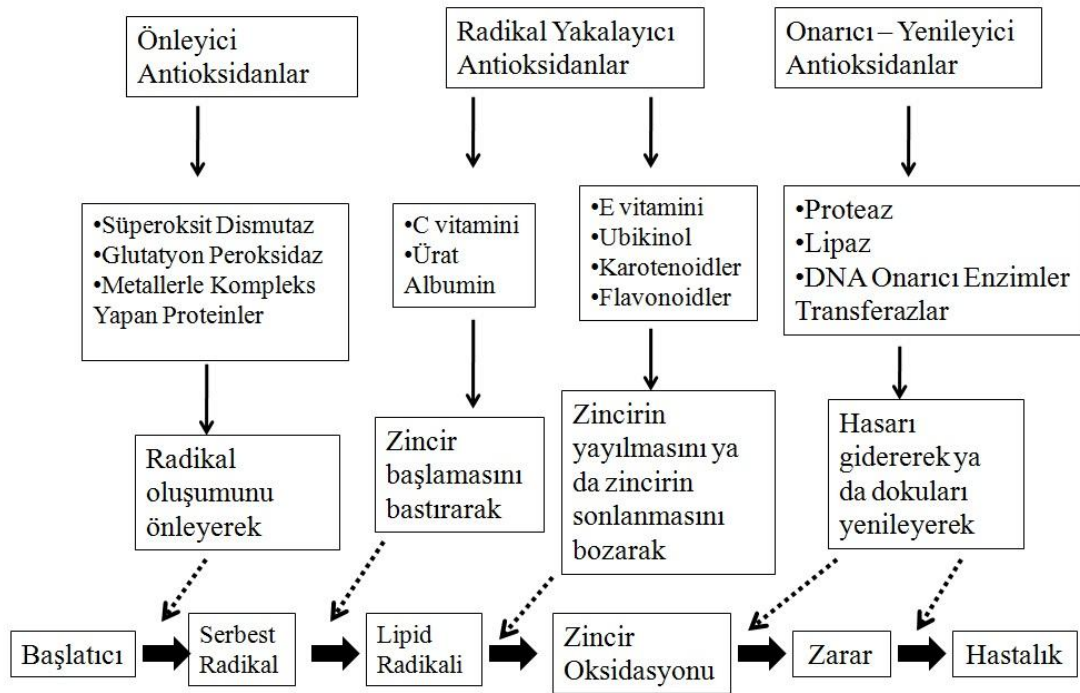
## **2.2. Antioksidanlar**

Antioksidanlar, serbest radikalleri veya serbest radikallerin eylemlerini nötralize eden maddelerdir (Sies, 1997). Antioksidanlar, zincir reaksiyonlarında oksidasyonun başlamasını ya da ilerlemesini engelleyerek diğer moleküllerin oksidasyonunu geciktiren veya önleyen bileşikler olarak da tanımlanabilmektedir (Velioglu, vd., 1998; Kumar, vd., 2015).

### 2.2.1. Antioksidan etki tipleri

Antioksidanların radikallere etki etmesi dört farklı şekilde olmaktadır (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2 Antioksidan çeşitleri ve etki etme şekilleri (Willcox vd., 2004)



#### 2.2.1.1. Toplayıcı (süpürücü) etki

Antioksidanlar serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutmaktadır ya da daha etkisiz başka bir moleküle çevirmektedir. Serbest oksijen radikallerinin etkisini bu şekilde engellenmesi toplayıcı etki olarak tanımlanmaktadır. Bu tip etki gösteren antioksidanlar; antioksidan enzimler, geraniol örnek olarak verilebilir (Akkuş, 1995; Gökpınar, vd., 2006; Choi, vd., 2000).

### **2.2.1.2. Bastırıcı (söndürme) etki**

Antioksidanlar SOR ile etkileşerek onlara bir hidrojen iyonu verip aktivitelerini azaltır ya da nötr hale dönüştürerek inaktive hale getirmektedirler. Bu etkiye timetazidin, mannitol, vitaminler ve flavonoidler sahiptir (Akkuş, 1995; Gökpınar, vd., 2006).

### **2.2.1.3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi**

Antioksidanlar serbest oksijen radikalleriyle birleşerek reaksiyon zincirlerini kırarak fonksiyonlarını engellemektedirler. Hemoglobinin, seruloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendine bağlayarak inaktive hale getirirler (Akkuş, 1995; Gökpınar, vd., 2006).

### **2.2.1.4. Onarıcı etki**

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hasarlara karşı iyileştirici etki gösteren antioksidanlardır (Akkuş, 1995; Gökpınar, vd., 2006).

## **2.2.2. Endojen kaynaklı antioksidanlar**

Serbest radikaller vücutta artmaya başladığı zaman, antioksidanlar oksidan hasarını azaltmak için vücutta savunmaya geçerler. Antioksidanlar, hücre içinde ve hücre dışında olmak üzere çok geniş bir alanda savunma yapmaktadır. Enzim olan endojen kaynaklı antioksidanlar çeşitli formlarda bulunabilir. Örneğin; glutatyon peroksidaz membran, sitozol ve plazmadan izole edilir. Süperoksit dismutazın da sitozol, membran ve hücre dışı formları bulunmaktadır. Antioksidanların bulunduğu yerler ve seviyelerinin çeşitlilik göstermesi hücrenin hayatta kalmasıyla ilgili olmaktadır (Willcox, vd., 2004).

Endojen kaynaklı antioksidanlardan enzim olmayanlar; transferrin, melatonin, seruloplazmin, miyoglobin, hemoglobin, bilirubin, ferritin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albumin olarak sıralanabilir.



Enzim olan endojen kaynaklı antioksidanlar ise; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S – transferazlar (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidazlar sayılmaktadır (Akkuş, 1995; Gök, vd., 2006).

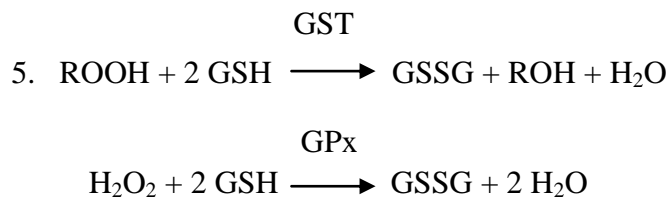
- Süperoksit dismutaz (SOD); en etkin antioksidanlardan biridir. Hücre içinde Cu – Zn SOD (SOD 1) sitozolde, Mn SOD (SOD 2) mitokondride ve EC (ekstra cellular) SOD (SOD 3) ekstraselüler de olmak üzere üç adet izoenzimi bulunmaktadır. Oksijenden ilk oluşan reaktif ürün olan süperoksit anyonunu hidrojen perokside ( $H_2O_2$ ) ve oksijen molekülüne ( $O_2$ ) dönüştürmektedir (Tekcan, 2009; Derviş, 2011).



- Glutatyon peroksidaz (GPx); hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitleri indirgeyerek suya ( $H_2O$ ) dönüştürür. GPx, ortamda çok miktarda hidrojen peroksit olması durumunda glutatyonu (GSH) okside glutatyon (glutatyon disülfür GSSH) oksidasyonunu katalizlerken, hidrojen peroksidi suya dönüştürmektedir (Demirsoy, vd., 2004). Selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki çeşit glutatyon peroksidaz bulunmaktadır.

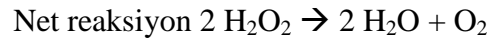
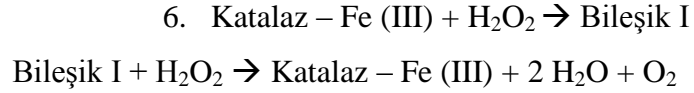
Selenyuma bağımlı enzim (GPx) hidrojen peroksit redüksiyonu için daha az kapasiteyle gerçekleştirmektedir. Selenyuma bağımlı olan glutatyon peroksidaz sitozolde bulunmaktadır.

Selenyuma bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz yani glutatyon S – transferazlar (GST) ise organik hidroperoksitleri tercihli olarak kullanılmaktadır (Ardağ, 2008; Yılmaz, vd., 2008).

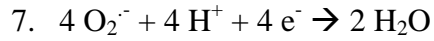


- Katalaz (CAT); hidrojen peroksidin zararlı etkisini yok etmekte ve elektron vericiye ihtiyacı olmamaktadır. Hücrede peroksizomlarda bulunmaktadır (Young ve Woodside, 2001).

Hidrojen peroksidi iki aşamalı olarak katalizlemektedir.



- Mitokondriyal sitokrom oksidaz enzimi; solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidin ( $\text{O}_2^-$ ) zararlı etkisini yok etmektedir (Akkuş, 1995).



### 2.2.3. Eksojen kaynaklı antioksidanlar

Diyet antioksidan savunma sisteminin üretimi açısından önemli bir rol oynamaktadır. E ve C vitamini,  $\beta$  – karoten, flavanoidler dâhil diğer antioksidan bitkisel fenoller ve esansiyel mineraller gibi temel besin maddelerini içeren besinlerin alınması antioksidan enzimlerinin oluşmasına yardımcı olmaktadır. Örneğin; SOD çinko içerirken, glutatyon peroksidaz selenyum içermektedir (Willcox, vd., 2004).

Eksojen kaynaklı antioksidanları vitamin, gıda ve ilaç olmak üzere üç grupta toplayabiliriz.

#### 2.2.3.1. Vitamin olan eksojen kaynaklı antioksidanlar

E ve C vitamini,  $\beta$  – karoten ve folik asit (folat) bu grupta yer almaktadır.

E vitamini ( $\alpha$  – tokoferol); hücrede bulunduğu yerler; dolanan lipoproteinlerde ve membranlardadır. Membranda bulunan yağ asitlerini lipit peroksidasyonundan korumaktadır. Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan radikaller  $\alpha$  tokoferol ile birleşerek, zincir kırılmaktadır. Bir molekül  $\alpha$  – tokoferol yüz molekül çoklu doymamış yağ asidini peroksidasyondan koruyabilmektedir. E vitamini, peroksitleri bir hidrojen atomu vererek nötrüleştirir (Memişoğulları, 2005; Okcu ve Keles, 2009; Derviş, 2011).

C vitamini (askorbik asit); kan ve plazmada serbest oksijen radikallerini ortamdaki süpürücü etkisiyle ilk savunmayı gerçekleştirerek E vitamininin aktivasyonunu tamamlamaktadır (Tekcan, 2009; Derviş, 2011).

$\beta$  – karoten; yapısında bulunan çifte bağlardan dolayı sarı, turuncu ya da kırmızı renkte bulunmaktadırlar. A vitamini dönüşebildiği için plazma dengesi sağlanmaktadır. Karotenoidler, serbest oksijen radikal süpürücülerdir. Antioksidan aktivitesi, yapısında bulunan konjuge çifte bağlar sayesinde olmaktadır (Ardağ, 2008; Yılmaz, vd., 2008; Derviş, 2011).

### **2.2.3.2. Gıdalarda bulunan eksojen kaynaklı antioksidanlar**

Butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), sodium benzoate, ethoxyquin, propylgalate ve Fe – superoxyde dismutaz gıdalarda bulunan eksojen kaynaklı antioksidanlara örnek olarak verilmektedir (Akkuş, 1995).

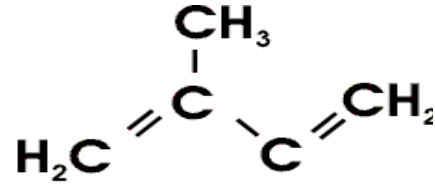
### **2.2.3.3. İlaçlar olarak kullanılan eksojen kaynaklı antioksidanlar**

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri), endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar (GSH – Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), sitokinler (TNF ve IL – 1), barbitüratlar, demir şelatörleri sayılmaktadır (Akkuş, 1995).

### 2.3. Terpenler ve Geraniol

Terpenler, doğada yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Genellikle bitkilerde bulunurlar ve küçük molekülü olanları bitkilerin yaprakları, çiçekleri ve meyve kabuklarının seçkin kokularını oluşturmaktadırlar. Ağaçlardan terpen emisyonunun yılda  $4,8 \times 10^{14}$  g olduğu düşünülmektedir (Zimmerman, vd., 1978).

Terpenler, izopren lipidlerin türevi olarak sınıflandırılmaktadır. İzoprenoidler, 5 karbonlu bir alken olan izopren türeyen bileşiklerdir. İzopren (2metil – 1,3 – butadien) oligomerleri olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.2). İzopren oligomerlerinden; karbon sayısı 10 olanlara monoterpen, karbon sayısı 15 olanlara seskiterpenler denilmektedir (Çizelge 2.3) (Güneş,2010).



Şekil 2.2 İzopren (<http://www.food-info.net/pl/qa/qa-fi69.htm>)

Terpen adı terebentin yağından gelmektedir. Terebentin yağı özellikle bazı çamgillerin kendiliğinden salgıladığı, kabukları veya filizlerinin kesilmesi ya da soyulmasıyla da açığa çıkabilen hoş kokulu ve viskoz bir maddedir.

Çizelge 2.3. Terpenlerin sınıflandırılması (Güneş, 2010)

	<b>Terpenler</b>	<b>İzopren Sayısı</b>	<b>Karbon Atomları</b>
1	Monoterpenler	2	10
2	Seskiterpenler	3	15
3	Diterpenler	4	20
4	Sesterpenler	5	25
5	Triterpenler	6	30
6	Karotenoidler	8	40
7	Kauçuk	>100	>500

### 2.3.1. Monoterpenler

Monoterpenlerin hemen hemen hepsi bitkiler tarafından oluşturulmaktadır (Hylemon ve Harder, 1998). Sudaki çözünürlükleri oldukça az olmasına rağmen, yeraltında geçen süre ile difüzyonla bileşiğinin ayrılması için yeterlidir (Weidenhamer, vd., 1993).

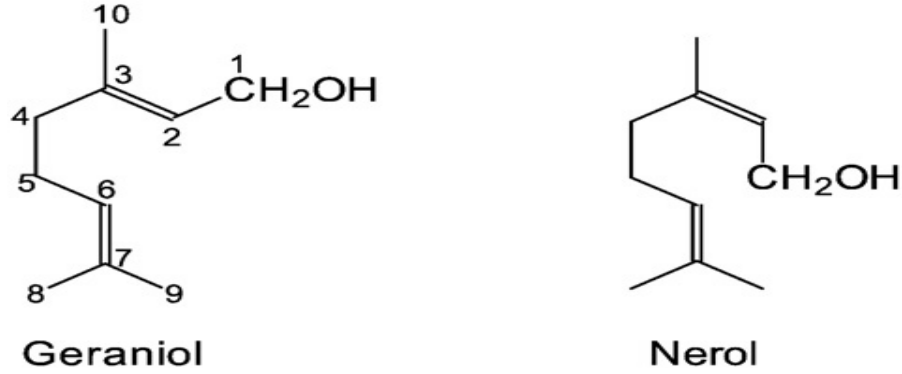
Monoterpenler baharatlarda, yenilebilen ve şifalı bitkilerin yanı sıra eskiden kullanılan ilaçlarda bulunmaktadır. Ayrıca; çeşitli gıdalarda ve alkollü ve alkolsüz içeceklerin üretiminde tat verici katkı maddesi olarak, parfüm sentezinde ara ürün olarak, kişisel bakım ürünlerinde ve evlerde kullanılan genel temizlik maddelerinde (deterjan, böcek kovucu, sabun vb) esans olarak oldukça yaygın ve çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır (De-Oliveira, vd., 1997). Bitkilerde tozlaşmayı sağlamak için çekici madde olurken, mantar öldürücü olarak savunmaya yardım eder ve otçul olarak beslenen canlılara karşı caydırıcı olarak ekolojik rollere sahiptir (De Carvalho ve da Fonseca, 2006).

Monoterpenler, bitkilerde doğal olarak bulunan biyolojik olarak aktif kimyasal bileşik olan bitki kökenli kimyasalların sınıfına girmektedir. Bu tür bileşikler yaygın olarak tüketilen meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Son dönemlerdeki çalışmalar, monoterpenlerin anti tümör aktivitelerini ve bileşenlerinin kanseri kimyasal yollardan önleyen yeni bir sınıf ajan olduğunu göstermiştir. Kanser biyolojisinde yeni bir yaklaşım olan; kanseri kimyasal yollardan önlemede doğal, sentetik veya biyolojik maddelere başvurulmaktadır. Bu sayede tümör hücrelerinin oluşumu önlenilmekte ya da varolan tümör hücrelerini bastırabilmektedir (Ji, vd., 2002; Madankumar, vd., 2013).

### 2.3.2. Geraniol

Geraniol, bilinen en eski organik bileşiklerden biridir. Terpenlerde ve çeşitli bitkilerde bulunmaktadır. Gül ve palmasora yağının ana maddesi olarak bulunurken, limon zencefil, gül, portakal vb bitkilerin içinde aktif bir bileşen olarak temel yağ olarak bulunmaktadır (Miyazawa, vd., 1998; Hamiza, vd., 2013).

Geraniol (2,6-dimetiltrans-2,6-oktadien-8-ol ya da 3,7-dimetilokta-trans-2,6-dien-1-ol) kapalı formülü  $C_{10}H_{18}O$  olan asiklik monoterpen bir alkoldür. Geraniol (trans) ve nerol (cis) olmak üzere iki adet izomeri bulunmaktadır (Şekil 2.3) (Chen ve Viljoen, 2010; Madankumar, vd., 2013).



Şekil 2.3 Geraniol ve Nerol' ün kimyasal yapısı (Chen ve Viljoen, 2010)

Geraniol açık sarı renkli berrak bir yağdır. Geraniolün karakteristik gül kokusu ve gül gibi tatlı, mumsu, turunçgillere benzeyen bir tadı vardır. Organik çözücülerin çoğunda çözünür fakat suda çözünmez. Bitkilerin vejetatif dokularında ve birçok çiçekten yayılan kokuların sahibi, geranioldür. Çoğu zaman oksidasyon ürünleri ile (geraniol ve nerol) birlikte bulunmaktadır (Regev ve Cone, 1976; Burdock, 2010).

### 2.3.2.1. Geraniol biyosentezi

Geraniol, geraniol difosfattan (GPP) ortak bir iyonizasyon bağımlı reaksiyon mekanizmasına göre ilgili sentezleri tarafından türetilmektedir. GPP, izopentenil difosfat (IPP) ile dimetilalil difosfat (DMAPP) kuyruğun baş kısmının yoğunlaşması aracılığıyla sentezlenmektedir. IPP sırasıyla sitoplazmik asetat – mevalonat ya da son zamanlarda bulunan plastide olmayan mevalonat (piruvat/trioz – fosfat) yolu ile geraniol saflaştırılmaktadır (Mahmoud ve Croteau, 2002). Geraniolün biyosentezi genel olarak mevalonat yolu ile olmakla birlikte, mevalonat içermeyen bazı bitkilerdeki biyosentezi yolları tarafından olduğu bilinmektedir (Luan ve Wüst, 2002). Iijima ve arkadaşları, fesleğenin şemsiyemsi bezlerinden geraniolü ilk saflaştıran kişilerdir. Geraniol sentaz (GES), fesleğenin şemsiyemsi bezlerinde karakterizedir ve bu yolla geraniol üretimi son derece özeldir (Iijima, vd., 2004). Daha sonraları tarçında tanımlanan geraniol sentazı

izole ederek E.coli' nin cDNA klonunun aktif bölgesine aktararak elde edilmeye başlanmıştır (Yang, vd., 2005).

### **2.3.2.2. Geraniolün antioksidan aktivitesi**

Geraniolün yapılan araştırmalar sonucu radikallere karşı belirgin bir süpürücü etki gösterdiği görölmektedir (Choi, vd., 2000). Stresli hücreler ile önceden müdahale edilmiş hücreler karşılaştırıldığında lipit peroksidasyonu, serbest NO ve SOR üretimini geraniolün önemli ölçüde azalttığı tespit edilmektedir. Ayrıca geraniol, SOR' a karşı önemli bir koruma göstermektedir (Chen ve Viljoen, 2010).

### **2.3.2.3. Geraniolün anti kanser aktivitesi**

İn vivo ve in vitro olarak yapılan araştırmalar; geraniolün birçok insan kanseri türüne karşı anti kanser aktivitesi gösterdiği ve pankreas ve diğer kanser türlerine karşı da kemoterapik etki gösterdiği görölmüştür (Burke, vd., 1997). Geraniolün, hepatoma ve melanoma üzerinde hücre büyümesini engelleme etkisi bulunmaktadır (Polo and De Bravo, 2006). İnsan kolon kanseri üzerindeki çoğalmaya karşı etkisinin hücre döngüsünün S fazında hücrelere blokaj uygulayarak DNA sentezini azaltmaktadır (Carnesecchi, vd., 2004).

## **2.4. İskemi Reperfüzyon**

Atar ve toplardamarlarda kan akışının azalması ile bağlı olduğu organın veya dokunun beslenememesi sonucu oksijenden yoksun kalmasına "iskemi" denilmektedir. Bu durum hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne neden olmaktadır. İskemik dokunun hücre rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için kan akımının tekrar başlaması gerekmektedir. Tekrar kan akımının başlamasına "reperfüzyon" denilmektedir (Birincioğlu, 2012; Zimmerman ve Granger, 1992). İskemi, eğer geri dönüşümlü ise reperfüzyon sayesinde hücrede enerji depoları ve hücresel korunması geri kazanılabilir (Karabiga, 2007). Ayrıca reperfüzyon,

toksik metabolitleri uzaklaştırmada da önemli bir etkiye sahiptir (Zimmerman ve Granger, 1992).

Tekrar kan akımı sadece iskemi ile birlikte oluşan hasara göre daha ciddi hasarlara yol açtığı için bir çekilişki oluşmaktadır. Reperfüzyon döneminde gözlenen bu hasara hücre içine moleküler oksijen girişi ile birlikte hızla oluşan serbest oksijen radikal ve türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma sebep olmaktadır (Wilhelm, 1989).

Reperfüzyon hasarında en hassas olan hücresel yapılar; zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (Wilhelm, 1989).

Reperfüzyonun hücrede yarattığı hasarlar, şu şekilde sıralanabilir;

- Enerji kaybına uğrayan organda reperfüzyon sırasında  $Ca^{2+}$  taşınması,
- Hasarlı endotele, nötrofilin birikmesi,
- Ksantin oksidaz kaynaklı serbest oksijen radikallerinin oluşması,
- Hücrede enerji açığının meydana gelmesi ve adenin nükleotidinin sağlanamaması nedeniyle hücrede hasar meydana gelmektedir (Yüzer, 2008).

İskemik dönemde hücrede yapısal ve metabolik bazı değişiklikler görülmektedir. Dokuya gelen kan akımının durmasıyla hücresel oksidatif fosforilasyon ve enerji sentezi azalmaktadır (Jennings ve Reimer, 1991). Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan  $Na^+$ ,  $K^+$  - ATPaz pompasının engellenmesi ile hücre içinde  $Na^+$  ve  $Ca^{++}$  iyon konsantrasyonları artmaktadır. Hücre içinde  $Ca^{++}$  konsantrasyonunun artması sitotoksitete neden olmaktadır (Green, vd., 1989; Orrenius, vd., 1992). Bu sırada hücrede meydana gelen iyon konsantrasyonunun değişimi proinflamatuvar sitokinlerin lökosit adhezyon molekülerini artırması, antioksidan enzimlerinin oluşumunu azaltmaktadır. Bu durumda hücreyi reperfüzyon sırasında meydana gelen hasarlara karşı korumasız bırakmaktadır. İskemi sırasında ATP üretimi dursa bile ATP kullanılmaya devam edilmektedir. ATP' den AMP ve adenozin oluşumuyla, adenozinin hücre dışına çok hızlı bir şekilde difüzyonu gerçekleşir ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Hücrede purin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrogenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açmaktadır. Normal şartlarda hipoksantin  $NAD^+$  ile ürik aside



dönüşmektedir. İskemi ya da hipoksi durumunda ise KDH KO' a dönüştüğünden hipoksantinin ürik aside dönüşümü KO tarafından NAD<sup>+</sup> yerine moleküler oksijen kullanılarak olmaktadır (Parks, vd., 1988).

İskemi reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmektedir. Bunların birbirleriyle olan ilişkileri karışık olsada, hücrel ve humoral olaylar serileridir. Özellikle; serbest oksijen radikalleri, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında sayılmaktadır (Homer-Vanniasinkam, vd., 1997).

Reperfüzyon yaralanması, iskemik yaralanma sonucu başlangıç hasarının oluşmasıyla saatler ve günler boyunca gelişmektedir (Kosieradzki ve Rowiński, 2008).

Onarım ve yenilenme süreçleri hücrel apoptoz, otofaji ve nekroz ile birlikte ortaya çıkmaktadır ve bir organın kaderi hücre ölümü ya da yenilenmenin olup olmasına bağlıdır. Apoptozun gerçekleşmesi için enerji ve protein sentezi gerektiğinden, en fazla reperfüzyon sonrasında meydana gelmektedir (Kosieradzki ve Rowiński, 2008).

#### **2.4.1. Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz iskemik hasar**

İskeminin devamlı olması halinde, dokularda meydana gelen bozuklukların geri dönüşümü olmaz, eğer kan akımı tekrar sağlanırsa hasar geri dönüşümlü olmaktadır. Geriye dönüşümsüz hücrel hasarın başlamasındaki en kritik dönemin Ca<sup>++</sup> iyon homeostazisinin bozulması olarak düşünülmektedir (Gelman, 1995; Mauney, vd., 1995; Tetik ve Gürbüz, 2000).

##### **2.4.1.1. Geri dönüşümlü iskemik hasar**

İskemi ilk önce oksijenli solunumu hasara uğratmaktadır. Hipoksi sonucu mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu engellediği için ATP oluşumu yavaşlamakta ve en sonunda durmaktadır. ATP kaybı nedeni ile hücre içinde bulunan çeşitli sistemlerin çoğu etkilenmektedir. Özellikle hücre zarının quabain duyarlı ATP aktivitesinin azalması ile

zarda aktif  $\text{Na}^+$  pompasında yetersizliğe bunun sonucunda da hücre içinde  $\text{Na}^+$  un birikmesine ve hücreden  $\text{K}^+$  un dışarı atılmasına neden olmaktadır. Katı maddelerinin birikmesine izoozmotik su birikimi de eklenerek hücrede, akut hücre sel şişme meydana gelmektedir (Robins, vd., 1979).

İskeminin ilk dakikalarında aşırı uyarılan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, NADH birikimine ve asidozun meydana gelmesiyle doku inhibe olmaktadır. İskemik dokuda mevcut olan oksijen oksidatif fosforilasyonu desteklemek için yetersiz kalmakta ve glikoliz sonucu oluşan piruvatın Krebs döngüsüne girişini sağlayamamakta ve laktata dönüşmesine neden olmaktadır. Glikoliz; laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu meydana gelen inorganik fosfat birikimine neden olmakta ve bu da hücre içi pH' ını düşürerek asidoza neden olmaktadır. İleriki dönemde ribozomlar, granüllü endoplazmik retikulumdan (GER) ayrılarak, polizomları monozomlara parçalamaktadır. Hipoksi devam ederse, zar geçirgenliği daha da artmakta ve mitokondri fonksiyonları da azalmaktadır. Bu durum, hücre yüzeyinde tomurcuklanmaları oluşturmaktadır. Sitoplâzma veya dışında organel zarlarına benzer plazmadan köken alan, konsantrik laminalı myelin figürler meydana gelmektedir. GER genişlemekte ve tüm hücre belirgin olarak şişmektedir. Tüm bu hasarlar dokuya tekrar oksijen verildiğinde geri dönüşümlüdür fakat iskemi devam ederse geri dönüşümsüz hasar meydana gelmektedir (McDougal, 1985).

#### **2.4.1.2. Geri dönüşümsüz iskemik hasar**

Geri dönüşümsüz zedelenme yapısal olarak mitokondri ve kristalarında aşırı vakuolizasyon, plazma zarında yüksek düzeyde zedelenme, lizozomlarda şişme; özellikle de iskemik alan yeniden beslenirse hücre içinde yoğun kalsiyum tutulumu ile birlikte görülmektedir. Geri dönüşümsüz iskemik hasarının erken bulguları mitokondride 30 – 40 dakika da görülmektedir. Proteinler, temel koenzimler, RNA aşırı geçirgen olan zarlar yüzünden sürekli kaybedilmektedir. Hücreler, hücre içi yüksek enerjili fosfatın yapımında kullanılacak ATP' nin yeniden oluşumunu sağlayacak, yaşamsal öneme sahip olan metabolitlerini de kaybetmektedir. Hücre içindeki pH' ın düşmesi ile birlikte lizozom zarları zedelenecek, enzimler sitoplâzmaya geçmektedir.

Asit hidrolazlarının aktifleşmeye başlaması ile sitoplazmik ve çekirdek yapılar sindirilmektedirler. Bu durum, hücre ölümüne kadar gitmekte, hücre organelleri devamlı parçalanmakta ve hücrel enzimler hücre dışına sızmaktadır. Sonuçta; ölü hücreler myelin oluşumlar ve fosfolipitlerden meydana gelen büyük kitlelere dönüşmektedirler. Daha sonra diğer hücreler tarafından fagosite olmakta veya yağ asitlerine kadar parçalanmaktadır. Yağ asitlerinin kalsifikasyonu ile de kalsiyum sabunları oluşmaktadır (Chien, vd., 1978).

Hipoksi sonucu geri dönüşümsüz değişikliklerin gelişmesi için geçen süre dokudan dokuya farklılık göstermektedir. İskelet kasları saatlerce hipoksiye direnebilirken, beyin için bu süre çok kısadır, kalp içinse yaklaşık 60 dakikadır (Çavdar, vd., 1997).

İskemi sırasında meydana gelen bu hasarlar, reperfüzyon sırasında oluşan hasarların başlangıcı kabul edilmektedir (Grace, 1994).

Son yıllarda hayvan deneylerinde serbest oksijen radikallerinin böbrek hastalıklarında patofizyolojik önemleri saptanmaktadır. Böbrek dokusu veya idrarda oksidan hasar ürünlerinin bulunmasının yanında serbest oksijen radikalleri inhibitörleri ile koruyucu etki göstermesi bunun bir kanıtı sayılmaktadır (Nath, vd., 1994).

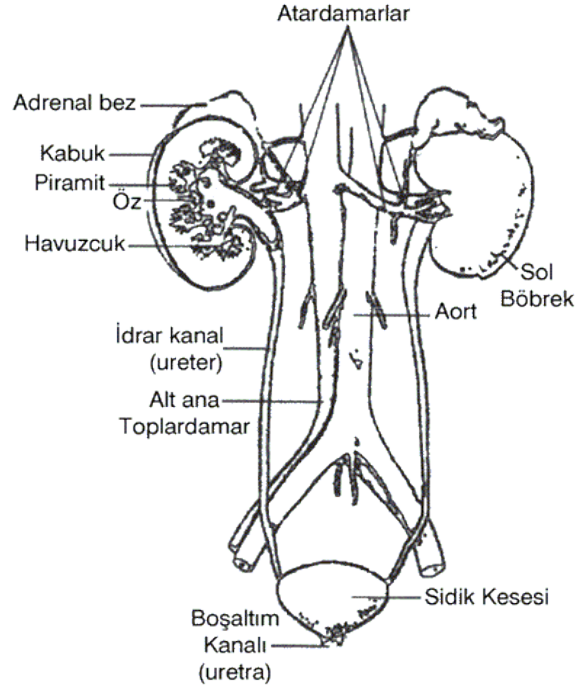
Böbreklerde meydana gelen ve doku hasarına neden olan oksidan radikaller, antioksidan savunma sistemleri ile temizlenmektedirler. Kronik böbrek yetmezliği durumunda ise oksidan – antioksidan dengesi bozulduğu için serbest oksijen radikalleri artmakta, antioksidan savunması ise azalmaktadır (Kuroda, vd., 1985).

## **2.5. Boşaltım Sistemi ve Böbrekler**

### **2.5.1. Boşaltım Sistemi Fizyolojisi**

Vücudun iç dengesine katılan en önemli organ sistemlerinden birini boşaltım sistemi oluşturmaktadır. Vücut sıvılarının hacim ve içeriğinin, kan basıncının, pH' nın, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi, hücrelerde metabolizma sonucu oluşan ve kana

verilen artık ürünlerden kanın temizlenmesi boşaltım sistemi (Şekil 2.4) fonksiyonları arasında sayılmaktadır (Bullock J, 2001).



Şekil 2.4 Boşaltım sisteminin yapısı (Aydın,2006)

Böbreklerin kanı süzmesi sonucu idrar meydana gelmektedir. Üreterler aracılığı ile idrar kesesinde toplanan idrar, üretra yardımıyla dışarı atılmaktadır. İdrarla atılan önemli metabolizma artıkları; nitrojen içeren üre ve ürik asit gibi artıklardır. Protein ve pürin bazları, nitrojen artıklarının en önemli kaynaklarıdır. Proteinlerin parçalanması sonucu amonyak oluşmaktadır. Amonyak, hücreler için aşırı toksik olduğundan dolayı karaciğerde daha az toksik olan üreye çevrilmekte ve böbrekler aracılığı ile dışarı atılmaktadır. Pürin bazlarının parçalanmasıyla ise ürik asit meydana gelmektedir (Thadhani, vd., 1996).

### **2.5.1.1. Böbrek anatomisi**

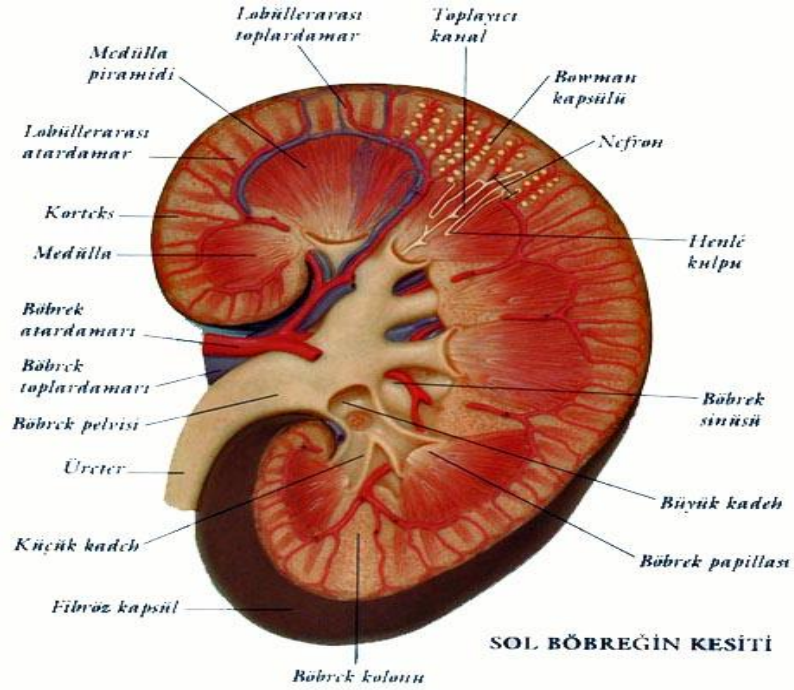
Karın zarı arkasında, omurganın yanlarında on ikinci torakal (omur) ve üçüncü lumbal vertebralar (bel omurları) seviyesinde çift organ olarak bulunmaktadır. Sol böbrek sağ böbreğe oranla biraz daha yukarıda bulunmaktadır. Böbreğin uzunluğu 12 cm,

genişliği 5 – 7 cm, kalınlığı ise 3 – 4 cm civarında olmaktadır. Ağırlığı ise erkeklerde ortalama 150 g iken kadınlarda 125 g civarında, ön ve arka yüzü, iç ve dış olmak üzere iki kenarı, alt ve üst ucu bulunmaktadır. Ön ve arka yüzlerinin ikisi de konvektir. İç kenarının ortasında bulunan hilus renalis denilen yarık sayesinde, böbreğin içinde bulunan ve sinüs renalis denilen boşluğa girilmektedir (Odar, 1986; Tisher ve Madsen, 1991).

Böbreğin hilusunu oluşturan kısımda böbreğe giren ve çıkan damarlar ve sinirler, renal pelvis ve bunların arasını dolduran yağ dokusu bulunmaktadır. Hilusta önde böbrek toplardamarı, ardında böbrek atardamarı ve en arkada böbrek pelvisi şeklinde sıralanmaktadır. Lenf damarları renal pelvisin etrafında bulunurken, sinirler renal arterin etrafında bulunmaktadır (Guyton, 1991).

Böbrekler, dikey şekilde kesildiğinde dış kısmında korteks, iç kısmında medulla denilen iki ana bölge bulunmaktadır. Böbreğin medullasında böbrek piramitleri denilen koni şeklinde çok sayıda doku kitleleri bulunmaktadır. Piramitlerin tabanı korteks ile medulla sınırından başlar ve üreterin huni biçiminde üst ucunun devamından oluşan böbrek pelvisinin devamına doğru uzanan papillada son bulmaktadır. Pelvisin dış sınırı majör kaliks denilen açık ceplerle aşağı doğru uzanır ve her papillada tüplerden idrar toplayan minör kalikslere ayrılmaktadır (şekil 2.5). Kalikslerin; pelvisin ve üreterlerin duvarı idrarı mesaneye doğru ilerleten kasılabilir elemanları mevcuttur (Guyton, 1991).

Böbrek atardamarı, hilum bölgesinden böbrek toplardamarı ve üreter ile birlikte böbreğe girer ve interlobüler, arkuat, interlobüler arterlere ve afferent arteriollere (getirici damar) ayrılmaktadırlar. Afferent arterioller, glomerüler kapilleri oluşturmaktadır. Her glomerül kapillerinin distal ucu, böbrek tübüllerini çevreleyen ve peritübüler efferent arteriyolu (götürücü damar) oluşturmak için bir araya gelmektedir (şekil 2.5). Peritübüler kapiller arteriyoler damarlara paralel seyreden venöz sistemin damarlarına boşalırlar ve bunlarda sırasıyla; interlobüler ven, arkuat ven, interlober ven ve son olarak da böbreğin renal arterine komşu olarak böbrek venini oluşturmaktadırlar (Navar L.G., 1995; Lance D.D., 1996).



Şekil 2.5 Böbreğin iç yapısı

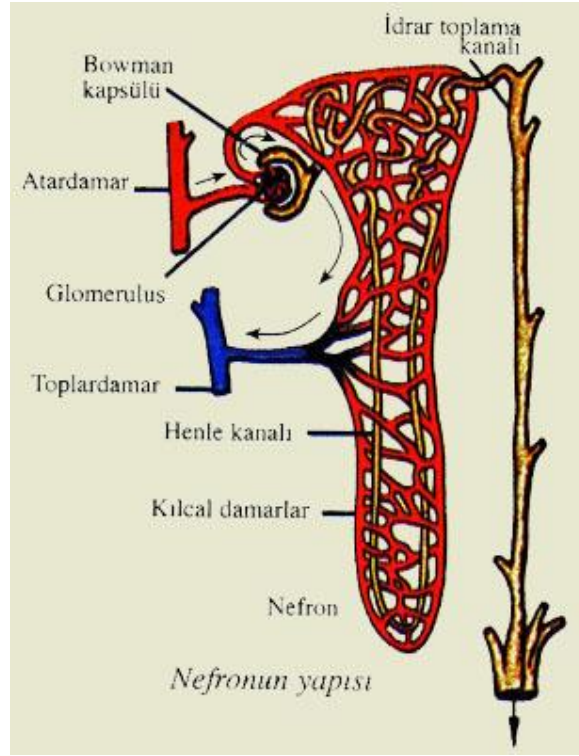
([http://www.biyolojisesitesi.net/tum%20uniteler/bosaltim/bobregin\\_yapisi.html](http://www.biyolojisesitesi.net/tum%20uniteler/bosaltim/bobregin_yapisi.html))

### 2.5.1.2. Nefron yapısı

İnsanda her böbrek bir milyona yakın nefrondan oluşmaktadır. Böbrek hasarı, hastalıklar veya yaşlanma sonucu nefron sayısında azalmalar meydana gelmektedir. 40 yaşından sonra işlev gören nefron sayısı her 10 yıl için %10 azalma göstermektedir (Guyton, 1991).

Nefronlar, böbreklerde idrarın oluşmasını sağlayan en küçük ünitelerdir. Bir nefron; çift yapraklı Bowman kapsülü içine yerleşmiş olan kapiller damarlar tarafından oluşturulmuş glomerül yumağı ve tübüllerden meydana gelmiştir. Kanın filtre edildiği yer glomerül yumağı, idrarın oluştuğu yer ise tübüllerdir. Kan, glomerüllerle Bowman kapsülüne giren afferent arteriyol ile kapiller bölgesine getirilmekte, kan burada süzildükten sonra kapsül içinde kapiller damar yumağı oluşturulup, efferent arteriyol ile Bowman kapsülünden çıkmaktadır. Nefronların tübüller kısmı Bowman kapsülünden başlayarak dört bölümden meydana gelmektedir. Bunlar; proksimal tübülüs, Henle kulbu,

distal tübülüs ve toplayıcı kanallardır. Bowman kapsülünden proksimal tübülüse ulaşan süzüntü, toplayıcı kanallara ulaştığında idrar haline gelmektedir (Şekil 2.6). Oluşan idrar böbreklerin pelvis bölgesinde toplandıktan sonra üreterlere gönderilmektedir (Guyton, 1991; Kon, 1995; Madox ve Brenner, 1996) (Bkz. Şekil 2.3.).



Şekil 2.6 Nefron yapısı

([http://www.biyolojisesi.net/tum%20uniteler/bosaltim/nefronun\\_yapisi.html](http://www.biyolojisesi.net/tum%20uniteler/bosaltim/nefronun_yapisi.html))

İdrarın oluşması için nefronlarda üç aşama; filtrasyon, geri emilim (reabsorbsiyon) ve salgılama (ekskresyon) gerçekleşmelidir.

Filtrasyon; glomerül kapiller yumağına gelen kanın proteinler ve hücreleri dışındaki tüm maddeler Bowman kapsülünde filtre edilmektedir. Protein dışında plazmanın yapısı ile süzüntü hemen hemen aynıdır. Glomerül kapillerindeki filtrasyon hızı (GFR), birim zamanda süzülen plazma miktarı olarak tanımlanmaktadır. Normal şartlarda böbrekler dakika da 125 ml plazmayı süzmektedir, bu da günde 180 lt filtrasyon miktarına denk gelmektedir. Böbreklerdeki filtre miktarının bu kadar fazla olmasına rağmen günde 1 – 1,5 litre idrar dışarı atılmaktadır. Bunun nedeni; süzüntünün %99' u tübüllerden geçerken geri emilerek kana tekrar verilmektedir.

Geri emilim (reabsorbsiyon); süzüntü içindeki su ve maddeler basit difüzyon ve aktif taşıma ile önce tübül epitel hücrelerine, buradan da kana geri emilmektedirler. Geri emilim organizmanın ihtiyacı doğrultusunda düzenlenmektedir. Geri emilimin %90' ı proksimal tübül de gerçekleşmektedir. Geri emilen maddeler, meydana gelen osmotik basınç nedeni ile bir miktar su da geri emilmektedir. Tübüllerde geri emilemeyen madde miktarının artması suyun geri emilimini de azaltacağından diürece neden olmaktadır.

Salgılama (ekskresyon); idrar oluşması sırasında bazı maddeler tübül epitel hücreleri tarafından doğrudan tübüller içine salgılanmaktadır. Bazı maddeler ise hem glomerül filtrasyon yolu ile hem de salgılama ile idrara çıkmaktadır. Kreatinin bu tür maddelere en iyi örnek olmaktadır (Kon, 1995; Madox ve Brenner, 1996).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmamızın tamamı; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Deney Hayvanları Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi Etik Kurulunun 328/2013 sayılı izni ile yapılmıştır ve etik kurul raporu Ek Açıklamalar: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararın' da sunulmuştur.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmamızda; 200 – 250 gr ağırlıkta, 3 – 4 aylık, sağlıklı, *Wistar albino* cinsi, erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarından temin edilerek, 1 hafta boyunca ortama adaptasyonları sağlanmıştır. Deney süresince 12/12 aydınlık – karanlık ışıklandırması olan, ısı ( $22\pm 2$  °C) ve nemi (%45 – 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenmiştir ve çeşme suyu verilmiştir.

#### 3.2. Deney Grupları

Her birinde  $n = 7$  şer sıçan olmak üzere 28 adet sıçan arasından rastgele seçimle toplam 4 grup oluşturulmuştur.

Grup 1 (Sham): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanmıştır ve 15 gün iyileşme süresi beklenmiştir. Her hayvanın batın kısmı açılıp iskemi işlemi yapılmadan kapatılmıştır. Reperfüzyon bitiminde diseksiyon gerçekleştirilmiştir.

Grup 2 (SF + İ/R): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanmıştır ve 15 gün iyileşme süresi beklenmiştir. Her hayvana 2 ml serum fizyolojik intraperitoneal

olarak iskemiden 1 saat önce verilmiştir ve 45 dakikalık iskeminin ardından 4 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Reperfüzyonun bitiminde diseksiyon gerçekleştirilmiştir.

Grup 3 (50 mg/kg Geraniol + İ/R): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanmıştır ve 15 gün iyileşme süresi beklenmiştir. Her hayvana 50 mg/kg geraniol tek doz intraperitoneal olarak iskemiden 1 saat önce verilmiştir ve 45 dakikalık iskeminin ardından 4 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Reperfüzyonun bitiminde diseksiyon gerçekleştirilmiştir.

Grup 4 (100 mg/kg Geraniol + İ/R): Bu grup deney hayvanlarına nefrektomi işlemi uygulanmıştır ve 15 gün iyileşme süresi beklenmiştir. Her hayvana 100 mg/kg geraniol tek doz intraperitoneal olarak iskemiden 1 saat önce verilmiştir ve 45 dakikalık iskeminin ardından 4 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Reperfüzyonun bitiminde diseksiyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.3. Geraniol Uygulaması**

Ticari olarak temin edilen geraniol (Sigma, 163.333) 50 mg/kg ve 100 mg/kg olarak iki doz olarak iskemiden 1 saat önce tek doz intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

### **3.4. Cerrahi İşlemler**

#### **3.4.1. Anestezi**

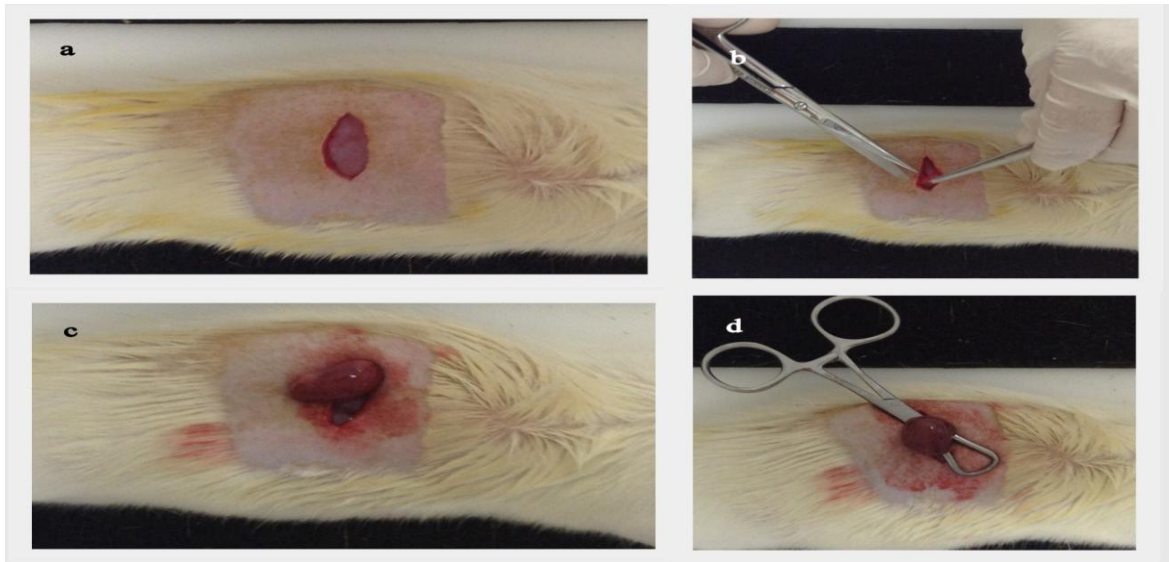
Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nefrektomi yapılacak deney hayvanlarına 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi intramuskular olarak uygulanmıştır. Cerrahi uygulama bölgesi %70' lik etil alkol ile temizlenip sağ böbrek nefrektomisi gerçekleştirilmiştir (Waynforth ve Flecknell, 1992) ve 15 gün süre iyileşmeleri beklenmiştir (Sener, vd., 2005).

İskemi reperfüzyon yapılacak deney hayvanlarına 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezi intramuskular olarak uygulanmıştır (Kulisic, vd., 2004; Aydoğdu, vd., 2005).

### 3.4.2. Nefrektomi işlemi

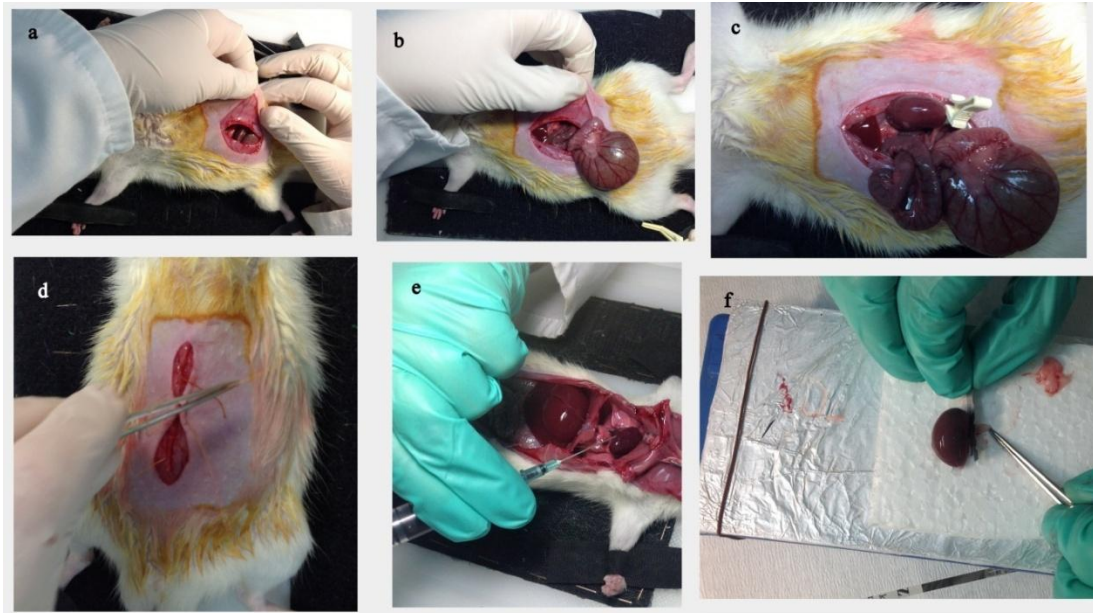
Anestezi altındaki deney hayvanları sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilip, rektal ısı kontrolü yapılmıştır (Şekil 3.1). Cerrahi işlem bölgesine traş işleminden sonra, %70'lik alkol ile temizliği sağlanmıştır. Böbreğin yeri el muayenesi ile tespit edildikten sonra, kesit atılmıştır. Kesit yeri bağ dokulardan temizlendikten sonra, kas dokusu da kesilerek, böbrek çıkartılmıştır. Çıkarılan böbrek, klemp makası yardımıyla tutularak sütür ile boğumlanarak vücuttan ayrılmıştır. Her bir sıçana nefrektomi işlemi sırasında kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için karın boşluğuna steril SF verilmiştir (Kaya, vd., 2002). Bu işlemin devamında kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kesi bölgesi kapatılmıştır ve antiseptik solüsyon ile temizlenmiştir. Cerrahi işlem görmüş her bir hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli şeffaf kafeslere ayrı ayrı koyularak 15 gün iyileşmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.1 Nefroktomi işlemi a) Diseksiyon, b) Kesili alanın bağ dokudan temizlenmesi, c) Sağ böbreğin çıkartılması, d) Sağ böbreğin klemp ile tutulup, sütür ile boğumlanarak vucüttan ayrılması

### 3.4.3. İskemi reperfüzyon işlemi

Nefrektomi yapılan ve 15 gün iyileşmeleri beklenen deney hayvanlarına anestezi altında sol renal arter izole edilerek, antitravmatik vasküler klemp yardımıyla 45 dakika süre ile kan akışı durdurulmuştur. 45 dakika iskeminin hemen ardından 4 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Reperfüzyon süresince vücutta kaybolan sıvının etkilerine engel olmak için karın boşluğuna steril SF verilmiştir (Kaya, vd., 2002). Bu işlemin ardından kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat sürekli olarak 3/0 ipek suturele dikilerek kesi bölgesi kapatılmıştır ve antiseptik solüsyon ile cerrahi bölgesi temizlenmiştir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf kafeslere ayrı ayrı yerleştirilerek 4 saatlik reperfüzyon süresi boyunca yaşatılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 İskemi/Reperfüzyon İşlemi a-b) Sol renal arterin izolasyonu, c) Sol renal artere klemp takılması, d) Cerrahi bölgenin kapatılması, e) Reperfüzyon sonunda kalpten kan alınması, f) Vücuttan sol renalin alınarak, doku örneğini alınması

### 3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Böbrek iskemi – reperfüzyon da sitotoksisitenin aydınlatılması için deney gruplarındaki sıçanlardan anestezi altında uygun teknikler kullanılarak kalpten kan ve böbrek doku örnekleri alınmıştır.

### 3.5.1. Serum örnekleri

Biyokimyasal çalışmalar için alınan kan örnekleri MSE Mistral 2000 marka cihaz ile 10 dk 3000 rpm devirde santrifüjlenerek serumları elde edilmiştir (Sanz, vd., 1998; Aktay, vd., 2000; Theocharis, vd., 2001). Eppendorf tüplere aktarılan serum örnekleri analiz süresine kadar -80 °C derin dondurucuda korunmuştur (Furuta, vd., 2000).

Böbrek hücrelerinin muhtemel fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla biyokimyasal olarak serum örneklerinde üre ve kreatinin değerleri Crony Airone 200 RA Otoanalizatör ile ticari kit (Biolabo, FRANCE) kullanılarak belirlenmiştir.

### 3.5.2. Böbrek doku örnekleri

Histolojik çalışmalar için alınan böbrek doku örnekleri tüm gruplarda diseksiyondan hemen sonra sol böbrek alınıp üç kısma ayrılarak orta kısım histolojik analizler için %10' luk nötral formaldehit fiksasyon sıvısına, diğer kısımlar ise biyokimyasal analizler için polietilen tüplerde -80 °C derin dondurucuya konulmuştur.

#### 3.5.2.1. Böbrek doku örneklerinin histolojik analizleri

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

([http://www.megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Histolojik%20Preparat%20Haz%C4%B1rlama.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Histolojik%20Preparat%20Haz%C4%B1rlama.pdf)).

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

### **3.5.2.2. Böbrek doku örneklerinin biyokimyasal analizleri**

Histolojik analiz için kullanılan doku haricinde kalan dokular böbrek iskemisi reperfüzyon sitotoksitesinin aydınlatılması için elektroforez analizinde kullanılmak üzere +4 °C' de çözülerek; doku örneklerinde homojenizasyon yapıldıktan sonra SOD ve CAT enzim aktivitelerine bakılmıştır.

#### **i – Homojenizasyon:**

-80 °C' de saklanan böbrek dokuları bağ dokusu ve yağlarından temizlenerek küçük bir parça alınarak hassas terazide tartılıp, çıkan tartım sonucunun 4-5 katı kadar soğuk KCl çözeltisi içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4 °C' de 5000 G' de 1 saat santrifüj (Eppendorff Centrifuge marka ve 5804 R model) edilmiştir. Süpernatant kısmı elektroforez için ayrılmıştır.

#### **ii - Protein miktar tayini:**

Doğal jel elektroforezi kullanılarak aktiviteleri belirlenecek olan SOD ve CAT izoenzimlerinin total protein miktarları ayrıca belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız Qubit testi, 260 nm UV absorbansı ile protein miktarını kantitatif olarak ölçme esasına dayanmaktadır. Protein deneyi için bu yöntem de 3 standart protein reaktifi ve çalışma solüsyonu 1:200 oranında seyreltilerek protein tamponu oluşturulmuştur. Bu protein tamponunu oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra cihaz da (e Qubit® 2.0 Fluorometer) protein miktarları okunmuştur (Qubit® 2.0 Fluorometer, 2010).

iii – Doğal jel elektroforezi:

Doğal jel elektroforezi, SDS çözeltileri olmadan ve örnekler elektroforez öncesi kaynatılmadan, karaciğer örnekleri üzerinde ilk olarak Laemmli tarafından 1970 yılında yapılmıştır (Laemmli, 1970). Doğal jel elektroforezinde kullanılan tamponlar, deterjan ve diğer denatüre edici maddeleri içermediğinden, prosedür doğal koşullarda gerçekleştirilmiştir. Tüm çözeltiler deiyonize su ile hazırlanmıştır. Tris içeren tamponlar ‘trizma base’ ile hazırlanıp pH’ları HCl ile ayarlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

A) Alt tank tamponu (63 mM Tris, 0,05 N HCl, pH 7,5)

Tris.....22,7 g  
 1 N HCl.....150 ml  
 H<sub>2</sub>O.....3 l’ ye tamamlanmıştır.

B) Üst tank tamponu (37,6 mM Tris, 40mM glisin, pH 8,9)

Tris.....4,56 g  
 Glisin.....3 g  
 H<sub>2</sub>O.....1 l’ ye tamamlanmıştır.

C) 4 X ayırma jeli tamponu (947 mM Tris, 0,289 N HCL, pH 8,5)

Tris.....11,47 g  
 1 N HCl.....28,92 ml  
 H<sub>2</sub>O.....100 ml’ ye tamamlanmıştır.

D) 4 X yükleme jeli tamponu (158 mM Tris, 0,256 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,9)

Tris.....1,92 g  
 1 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.....25,6 ml  
 H<sub>2</sub>O.....100 ml’ ye tamamlanmıştır.

E) Ayırma jeli için monomer çözeltisi (%40 T, %5 C<sub>bis</sub>)

Akrilamid.....38 g  
 Bis.....2 g  
 H<sub>2</sub>O.....100 ml’ ye tamamlanmıştır.

F) Yükleme jeli için monomer çözeltisi (%6,25 T, %20 C<sub>bis</sub>)

Akrilamid.....5 g

Bis.....1,25 g

H<sub>2</sub>O.....100 ml' ye tamamlanmıştır.

G) Polimerizasyon başlatıcı (%0,06 AP, %0,002 riboflavin fosfat)

%10 AP.....0,6 ml

%0,02 Riboflavin fosfat.....10 ml

H<sub>2</sub>O.....100 ml' ye tamamlanmıştır.

H) Sükroz – boya çözeltisi [%50 sukroz, %0,1 bromofenol mavisi(bromophenol blue)]

Sükroz.....5 g

%1 Bromofenol mavisi.....1 ml

H<sub>2</sub>O.....100 ml' ye tamamlanmıştır.

Ayrırma jeli hazırlanırken, monomer (akrilamid) ve çapraz bağlayıcı (bisakrilamid) yüzdelerinden hesaplanan %T ve %C<sub>bis</sub> oranları göz önünde bulundurularak monomer, tampon, TEMED ve deiyonize su 50 ml' lik erlende karıştırılmıştır. Polimerizasyon başlatıcı (G çözeltisi) eklenip hafifçe çalkalanmıştır ve elektroforez aletinin jel dökme aparatına, çeşitli kalınlık ve boyutta hazırlanabilmesine olanak sağlayan, iki cam (jel kaseti) arasına Pasteur pipeti yardımı ile dökülmüştür. Jelin yüzeyini düzgülendirmek için bütanol çözeltisi kullanılmıştır. Polimerizasyondan sonra bütanol çözeltisi dökülerek jel, birkaç kez distile su ile yıkanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Yükleme jeli hazırlanırken, monomer, tampon ve TEMED bir erlende karıştırılmıştır ve polimerizasyon başlatıcı eklenmiştir. Ayrırma jelinin üzerine 0,3 ml olacak şekilde yükleme jeli eklenmiştir. Örnek uygulama kuyucuklarının oluşumunu sağlayan tarak, hava boşluğu kalmayacak şekilde, yükleme jelinin içine yerleştirilmiştir. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarılmıştır. 10 hacim örnek ile 1 hacim sükroz – boya çözeltisi karıştırılmıştır.



Örnekler ve standart karışım her bir kuyucukta 15 – 100 µg protein olacak şekilde mikro pipet yardımı ile jel yüzeyine uygulanmıştır. Jel kasetleri tanka yerleştirilmiştir ve jel kasetlerinin altta kalan kısmına 2,5 l alt tank tamponu eklenmiştir. Jel kasetlerinin bulunduğu üst bölme ise üst tank tamponu ile doldurulmuştur. Anot ve katot bağlantıları takılmıştır ve sistem çalıştırılmıştır. İzleme boyası bromofenol mavisinden kaynaklanan mavi bant, jelin altına 0,5 cm kalana kadar yürüdükten sonra işlem durdurulmuştur. Saptama yöntemleri kullanılarak analiz tamamlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Deneysel çalışmamızda SOD aktivitesinin belirlenmesi Beauchamp ve Fridovich (1971) metoduna göre yapılmıştır. Yürütme işlemi 200 V, 80 mA' da 2 saat yapılmıştır. Proteinleri yürüttüğümüz %10' luk jeli, içerisinde 10 mg NBT, 1 mg EDTA ve 2 mg riboflavin olan 50 mM Tris – HCl (pH:8,0) tamponunda karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jel beyaz ışıkla incelendiğinde mavi – menekşe zemin içerisinde SOD aktivitesi gösteren bantlar şeffaf olarak gözlenmiştir (Beauchamp ve Fridovic, 1971).

Böbrek dokusundaki CAT aktivitesinin belirlenmesi Woodbury ve arkadaşlarının (1971) metoduna göre yapılmıştır. Yürütme işlemi 170 V, 80 mA' da 1 saat yapılmıştır. Proteini yürüttüğümüz %8' lik jel, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda 10 dakika bekletilip yıkandıktan sonra %1' lik potasyum ferik siyanid ve %1' lik ferik kloridden oluşan reaksiyon karışımına konup, jel boyanana kadar beklenmiştir. Koyu yeşil zeminde CAT aktivitesi gösteren protein bantları beyaz renkte boyanmıştır (Woodbury, vd., 1971).

Bütün deney gruplarına ait hayvanların böbrek dokularındaki SOD ve CAT enzim aktiviteleri sonucu jelde ortaya çıkan bantlar Kodak Gel Logic 1500 Imaging System Jel görüntüleme sisteminde Kodak Molecular Imaging Software paket rogramı kullanılarak fotoğraf çekimi yapılmıştır. Jel üzerinde enzim aktiviteleri sonucu oluşan bölgelerin alanları karşılaştırma yapılabilmesi için sayısal olarak ölçülmüştür.

### **3.5.3. İstatistiksel değerlendirmeler**

Deneysel çalışmamızın sonunda elde ettiğimiz verilerin değerlendirilmesi “SPSS 20 for Windows” paket programı kullanılarak yapılmıştır. Biyokimyasal analizi yapılan

URE, CRE ölçümlerinden elde edilen veriler arasındaki farklılık One Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ile değerlendirilmiştir, gruplar arası karşılaştırmalarda Tukey testi kullanılmıştır. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar,  $p < 0.05$  olduğunda anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Bulgular

Sıçanlara ait biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlar, aşağıda verilmiştir.

#### 4.1.1. Biyokimyasal analizler

##### 4.1.1.1. Serum örneklerinde biyokimyasal analizler

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

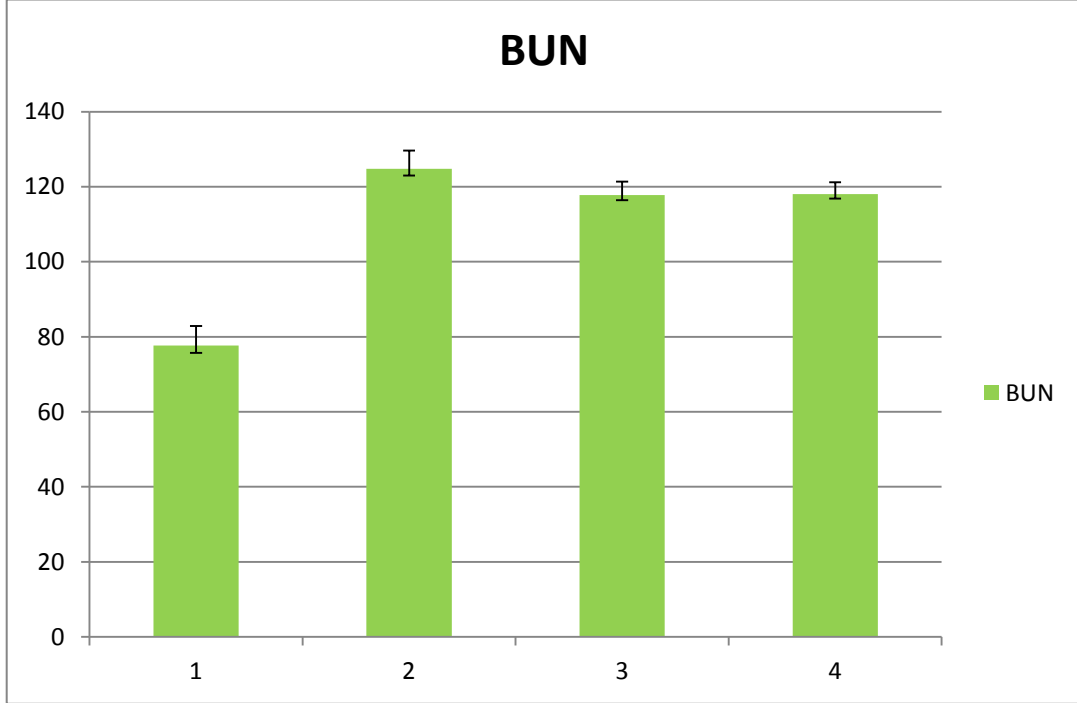
Çizelge 4.1 Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen BUN ve CRE miktarlarının Ortalama değerleri  $\pm$  Standart hata değerleri (n=7).

GRUPLAR	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)
I	77,6714 $\pm$ 5,1970	0,5000 $\pm$ 0,0577
II	124,8143 $\pm$ 4,8247 <sup>a</sup>	1,1143 $\pm$ 0,1574 <sup>a</sup>
III	117,8000 $\pm$ 3,5754 <sup>ab</sup>	0,7000 $\pm$ 0,1000 <sup>ab</sup>
IV	118,0143 $\pm$ 3,1814 <sup>ab</sup>	0,9571 $\pm$ 0,0787 <sup>ab</sup>

p<0.05 **a**: Grup I' den **b**: Grup II' den anlamlı fark vardır.

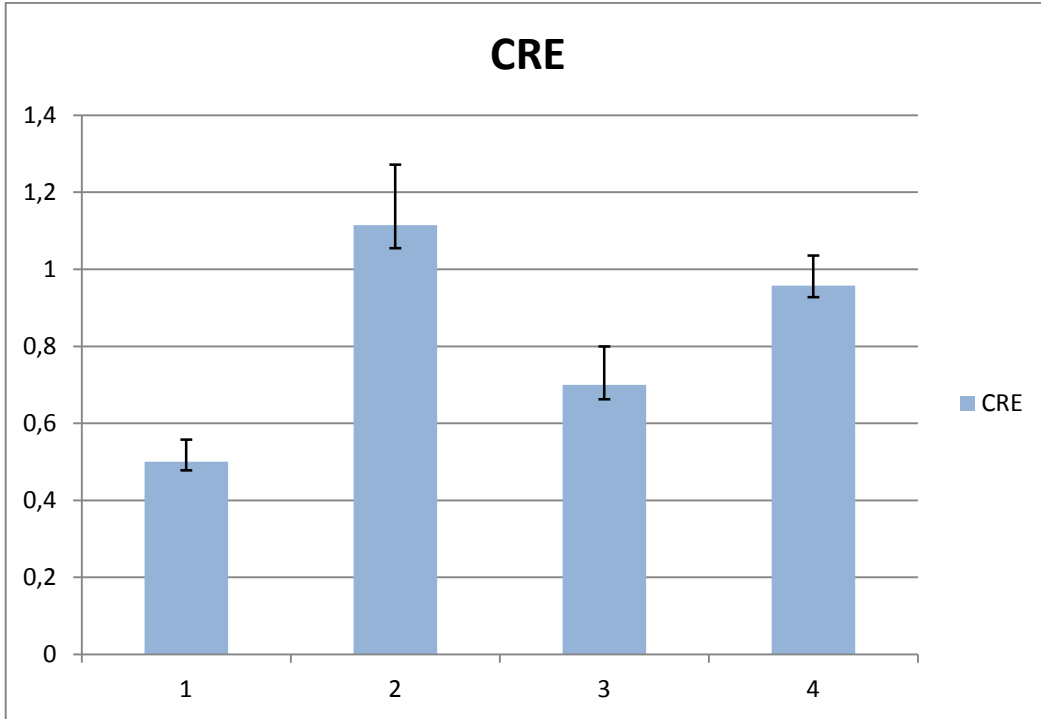
Buna göre; serum BUN değerleri ele alındığında Grup I ile Grup II karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel (p<0.05) olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Grup I ile Grup III karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel (p<0.05) olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Grup I ile Grup IV karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel (p<0.05) olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel (p<0.05) olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Grup II ile Grup IV

karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel ( $p<0.05$ ) olarak anlamlı bir fark olduğu görülürken, Grup III ile Grup IV arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.1.).



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

Serum CRE değerleri ele alındığında Grup I ile Grup II karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel ( $p<0.05$ ) olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Grup I ile Grup III karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel ( $p<0.05$ ) olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Grup I ile Grup IV karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel ( $p<0.05$ ) olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel ( $p<0.05$ ) olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Grup II ile Grup IV karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel ( $p<0.05$ ) olarak anlamlı bir fark olduğu görülürken, Grup III ile Grup IV arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.2.).



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

#### 4.1.1.2. Böbrek doku örneklerinde elektroforetik analizler

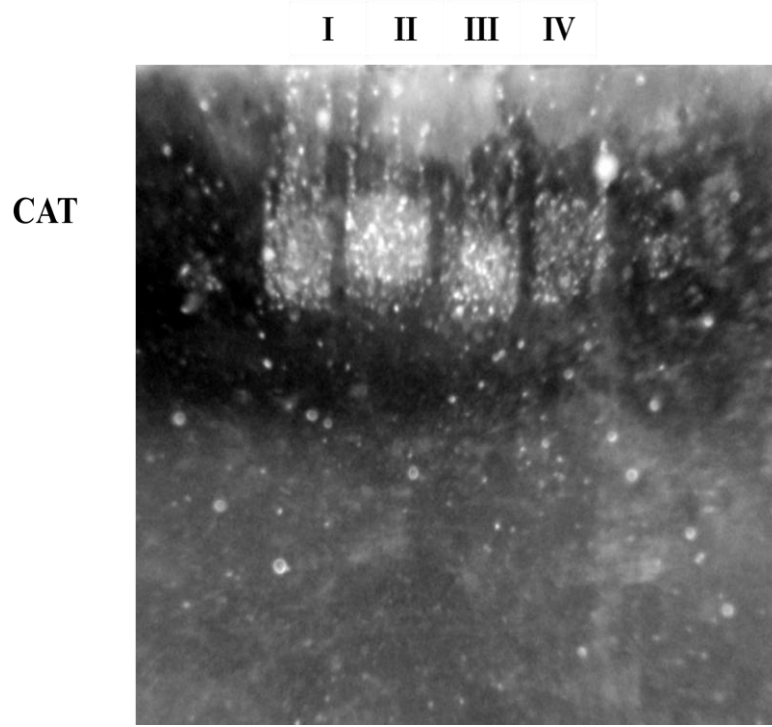
Bütün deney gruplarına ait böbrek doku örneklerinde Doğal (Native) Jel Elektroforez tekniği ile belirlenen SOD ve CAT enzim aktiviteleri sonucu jel üzerinde ortaya çıkan alanlar görüntülenmiştir ve alanların sayısal değerleri ölçülmüştür (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Deney gruplarına ait hayvanların böbrek doku örneklerinde belirlenen CAT ve SOD aktivitelerinin bant alanları

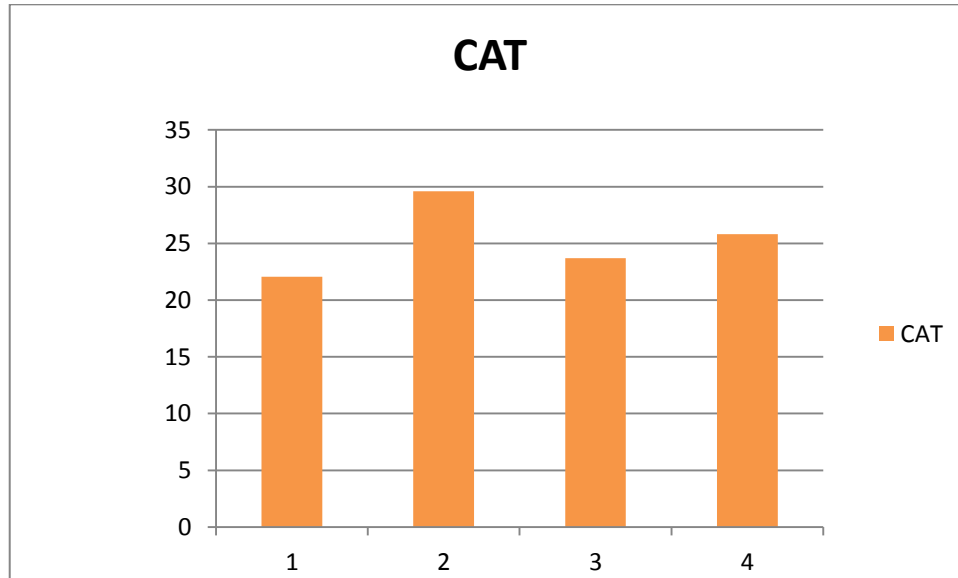
GRUPLAR	CAT (mm <sup>2</sup> )	SOD (mm <sup>2</sup> )	
		1	2
<b>I</b>	22,0651	7,7240	8,6843
<b>II</b>	29,5795	9,1713	10,7190
<b>III</b>	23,6955	8,2970	9,5454
<b>IV</b>	25,8255	8,4242	9,6171

CAT enziminin elektroforetik analiz sonuçlarında tüm gruplarda tek bant görülmüştür. Grup I' e ait böbrek dokusunda bant alanı değeri en düşükken, Grup II' deki bant alanı değeri en yüksek bulunmuştur. Grup III' deki bant alanı değeri Grup I' e daha

yakınken, Grup IV' deki değer Grup III' teki değere daha yakın bulunmuştur (Şekil 4.3; Şekil 4.4.).

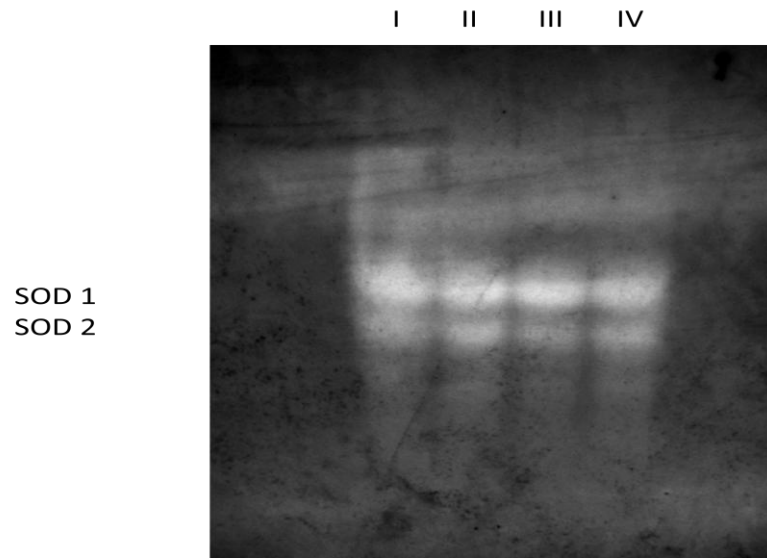


Şekil 4.3 Grup I, II, III ve IV' e ait CAT izoenziminin elektroforetik bandları

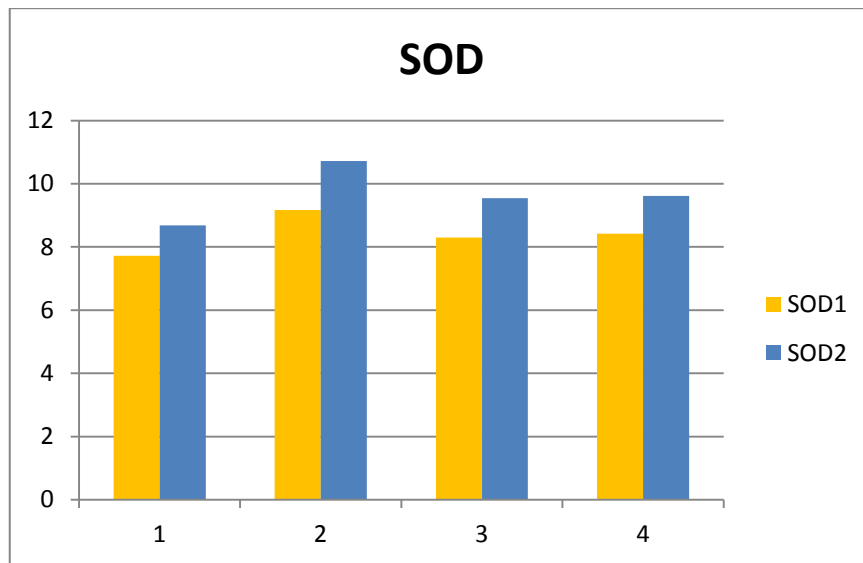


Şekil 4.4 Grup I, II, III ve IV' e ait böbrek doku örneklerinde belirlenen CAT enzim aktivitesi sonucu oluşan bandların ortalama değerleri (mm<sup>2</sup>)

Böbrek dokusunda SOD enziminin jel üzerinde iki izoformu görülmüştür. SOD1 izoformu Grup I' de en düşük alan görülürken, Grup II' de en yüksek değer görülmüştür. Grup III ve Grup IV' ün bant alan değerleri Grup I ve Grup II' nin arasında bir değere sahip olduğu, doz artığında alanın da arttığı görülmüştür. SOD2 izoformunda da Grup I' de en düşük alan görülürken, Grup II' de en yüksek alan değeri görülmüştür. Grup III ve Grup IV' ün bant alan değerleri yine Grup I ve Grup II' nin arasında bir değerde olduğu ve doz arttıkça alanın da arttığı görülmüştür (Şekil 4.5; Şekil 4.6.).



Şekil 4.5 Grup I, II, III ve IV' e ait SOD izoenziminin elektroforetik bandları



Şekil 4.6 Grup I, II, III ve IV' e ait böbrek doku örneklerinde belirlenen SOD enzim aktivitesi sonucu oluşan bantların ortalama değerleri (mm<sup>2</sup>)

#### 4.1.2. Böbrek doku örneklerinin histolojik analizleri

Deneysel çalışmamızda böbrek iskemi – reperfüzyon hasarına karşı geraniolün doza bağlı olarak koruyucu etkisi H&E ile boyanan böbrek dokularında detaylı olarak incelenmiştir.

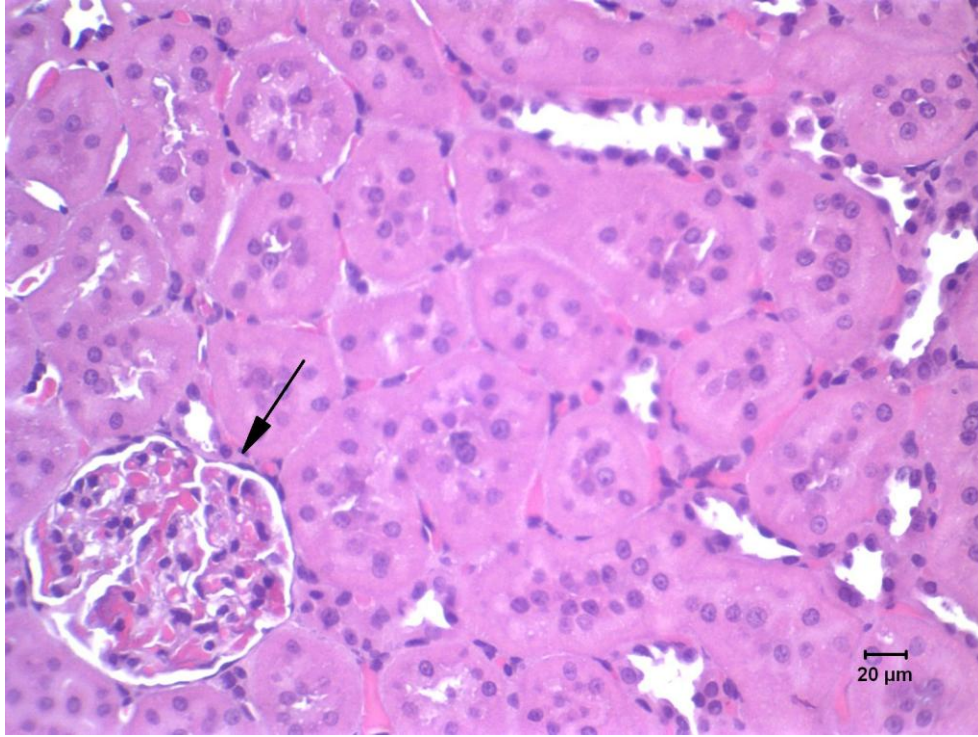
Bu sonuçlara göre; Sham grubu olan Grup I hayvanlarının H&E uygulanmış böbrek kesitleri incelendiğinde glomerül yapısının, Bowman kapsülü ile Bowman kapsül aralığının (Şekil 4.7) ve tübüllerin normal yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).

Grup II' ye (SF verilen grup) ait hayvanların böbrek kesitleri incelendiğinde; glomerullarda kanamanın yaygın olduğu (Şekil 4.9) ve tübüller yapısının korunmadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda tübül hücrelerinde şişme, buna bağlı olarak da tübüller içinde sıvı birikimi ve hücre döküntülerinin neden olduğu tübüller deformasyon görülmüştür (Şekil 4.10). Bowman kapsülünün yapısının da korunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

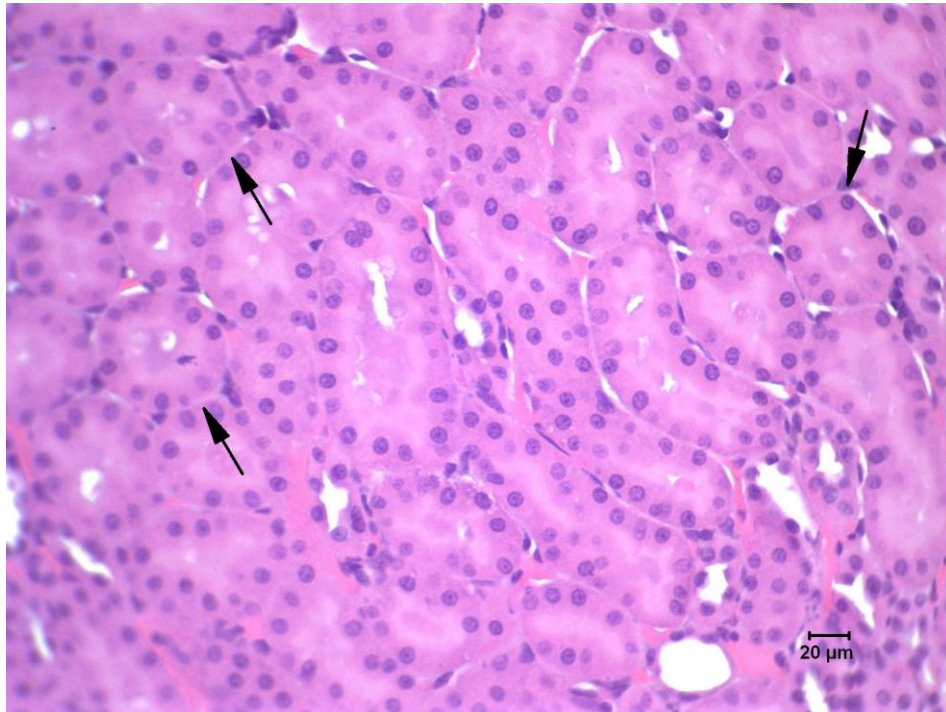
50 mg/kg geraniol verilen Grup III hayvanlarının böbrek kesitlerinde yapılan incelemeye göre İ/R hasarından büyük ölçüde koruduğu tespit edilmiştir. Buna göre; Bowman kapsülünün yapısını koruduğu (Şekil 4.12) ve Grup I' e yakın olduğu, tübül hücre hasarlarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak tübüller içinde sıvı birikimi ve hücre döküntülerinin daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.13).

100 mg/kg geraniol verilen Grup IV hayvanlarının böbrek kesitleri incelendiğinde; böbrek dokularında belli bir koruma, tübüller içi sıvı birikimin ve kanama görülen bölgelerin daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Buna bağlı olarak tübül hücre hasarının daha az olduğu görülmüştür. Bowman kapsülünün kısmen korunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

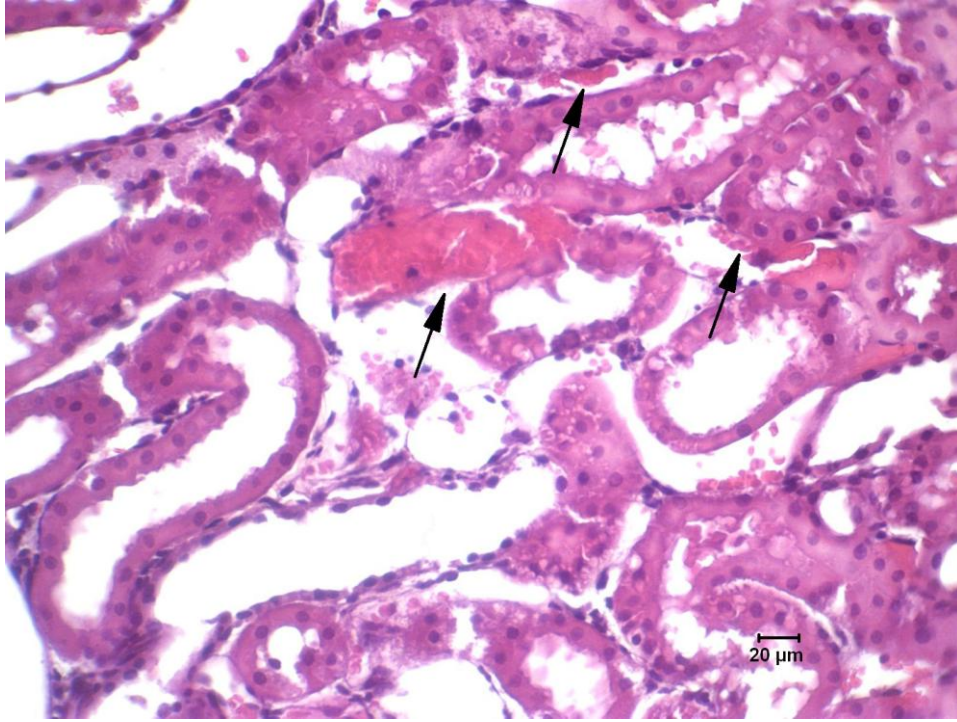




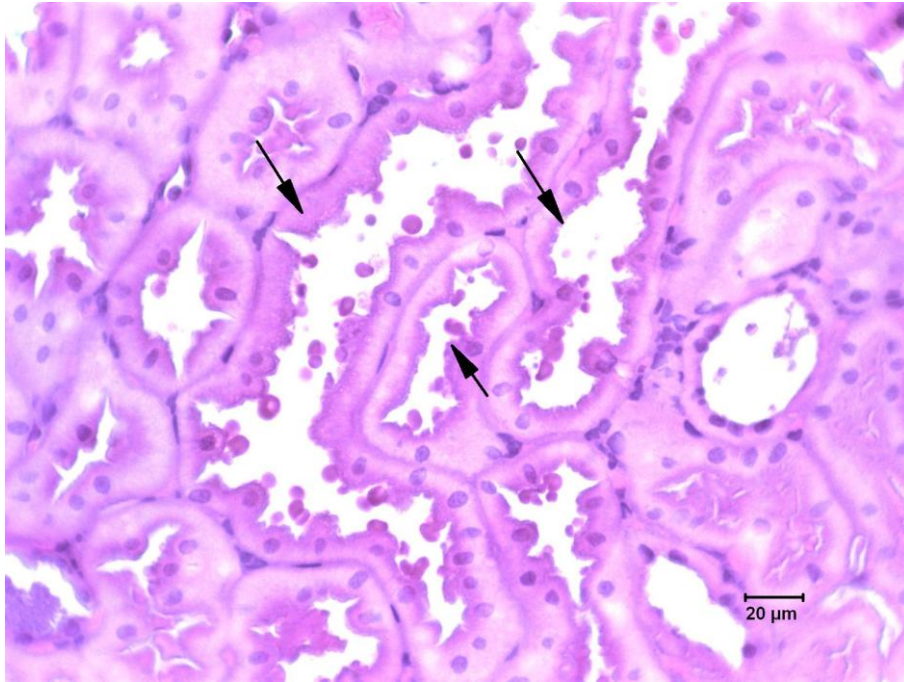
Şekil 4.7 Grup I' e ait böbrek doku kesitlerinde normal görünümlü glomerul yapıları, bowman kapsülü ve aralığı (↗ ) (H&E)



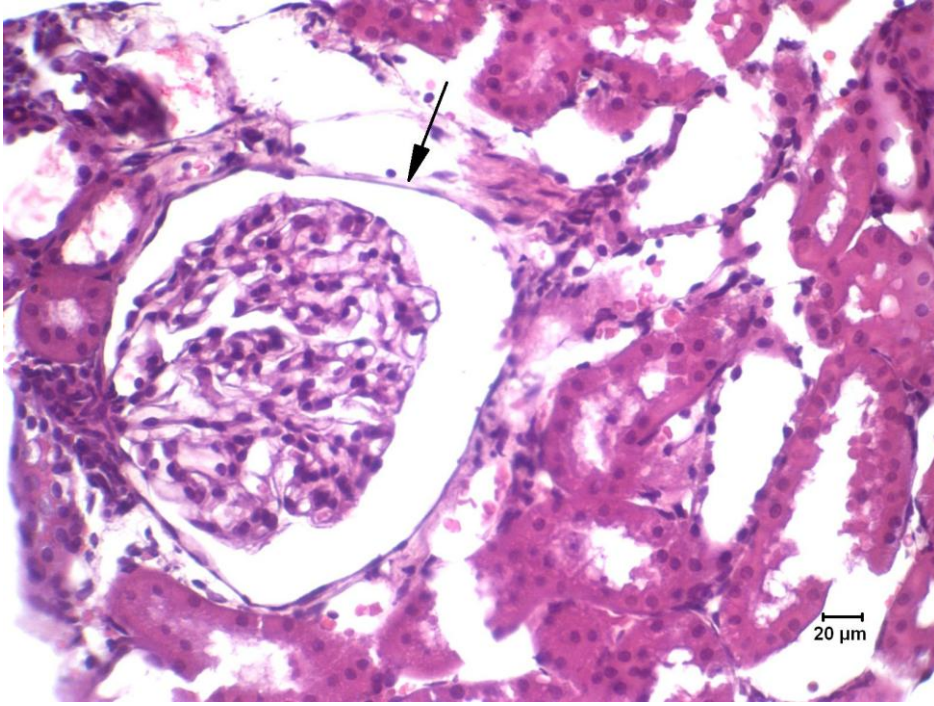
Şekil 4.8 Grup I' e ait böbrek doku kesitlerinde normal görünümlü tübüller (↗ ) (H&E)



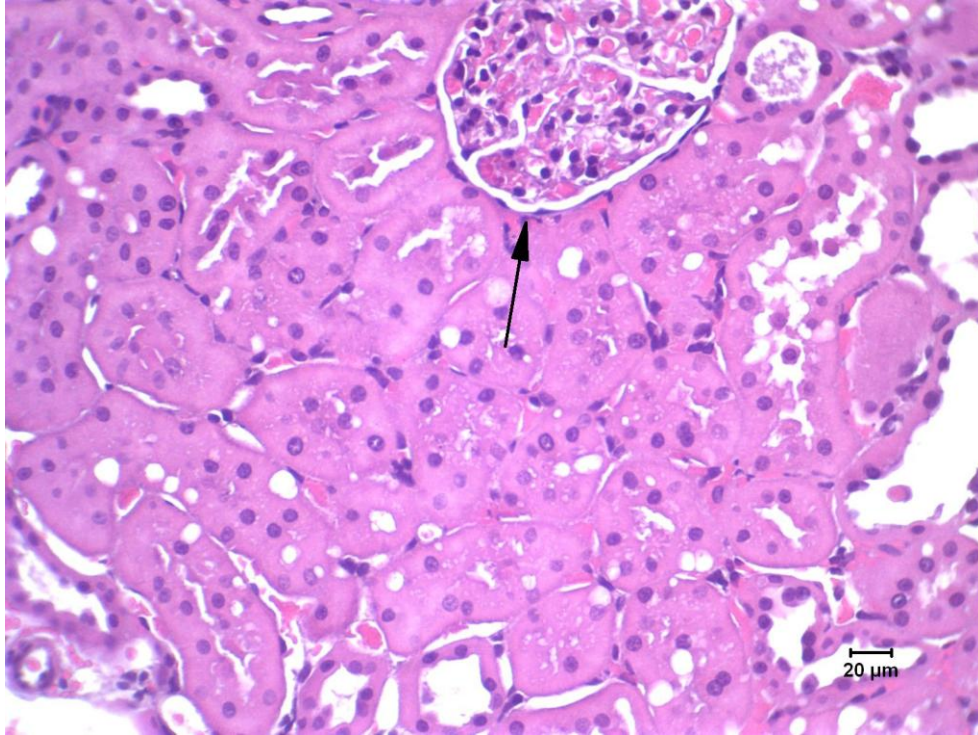
Şekil 4.9 Grup II' e ait yaygın kanama alanları ( ↗ ) (H&E)



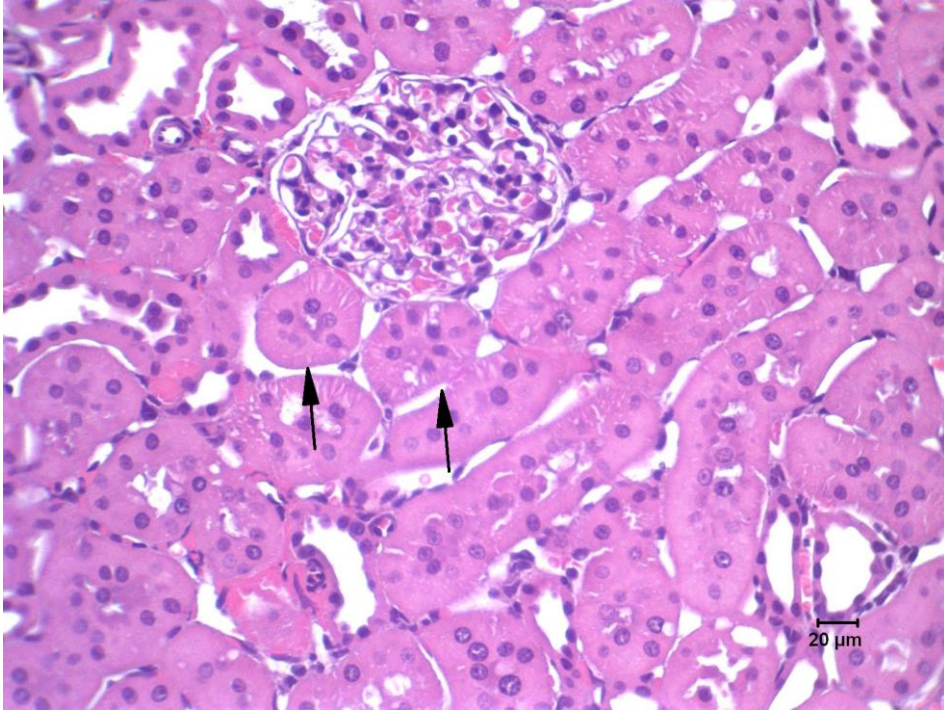
Şekil 4.10 Grup II' ye ait böbrek doku kesitlerinde tübüller içerisinde sıvı birikimi ve hücre döküntüleri ( ↗ ) (H&E).



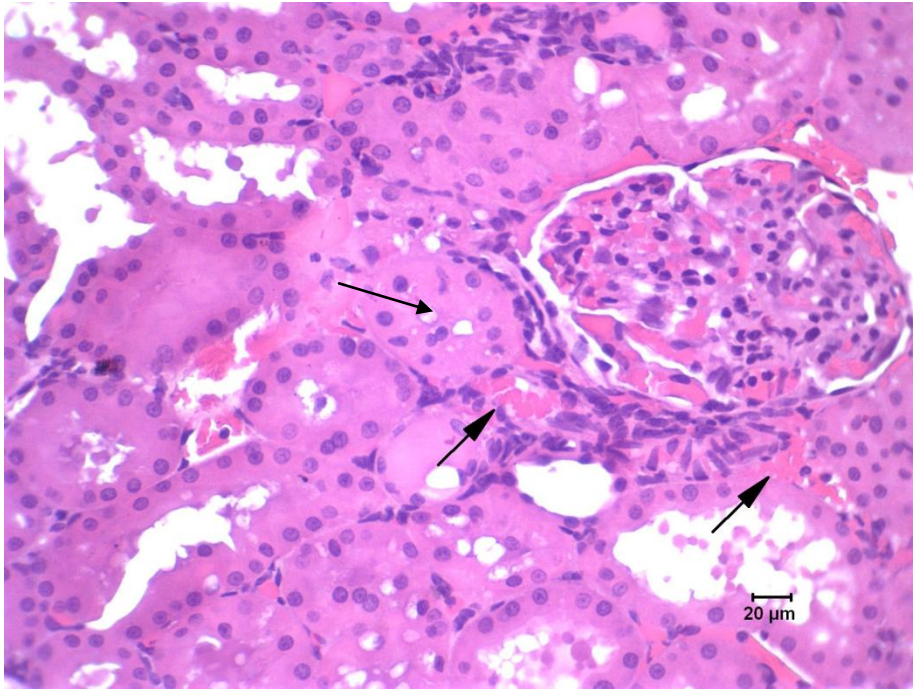
Şekil 4.11 Grup II' e ait bozulmuş glomerüler yapı ( ↗ ) (H&E)



Şekil 4.12 Grup III' e ait korunmuş glomerüler yapı ( ↗ ) (H&E)



Şekil 4.13 Grup III' e ait büyük ölçüde korunmuş tübüller (↗ ) ve glomerüler yapı (H&E)



Şekil 4.14 Grup IV' e ait kısmen korunmuş tübüller yapı(↘), glomerüler yapı ve kanama (↗ ) (H&E)

## 4.2. Tartışma

Doku ve organlara çeşitli nedenlerden dolayı kan gitmemesi sonucu besin ve oksijen yokluğuna neden olmaktadır. Oluşan bu duruma iskemi denilmektedir ve hücre içinde kalsiyum iyonlarının artmasına, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin azalmasına ve hücre fonksiyonlarının bozulması sonucu hücrenin parçalanmasına kadar giden bir süreçtir (McCord, 1985; Andreoli, 1991; Baud ve Ardaillou, 1993; Oral, vd., 2015). İskemik alana kan akımının tekrar verilmesine reperfüzyon denilmektedir. İskemi sürecinde meydana gelen hasarlar, reperfüzyonla birlikte daha da ağırlaşmaktadır (Oral, vd., 2015).

Oksijen ihtiyacının artmasıyla birlikte hücre içinde laktik asit, hipoksantin ve lipit peroksidaz gibi metabolitlerin biriktiğini ve ATP miktarının düştüğü gösterilmiştir (Chien, vd., 2001; Chiang-Ting, vd., 2005; De Groot ve Rauen, 2007). İskemik durumda ortaya çıkan bu sorunlar, düzeltilmediği takdirde hücrelerin ölümüyle sonlanmaktadır. Reperfüzyon sonrası kanın oksijensiz kalmış dokuya girmesiyle adenozin, NO ve SOR' un salınmasına neden olmaktadır (Yellon ve Downey, 2003; Gross ve Auchampach, 2007).

Serbest radikaller normal şartlarda hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı olarak oluşabilen son derece reaktif, kararsız moleküllerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden meydana gelen serbest oksijen radikaller türleridir (Seifried, vd., 2007). Serbest oksijen radikalleri oksijen tüketiminin olduğu tepkimelerde oluşmaktadır. Başlıca serbest oksijen radikalleri süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikalidir ( $OH^-$ ) (Fujii, vd., 2005).

Organizmada normal şartlarda oluşan ve son derece reaktif, kararsız molekül olan serbest oksijen radikallerin oluşması ve bunların antioksidan sistemler tarafından yok edilmesi dengeli bir şekilde olmaktadır. Bu denge bozulmadığı sürece serbest oksijen radikallerinden doku ve organlar zarar görmemektedir. Başta oksidatif stres ve çeşitli nedenlerle denge serbest oksijen radikalleri tarafına doğru bozulmaktadır (Al-Gubory, vd., 2010).

Doğal ve dengeli beslenme sonucunda alınan antidoksidanlar; serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonlarını engelleyen, onları yakalayan ve stabilize edebilen moleküllerdir. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek ve zincir kıran mekanizmalarda aktif rol alarak insan sağlığının korunmasında başlıca rol oynamaktadır (Kasnak and Palamutoğlu, 2015). Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan olarak iki şekilde ayrılmaktadır (Akkuş, 1995; Gök, vd., 2006).

Deneysel çalışmamızda kullanılan kapalı formülü  $C_{10}H_{18}O$  olan geraniol (2,6-dimetiltrans-2,6-oktadien-8-ol ya da 3,7-dimetilokta-trans-2,6-dien-1-ol) asiklik bir monoterpen alkoldür (Chen and Viljoen, 2010; Madankumar, vd., 2013). Geraniol, yapılan araştırmalar sonucu serbest radikallere karşı belirgin bir şekilde süpürücü etkisi olduğu görülmektedir (Choi, vd., 2000).

İskemi reperfüzyon hasarının etkilerini deneysel olarak görebilmek için belli bir iskemi ve reperfüzyon süresine ihtiyaç vardır. Rat böbreğinde yapılan deneylerin bazılarında 45 dakika, bazılarında 60 dakika iskemi süresinden sonra reperfüzyon hasarı gözlenmiştir. Literatürde, böbrek iskemi reperfüzyon hasarının, serum analizlerinde ve doku örneklerinde en erken 4 saatte ortaya çıktığı, tepe noktasına 24 saatte ulaştığı bildirilmiştir (Paller, vd., 1984). Deneysel çalışmada iskemi reperfüzyon hasarının erken evredeki etkilerini görmek istediğimiz için 45 dakikalık iskemi ve 4 saatlik reperfüzyon süresini literatüre uygun olarak seçilmiştir.

Protein metabolizmasının yıkım ürünü olan amonyağın, zehir etkisi giderilmiş üreye dönüşmesiyle oluşan üre; suda çözünmekte ve böbreklerle dışarı atılmaktadır. Laboratuvar sonuçlarında, üre yerine kandaki ürenin azot miktarını ifade etmekte olan BUN değeri kullanılmaktadır. Buda toplam ürenin yaklaşık %46'sına denk gelmektedir. BUN değerinin artması, böbrek fonksiyonlarının bozulduğuna dair bir göstergedir. BUN değerini, kreatininle birlikte değerlendirilmesi tek başına değerlendirilmesinden daha doğru sonuç vermektedir. Kreatinin (CRE), iskelet kaslarındaki kreatinin su kaybetmesi ile meydana gelmektedir (Duman ve Erden, 2004).

Deneysel çalışmada doğal bir antioksidan olan geraniolün kısa süreli iskemi reperfüzyon hasarına karşı etkisi, histolojik ve biyokimyasal olarak elde edilen bulgularlar değerlendirilmiştir.

Deneysel çalışmada iskemi reperfüzyon hasarı sonrasında serum BUN ve CRE düzeyleri incelendiğinde Grup I (Sham Grubu)' e oranla diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derece yükselme gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Grup I (Sham Grubu) ve Grup II (SF + İ/R) arasında görülen anlamlı farkın iskemi reperfüzyon işleminin amacına uygun şekilde böbreği olumsuz etkilediğini düşündürmüştür. BUN ve CRE değerleri Grup III (50mg/kg geraniol) ve Grup IV (100 mg/kg geraniol)' un Grup II (SF + İ/R)' ye göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olması geraniolün koruyucu etki gösterdiğini düşündürmüştür.

Bu sonuçlar doğrultusunda 45 dakika iskemi ve 4 saat reperfüzyon sürecinin böbrek fonksiyonlarını belirgin bir şekilde bozduğu, ancak böbrek canlılığını kritik olarak etkilemediği düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada iskemi süresi uzadıkça (90 dk) böbrek canlılığının geri dönüşümsüz olarak bozulduğunu ortaya konmuştur. Çalışmada 60 ve 90 dk iskemi sonrası 7. günde alınan biyopsi örnekleri karşılaştırılmış ve iskemi süresinin artışına paralel olarak böbrek dokusunun ve özellikle tübüllerin onarılamaz derecede hasara uğradığı gösterilmiştir (Onal ve ark, 2004). Korkmaz ve Kolankaya (2009), çalışmalarında tek nefrektomi sonucunda serum CRE, BUN seviyeleri ile oksidatif stres ve histolojik parametrelerin nefrektomi olmamış sıçanların parametreleriyle karşılaştırmışlar ve değerlerin değişmediğini rapor etmişlerdir. Diğer yandan 45 dakika iskemi 3 saat reperfüzyon yapılan sıçanlarda oksidatif stres ve histolojik özelliklerin değiştiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde İ/R sonrasında serum üre miktarındaki artışın akut böbrek yetmezliğine sebep olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Roncal, vd., 2007).

Cebeci, 2007 yılında yapmış olduğu çalışmada; 45 dakika iskemi ve 4 saat reperfüzyon işlemi gerçekleştirerek, sildenafil sitrat maddesinin erken dönemde iskemi reperfüzyon hasarına karşı etkisini incelemiştir (Cebeci, 2007).

Williams ve ark., iki taraflı renal arter ve veni klempleyerek oluşturdukları iskemi modelinde iskemi süresini 45 dakika da sabitleyip, reperfüzyondan sonraki 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 9, 24. saatlerde ve 1 hafta sonra İ/R hasarının serum BUN ve CRE düzeyleri ile böbrek

histolojisine etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmalar sonucunda renal hasarın 45 dakikalık iskemiye takiben en erken 4. saatte başladığını ve hasarın 24. saatte en üst seviyede etki yaptığını göstermiştir (Williams, vd., 1997).

Canlı dokularda bulunan CAT, SOD çok önemli antioksidan savunma mekanizmalarıdır. CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin detoksifikasyonundan sorumlu iken SOD, O<sup>2-</sup> radikalini katalizler, aksi durumda biyolojik yapı ve membranları hasar görür. Tüm bunlar hücre sel hasarın şekillenmesinde önemli rol oynar. Bu enzimlerin aktivitesinin azalması yüksek reaktif serbest radikallerin toplanmasıyla ilgilidir. Bu enzimelerin azalması serbest radikallerinin artmasına neden olur ve sonuçta hücre membranlarının fonksiyonları ve bütünlüğü kaybolur. Bu izoenzim formları düzenli hücre metabolizmasının kontrolünde oldukça önemlidir (Kim, vd., 2005). Ancak oksidatif stres esnasında bu antioksidan enzim izofromlarının gen ekspresyonu ile ilgili çalışmaların ortaya konması oldukça önemlidir.

Rasoulıan ve arkadaşları (2008), yaptıkları çalışmada erkek wistar sıçanlarda renal İ/R (40 dk/24 saat) sonrası İ/R grubunda CAT, SOD seviyelerinde önemli artma kaydetmişlerdir. Benzer bir çalışmada Kapan ve arkadaşları (2009), aortik İ/R sonrası iskemi grubunda SOD, CAT aktivitelerinde anlamlı derecede yükselme bulmuşlardır. Bu çalışmalara bakıldığında İ/R sonrası artan enzim aktivitesinin oksidatif stresle ilişkilendirildiği vurgulanmaktadır. Bu sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermektedir. Diğer yandan İ/R sonucunda antioksidan enzimlerin düştüğünü gösteren çalışmalar da mevcuttur (Singh, vd., 2005; Chander, vd., 2006). Çalışmamızda da iskemi sonrası antioksidan enzim aktivitesi önemli derecede artma göstermiştir. Yapılan alışmalar arasındaki farklılıkların büyük olasılıkla metod, tür ve iskemi modellerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabileceğini söyleyebiliriz.

Güneş, 2010 yılında yapmış olduğu deneysel araştırmada; ratlara hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vererek oksidatif stres oluşumuna neden olmuş ve geraniol ile geraniol tarafından sentezlenmiş geraniol ksantat maddelerini vererek, eser elementler üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bu deneysel çalışmasında; geraniol ve geraniol ksantat maddesi verilmiş dokularda hidrojen peroksitin zararlı etkisini azalttığı, eser elementler üzerinde de (Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup>) olumlu etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir.



Bir monoterpen olan geraniolün kanser hücreleri üzerindeki etkilerini *in vivo* ve *in vitro* olarak antitümör özelliği araştırılmış, etkileri gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar monoterpenlerin doğrudan veya dolaylı olarak kullanılarak antikanserojen etkisi olduğu gösterilmiştir (Güneş, 2010).

Ceyhan ve ark' larının (2013) parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenarasyonunda geraniolün koruyucu etkisini NF-κB yolağı üzerinden 24. ve 48. saatlerde incelemeleri sonucunda, 48. saatte hasarın daha az olduğunu gözlemlemiştirlerdir. Elde edilen veriler sonrasında intraperitoneal olarak verilen geraniolün karaciğeri koruduğu ve karaciğer rejenarasyon oranını arttırma da geraniolün önemli bir rolü olduğunu gözlemlemiştirlerdir.

Başka bir çalışmada da; Can ve Canbek' in (2014) sıçanlarda uzun süreli renal iskemi/reperfüzyon hasarında geraniolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. İntraperitoneal olarak 50mg/kg ve 100mg/kg dozlarda verilen geraniolün 60dk iskemi ve 24 saat reperfüzyon sonucunda; 100mg/kg verilen geraniol dozunun böbrek üzerinde koruyucu etkisi olduğunu gözlemlemiştirlerdir.

Geraniol ile ilgili Ceyhan ve ark' larının (2013), Can ve Canbek' in (2014) yapmış oldukları bu çalışmalar 22. Ulusal Biyoloji Kongresi' nde poster sunumu olarak yayınlanmıştır (<http://ubk2014.ogu.edu.tr/>).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan histolojik incelemelerde (H&E) sham grubu olan Grup I böbrek doku örneklerinde; korteks-medulla, böbrek tübül hücreleri ve glomerüller düzgün yapı göstermektedir. İ/R hasarı oluşturulmuş Grup II'ye ait böbrek örneklerinde ise vakuolizasyon, glomerül boşluğunda genişleme ve kanama, böbrek tübül hücre sıralarında bozulmalar gözlenmiştir.

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

100 mg/kg geraniol verilen Grup IV ise böbrek histolojik incelemelerinde ise genel görünüm normal olmakla birlikte glomerüller boşlukta ve tübüller arasında yer yer kanamalar gözlendi. Bu durumun 50 mg/kg geraniol verilen gruba göre korunmanın daha az olduğunu düşündürmüştür.

Yapılan farklı çalışmalar da İ/R hasarı sonucu oluşan oksidatif strese karşı farklı antioksidanların etkili olduğunu göstermiştir (Canbek vd., 2008; Senturk, vd., 2008; Baykara vd., 2009). Aynı şekilde paralel çalışmalar yapılarak diğer monoterpen türevli maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri araştırılabilir. Ayrıca İ/R hasarı ile oluşturulan oksidatif stres üzerine uygun yolaklar çalışılarak geraniolün serbest radikalleri azaltma etkisi araştırılabilir.

Deneysel çalışmamızda elde ettiğimiz biyokimyasal ve histolojik analiz sonuçlarına göre; böbrek iskemi reperfüzyon hasarından bir saat önce intraperitoneal olarak uygulanan dozlardan, 50 mg/kg dozun daha fazla olmak üzere ikisinin de koruyucu etki gösterdiği söylenebilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abel, R. M., Abbott, W. M., Fischer, J. E, Acute renal failure, 1971, Archives of Surgery, 103 (4) 513 p.
- Akkuş, İ., Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1995, Mimoza Yayınları, Konya, 1 p.
- Aktay, G., vd., Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury, 2000, Journal of Ethnopharmacology, 73 121-129 p.
- Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., Garrel, C., The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes, 2010, The international journal of biochemistry & cell biology, 42 (10) 1634-1650 p.
- Andreoli, S. P., Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease, 1991, Pediatric Nephrology, 5 (6) 733-742 p.
- Ardağ, A., Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması, 2008.
- Aruoma, O. I., Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, 1998, Journal of the American Oil Chemists' Society, 75 (2) 199-212 p.
- Aydoğdu, N., Kaymak, K., Yalçın, Ö., Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri, 2005.
- Baud, L. ,Ardaillou, R., Involvement of reactive oxygen species in kidney damage, 1993, British medical bulletin, 49 (3) 621-629 p.
- Baykara, B., 2006, Karaciğer iskemisi reperfüzyon hasarında karnozin ve melatoninin koruyucu etkileri, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 68 s.
- Beauchamp, C., Fridovic, I., Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, 1971, Anal Biochem 44 276-286 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Birincioğlu, M., İskemi-reperfüzyon tekniklerine genel giriş, [www.ctf.edu.tr/farma/tfd/gaziantepbirincioglu.pdf](http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/gaziantepbirincioglu.pdf), 2012.
- Bullock J, B. J., Wang BM, NMS Physiology 4th edition, 2001, Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania, 289-96 p.
- Burdock, G. A., Fenaroli's handbook of flavor ingredients, 2010, CRC press, 0849330343.
- Burke, Y. D., Stark, M J., Roach, S. L., Sen, S. E., Crowell, P. L., Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol, 1997, Lipids, 32 (2) 151-156 p.
- Carnesecchi, S., vd., Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts, 2004, Cancer letters, 215 (1) 53-59 p.
- Canbek, M., Uyanoglu, M., Bayramoglu, G., Senturk, H., Erkasap, N., Koken, T., Uslu S., Demirüstü C., Aral E. and Hüsnu Can Baser K., 2008, Effects of carvacrol on defects of ischemi-reperfusion in the rat liver, Photomedicine , 15, 447-452.
- Cebeci, O. Ö., Ratlarda Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarının Erken Döneminde Sildenafil Sitratın Etkinliği, 2007, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, 51 p.
- Chander V, Chopra K. Protective Effect of Nitric Oxide Pathway in Resveratrol Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. Arch Med Res. 2006 Jan; 37(1):19-26 p.
- Chen, W., Viljoen, A., Geraniol—A review of a commercially important fragrance material, 2010, South African Journal of Botany, 76 (4) 643-651 p.
- Chiang-Ting, C., Tzu-Ching, C., Ching-Yi, T., Song-Kuen, S., Ming-Kuen, L., Adenovirus-Mediated bcl-2 Gene Transfer Inhibits Renal Ischemia/Reperfusion Induced Tubular Oxidative Stress and Apoptosis, 2005, American journal of transplantation, 5 (6) 1194-1203 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Chien, C.-T., vd., De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion, 2001, Journal of the American Society of Nephrology, 12 (5) 973-982 p.
- Chien, K. R., Abrams, J., Serroni, A., Martin, J. T., Farber, J. L., Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury, 1978, Journal of Biological Chemistry, 253 (13) 4809-4817 p.
- Choi, H.-S., Song, H. S., Ukeda, H., Sawamura, M, Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 2000, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48 (9) 4156-4161 p.
- Commoner, B., Townsend, J., Pake, G. E., Free radicals in biological materials, 1954, Nature, 174 (4432) 689 p.
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., Hastalıkların Patogenez ve Tedavisinde Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidanlar, 1997.
- De Carvalho, C. C., da Fonseca, M. M. R., Biotransformation of terpenes, 2006, Biotechnology advances, 24 (2) 134-142 p.
- Demirsoy, A., Türkan, İ., Gündüz, E., Genel biyoloji, 2004, Palme Yayıncılık, 9757477613.
- De-Oliveira, A. C., F Ribeiro-Pinto, L., Paumgarten, F. JR., In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by  $\beta$ -myrcene and other monoterpenoid compounds, 1997, Toxicology letters, 92 (1) 39-46 p.
- Derviş, E., Oral antioksidanlar, 2011, Dermatöz, 2 263-267 p.
- Devasagayam, T., vd., Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, 2004, Japi, 52 794-804 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Duman, C., Erden, B. F., Birinci basamak sağlık hizmetlerine yönelik biyokimyasal laboratuvar verilerinin kısa yorumu, 2004, Sted, 13 (7) 256 p.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Okada, F., Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system, 2005, Reproductive biology and endocrinology, 3 (1) 43 p.
- Furuta, K., Kakita, A., Takahashi, T., Tomiya, T., Fujiwara, K., Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy, 2000, Hepatology Research, 17 223-236 p.
- Gelman, S., The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping, 1995, Anesthesiology, 82 (4) 1026-1057 p.
- Gomberg, M., An Instance Of Trivalent Carbon: Triphenylmethyl, 1900, Journal of the American chemical Society, 22 (11) 757-771 p.
- Gomberg, M., Organic Radicals, 1924, Chemical Reviews, 1 (1) 91-141 p.
- Gomberg, M., Radicals in chemistry, past and present, 1928, Industrial & Engineering Chemistry, 20 (2) 159-164 p.
- Gomberg, M., The Existence of Free Radicals, 1914, Industrial & Engineering Chemistry, 6 (4) 339-343 p.
- Gök, V., Kayacı, A., Telli, R., Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar, 2006, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2 35-40 p.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., Algal antioksidanlar, 2006, EÜ Su Ürünleri Dergisi, (23) 85-89 p.
- Grace, P., Ischaemia-reperfusion injury, 1994, British Journal of Surgery, 81 (5) 637-647 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Green, C., vd., The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys, 1989, *Free Radical Research*, 7 (3-6) 255-264 p.
- Gross, G. J., Auchampach, J. A., Reperfusion injury: does it exist?, 2007, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42 (1) 12-18 p.
- Guyton, A. C., The kidneys and body fluids in: *Textbook of Medical Physiology*, 1991, WB Saunders Company, Philadelphia, 273-353 p.
- Güneş, M., Oksidatif strese maruz kalan ratlarda geraniol ve geraniol ksantat maddelerinin bazı metaller üzerine etkileri. Doktora Tezi, 2010, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 102 p.
- Hamiza, O. O., Hasan, S. K., Sultana, S., Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced oxidative 2 stress and inflammation in mouse skin: Possible role of p38 MAP Kinase and NF- $\kappa$ B, 2013, p.
- Harman, D., Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, 1955, University of California Radiation Laboratory.
- Homer-Vanniasinkam, S., Crinnion, JN., Gough, MJ., Post-ischaemic organ dysfunction: a review, 1997, *European journal of vascular and endovascular surgery*, 14 (3) 195-203 p.
- Hylemon, P., Harder, J., Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems, 1998, *FEMS microbiology reviews*, 22 (5) 475-488 p.
- Ihde, A. J., The history of free radicals and Moses Gomberg's contributions, 1967, *Pure and Applied Chemistry*, 15 (1) 1-14 p.
- Iijima, Y., Gang, D. R., Fridman, E., Lewinsohn, E., Pichersky, E., Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil, 2004, *Plant physiology*, 134 (1) 370-379 p

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Jennings, R. B., Reimer, K. A., The cell biology of acute myocardial ischemia, 1991, Annual review of medicine, 42 (1) 225-246 p.
- Ji, Si, M-S., Podnos, Y., Imagawa, D. K., Monoterpene geraniol prevents acute allograft rejection, 2002, Elsevier, 34 (5) 1418-1419 p.
- Kapan Ş., Kiriş İ., Kilbaş A., Altuntaş İ., Karahan N., Okutan H, Eritropoietinin sıçan aortik iskemi-reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi. Turkish J Thorac Cardiovasc Surg, 17:110-116, 2009.
- Karabiga, M., Kiriş, İ., Yılmaz, N., Altuntaş, İ., Karahan, N., Okutan, H., 2007, Aprotinin deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde böbrek hasarına etkisi, 16, 9-18 p.
- Kasnak, C., Palamutoğlu, R., Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri, 2015, Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 3 (5) p.
- Kawamoto, E. M., vd., Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease, 2005, Neurobiol Aging, 26 (6) 857-64 p.
- Kaya, Y., Aral, E., Coskun, T., Erkasap, N., Var, A., Increased intraabdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats, 2002, J Surg Res, (108) 250-257 p.
- Kim SY., Lim JH., Park MR., Kim YJ. Park Ti., Seo YW., Choi KG., Yun SJ., Enhanced Antioxidant Enzymes Are Associated with Reduced Hydrogen Peroxide in Barley Roots Under Saline Stress. J Biochem Mol Biol., 38(2):218-24. 2005.
- Kon, V., Glomeruler filtration. in: Massry SG, Glassock RJ (eds), 1995, Glomeruler filtration. in: Massry SG, Glassock RJ (eds). Text book of nephrology, Wiliams and Wilkins, Baltimore 54-60 p.
- Korkmaz A., Kolankaya D., Protective Effect of Rutin on the Ischemia/Reperfusion Induced Damage in Rat Kidney. J Surg Res. doi:10.1016/j.jss.2009.03.022, 2009.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Kopani, M., vd., Oxidative stress and electron spin resonance, 2006, Clin Chim Acta, 364 (1-2) 61-66 p.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, 2004, Chemistry, (85:633-40).
- Kumar, A. N., Aruna, P., Naidu, J. N., Kumar, R., Srivastava, Anuj K., Ürik Asidin Antioksidan ve Pro-Oksidan Özellikleri ile İlgili Kavram ve Tartışmalarının Derlemesi, 2015, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 24 (1) 19-40 p.
- Kuroda, M., Asaka, S., Tofuku, Y., Takeda, R., Serum antioxidant activity in uremic patients, 1985, Nephron, 41 (3) 293-298 p.
- Laemmli, U., Cleavage of structural proteins during the assemblage of the head of bacteriophage T4, 1970, Nature, (227:680-5) p.
- Lance D.D., Brenner B. M., The renal circulation in: Brenner BM (eds). The Kidney, 1996, WB Saunders Company, Philadelphia, 247-286 p.
- Lin, H. C., Chen, H.J., Hou, W.C., Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels, 2002, Electrophoresis, 23 513-516 p.
- Luan, F., Wüst, M., Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp, 2002, Phytochemistry, 60 (5) 451-459 p.
- Madankumar, A., Jayakumar, S., Devaki, T., Geraniol, A Component of Plant Essential Oils Prevents Experimental Oral Carcinogenesis by Modulating Glycoprotein Abnormalities and Membrane Bound ATPASE'S, 2013, International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 5 (1).
- Madox, D. A., Brenner, B. M., Glomerular ultrafiltration. in: Brenner BM(eds). The Kidney, 1996, WB Saunders Company, Philadelphia, 286-334 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Mahmoud, S. S., Croteau, R. B., Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants, 2002, Trends in plant science, 7 (8) 366-373 p.
- Mauney, M. C., vd., Prevention of spinal cord injury after repair of the thoracic or thoracoabdominal aorta, 1995, The Annals of thoracic surgery, 59 (1) 245-252 p.
- McCord, J. M., Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, 1985, The New England Journal of Medicine, 312 (3) 159-163 p.
- McDougal, W. S., The diagnosis, management, and pathophysiology of acute renal failure in surgical patients., 1985, A.U.A. Update Series, IV: lesson 7.
- Memişoğulları, R., Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, 2005.
- Miyazawa, M., Wada, T., Kameoka, H., Biotransformation of (+)-and (-)-limonene by the larvae of common cutworm (Spodoptera litura), 1998, Journal of agricultural and food chemistry, 46 (1) 300-303 p.
- Molitoris, B., Acute renal failure, 1999, Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998), 35 (9) 659-666 p.
- Nath, K. A., Fischereder, M., Hostetter, T. H., The role of oxidants in progressive renal injury, 1994, Kidney international. Supplement, 45 111-5 p.
- Navar L.G., Carmines P. K., Mitchell K.D. , Renal circulation in: Massry SG, Glassock RJ (eds). Text book of nephrology, 1995, Wiliams and Wilkins Baltimore, 41-54 p.
- Odar, İ. V., Anatomi ders kitabı, 1986, Hacettepe Taş Kitapçılık.
- Okcu, Z., Keles, F., Kalp-damar hastalıkları ve antioksidanlar, 2009, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg, 40 153-160 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Onal A., Astarcioglu H., Ormen M., Atula K., Sarioglu S., Sıcandaki Renal Iskemi-Reperfuzyon Hasarında L-Karnitinin Koruyucu Etkisi. Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery Ulus Travma Derg, 10(3):160-167, 2004.
- Oral, Ö., Irmak, S., Ekici, S., Gözüaçık, D., Ürolojide Otofaji, 2015.
- Orrenius, S., Burkitt, M. J., Kass, G. EN., Dypbukt, J. M., Nicotera, P., Calcium ions and oxidative cell injury, 1992, Annals of neurology, 32 (S1) S33-S42 p.
- Paller, M. S., Hoidal, JR., Ferris, T. F., Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat, 1984, Journal of Clinical Investigation, 74 (4) 1156 p.
- Parks, D. A., Williams, T. K., Beckman, J. S., Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation, 1988, American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 254 (5) G768-G774 p.
- Polo, M. P., De Bravo, M. G., Effect of geraniol on fatty-acid and mevalonate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2, 2006, Biochemistry and cell biology, 84 (1) 102-111 p.
- Rasoulilian B., Jafari M, Noroozadeh A., Mehrani H., Wahhab-Aghai H., Hashemi-Madani S. M. H., Ghani E., Esmaili M., Asgari A., Khoshbaten A. Effects of Ischemia-Reperfusion on Rat Renal Tissue Antioxidant Systems and Lipid Peroxidation. Acta Medica Iranica 2008; 46(5): 353-360 p.
- Regev, S., Cone, W. W., Analyses of pharate female twospotted spider mites for nerolidol and geraniol: evaluation for sex attraction of males, 1976, Environmental entomology, 5 (1) 133-138 p.
- Robins, S., Cotran, RS., Kumar, V., Pathologic basis of disease, 1979, WB Saunders Company, Philadelphia, London and Toronto, 1333 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Roncal C. A., Mu W., Croker B., Reungjui S., Ouyang X., Tabah-Fisch I., Johnson R. J., Ejaz A. A., Effect of Elevated Serum Uric Acid on Cisplatin-Induced Acute Renal Failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292: F116-F122, 2007.
- Sanz, N., Fernandez, C.D., Simon, L.F., Alvarez, A., Cascales, M., Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide, 1998, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1384 66-78 p.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., Milner, J. A., A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species, 2007, *The Journal of nutritional biochemistry*, 18 (9) 567-579 p.
- Sener, G., vd., Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats, 2005, *Pharmacological Research*, (52; 216-22) p.
- Senturk, H., Kabay, S., Bayramoglu, G., Ozden, H., Yaylak, F., Yucel, M., Gürlek Olgun E., Kutlu, A., 2008, Silymarin attenuates the renal ischemia / reperfusion injury-induced morphological changes in the rat liver, *World J Urol* , 26(4):401-7.
- Sies, H., Oxidative stress: oxidants and antioxidants, 1997, *Experimental physiology*, 82 (2) 291-295 p.
- Singh D, Chander V, Chopra K. Protective Effect of Catechin on Ischemia-Reperfusion-Induced Renal Injury in Rats. *Pharmacol Rep*. 2005 Jan-Feb; 57(1):70- 76 p.
- Staroverov, V. N., Davidson, E. R., Distribution of effectively unpaired electrons, 2000, *Chemical Physics Letters*, 330 (1) 161-168 p.
- Tekcan, A. G. M., Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis, 2009, *Infertilite, Androloji Bülteni*, 37 131-136 p.
- Temizkan, G., Arda, N., Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, 2004, 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Tetik, Ö., Gürbüz, A., Spinal Kord Korunması, 2000, Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi, 8 (2) 587-592 p.
- Thadhani, R., Pascual, M., Bonventre, J.V., Acute renal failure, 1996, N Engl J Med, (334) 1448-60 p.
- Theocharis, S. E., Margeli, A.P., Skaltsas, S.D., Spiliopoulou, C.A., Koutselinis S., Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study, 2001, Toxicology, 161 129-138 p.
- Tidwell, T. T., Sterically crowded organic molecules: synthesis, structure and properties, 1978, Tetrahedron, 34 (13) 1855-1868 p.
- Tisher, C. C., Madsen, K. M., Anatomy of the kidney, 1991, The kidney, 1 3-75 p.
- Tola, E. N., Oksijen ve antioksidan sistemlerinin kadın fertilitesi üzerine etkileri, 2014.
- Velioğlu, Y., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, 1998, Journal of agricultural and food chemistry, 46 (10) 4113-4117 p.
- Waynforth, H., Flecknell, P., Experimental and surgical technique in the rat, 1992, 2nd ed. New York: Academic Press.
- Weidenhamer, J. D., Macias, F. A., Fischer, N. H., Williamson, G. B., Just how insoluble are monoterpenes?, 1993, Journal of Chemical Ecology, 19 (8) 1799-1807 p.
- Wilhelm, J., Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation, 1989, Acta Universitatis Carolinae. Medica. Monographia, 137 1-53 p.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L., Antioxidants and prevention of chronic disease, 2004, Critical reviews in food science and nutrition, 44 (4) 275-295 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Williams, P., vd., Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats, 1997, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 37 (1) 1-7 p.
- Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahman, M. A., An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes., 1971, Anal Biochem, 44 301-305 p.
- Yang, T., Li, J., Wang, H. X., Zeng, Y., A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*, 2005, Phytochemistry, 66 (3) 285-293 p.
- Yellon, D. M., Downey, J. M., Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology, 2003, Physiological Reviews, 83 (4) 1113-1151 p.
- Yılmaz, S., Sofuoğlu, K., Delikara, N., Çetinkaya, T., Yılmaz, E., Semende Reaktif Oksijen Türüleri Ve Antioksidanlar, 2008, Zeynep Kamil Tıp Bülteni, 39 (3) 131 p.
- Yokuş, B., Çakır, D. Ü., İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, 2002, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 22 (5) 535 p.
- Young, I., Woodside, J., Antioxidants in health and disease, 2001, Journal of clinical pathology, 54 (3) 176-186 p.
- Yüzer, H., 2008, Ketamin, Tiyopental, Proforol, Etomidat Ve, İntralipid' in Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarına Etkileri, Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı.
- Zimmerman, B., Granger, D., Reperfusion injury, 1992, The Surgical clinics of North America, 72 (1) 65-83 p.
- Zimmerman, P. R., Chatfield, R. B., Fishman, J., Crutzen, P. J., Hanst, P. L., Estimates on the production of CO and H<sub>2</sub> from the oxidation of hydrocarbon emissions from vegetation, 1978, Geophysical Research Letters, 5 (8) 679-682 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

Şen H., 2015, Böbreğin Yapısı, [http://www.biyolojisesi.net/tum%20uniteler/bosaltim/bobregin\\_yapisi.html](http://www.biyolojisesi.net/tum%20uniteler/bosaltim/bobregin_yapisi.html), erişim tarihi: 20.06.2015.

Şen H., 2015, Böbreğin Yapısı, [http://www.biyolojisesi.net/tum%20uniteler/bosaltim/nefronun\\_yapisi.html](http://www.biyolojisesi.net/tum%20uniteler/bosaltim/nefronun_yapisi.html), erişim tarihi: 20.06.2015.

Anonim, 1999, Gıda Bilgi Sitesi, <http://www.food-info.net/pl/qa/qa-fi69.htm>, erişim tarihi, 20.06.2015.

Anonim, 2011, Tıbbi Laboratuvar, [http://www.megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Histolojik%20Pr eparat%20Haz% C4% B1rlama.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Histolojik%20Pr eparat%20Haz% C4% B1rlama.pdf), erişim tarihi: 20.06.2015.

## EK AÇIKLAMA: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 27 03. 2013  
 TOPLANTI SAYISI : 56  
 DOSYA KAYIT NUMARASI : 328  
 KARAR NUMARASI : 328  
 ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Doç. Dr. Mediha CANBEK  
 YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Yüksek Lisans Öğrencisi Seren DANİŞ

HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Wistar albino (erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Mediha CANBEK**'in araştırma yürütücüsü olduğu 328/2013 kayıt numaralı ve "Sıçanlarda Kısa Süreli Böbrek İskemi / Reperfüzyon Hasarına Karşı Geraniolün Koruyucu Etkisi" konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kevser BROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan Y. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmani DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)